



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

FABÍOLA AYRES CACCIATORE

**ENCAPSULAÇÃO DE CARVACROL EM NANOLIPOSSOMAS E NANOCÁPSULAS
VISANDO À INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS
ADERIDAS EM AÇO INOXIDÁVEL**

Porto Alegre

2019

FABÍOLA AYRES CACCIATORE

**ENCAPSULAÇÃO DE CARVACROL EM NANOLIPOSSOMAS E NANOCÁPSULAS
VISANDO À INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS
ADERIDAS EM AÇO INOXIDÁVEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia da Silva Malheiros
Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Cacciatore, Fabiola Ayres

Encapsulação de carvacrol em nanolipossomas e nanocápsulas visando à inibição de bactérias de importância em alimentos aderidas em aço inoxidável / Fabiola Ayres Cacciatore. -- 2019.

121 f.

Orientadora: Patrícia da Silva Malheiros.

Coorientador: Adriano Brandelli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Nanoencapsulação. 2. Antimicrobianos Naturais. 3. Sanitizantes. 4. Nanotecnologia. 5. Patógenos Alimentares. I. Malheiros, Patrícia da Silva, orient. II. Brandelli, Adriano, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Autora: Fabíola Ayres Cacciatore (Engenheira de Alimentos/UFPB)

Título da dissertação: Encapsulação de carvacrol em nanolipossomas e nanocápsulas visando à inibição de bactérias de importância em alimentos aderidas em aço inoxidável

Submetida como parte dos requisitos para a obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprovada em: ____/____/____

Homologada em: ____/____/____

Pela banca examinadora:

Por:

Prof^a. Dra. Patrícia da Silva Malheiros
Orientadora
Docente do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues
Coordenador
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Co-Orientador
Docente do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

Prof^a. Dra. Simone Hickmann Flôres
Diretora
ICTA/UFRGS

Banca: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo
Doutor em Ciências Biológicas - UFRGS
PPGCTA/UFRGS

Banca: Prof^a. Dra. Manuela Poletto Klein
Doutora em Engenharia de Alimentos -
UFSC
Professora Adjunta – UFCSPA

Banca: Flávio Fonseca Veras
Doutor em Ciência e Tecnologia
de Alimentos – UFRGS
Pós-doutorando – PPGCTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Malheiros pela confiança, exemplo profissional, disponibilidade e apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Adriano Brandelli pela co-orientação, ajuda e incentivo para a continuidade deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Tondo pelos ensinamentos e por, há muitos anos atrás, ter me apresentado o fascinante mundo da microbiologia, pelo qual me apaixonei.

Ao Prof. Dr. Eliseu Rodrigues pela disponibilidade de uso do laboratório e equipamentos sem os quais não seria possível a realização dos experimentos.

Aos meus pais, Nelly (*in memoriam*) e Elvira por todo amor e por terem me educado para ser a pessoa que sou hoje.

À Cristina Beck pelo apoio, companheirismo e por acreditar em mim quando nem eu acreditava mais.

À Carolina Albuquerque, que em uma tarde de conversa me fez enxergar que nunca é tarde para correr atrás dos sonhos.

A todos os colegas do laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, pelas conversas, apoio e momentos compartilhados. Agradeço em especial à Michelle, Caroline Heckler, Fabiani, Elis, Daniela e Renata pelo carinho e pela ajuda nos primeiros meses com as metodologias. À Caroline Maders, grande companheira de laboratório, que sempre acreditou que no final os experimentos dariam certo e não me deixava desanimar.

Aos colegas Stefani e Eli por todas as dúvidas e estudos compartilhados e por todo apoio e amizade.

À Vera, pelos cafezinhos, conversas e incentivos sempre.

A todos os professores, funcionários do ICTA, colegas do mestrado e amigos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a CAPES e Evonik pelo apoio financeiro e/ou tecnológico.

RESUMO

Equipamentos e superfícies de indústrias de alimentos e serviços de alimentação são muito suscetíveis ao desenvolvimento de biofilmes, tornando-se um grande desafio a garantia da segurança de alimentos. A higienização adequada destas superfícies é muito importante para este controle, porém utiliza-se de produtos químicos que podem gerar contaminação ambiental além de serem possivelmente um dos fatores responsáveis pelo surgimento de cepas microbianas mais resistentes. Há uma grande demanda pela utilização de insumos naturais para o desenvolvimento de sanitizantes, porém estes compostos apresentam desvantagens como alta volatilidade, sabor residual ou degradação por exposição a condições ambientais extremas. A encapsulação em nanopartículas utilizando matrizes atóxicas surge como uma estratégia para proteger os compostos, mantendo sua atividade antimicrobiana e proporcionando liberação prolongada. O presente estudo teve por objetivo encapsular carvacrol, um composto natural que em diversos estudos demonstrou destacada ação de inativação de patógenos em alimentos, em nanolipossomas e nanocápsulas poliméricas, comparar suas características físico-químicas e ação antimicrobiana contra *pools* de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* em testes *in vitro* e aderidos em aço inoxidável. Nanolipossomas contendo carvacrol (NLC) foram preparados através da técnica de hidratação do filme lipídico, apresentando diâmetro médio de 270,83 nm, polidispersidade de 0,22, eficiência de encapsulação de 98,02 % e potencial zeta de + 8,64 mV. Concentração bactericida mínima (CBM) dos NLC foi de 3,53 mg/mL contra *Salmonella* e 5,30 mg/mL contra os demais microrganismos. Nanocápsulas contendo carvacrol (NCC) foram preparadas usando a técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, apresentando diâmetro médio de 159,30 nm e polidispersidade de 0,22, eficiência de encapsulação de 97, 11 % e potencial zeta de + 44,84 mV. CBM das NCC foi de 4,42 mg/mL contra *E. coli* e de 3,31 mg/mL contra os demais microrganismos. Os resultados para CBM juntamente com as características físico-químicas demonstraram que NCC apresentaram melhores resultados do que os NLC contra os microrganismos testados, sendo selecionadas para os demais experimentos. A cinética de multiplicação foi determinada para cada bactéria ($\approx 8 \log$ UFC/mL) utilizando diferentes concentrações de nanocápsulas contendo carvacrol (NCC). Os resultados mostraram que após 2 horas de contato NCC com concentração de carvacrol equivalente a $\frac{1}{2}$ CBM inibiram *Salmonella* e *E. coli* abaixo do limite de detecção do método de plaqueamento em gota (*drop plate*), igual a 1,69 UFC/mL. A população de *L. monocytogenes* foi reduzida em 2 log UFC/mL

em 6 horas e *S. aureus* foi inibido abaixo do limite de detecção do método (1,69 UFC/mL), em 48 horas utilizando NCC com concentração de carvacrol equivalente a CBM. Após, os *pools* de cada bactéria foram aderidos, separadamente, em coupons de aço inoxidável AISI 304. Conforme o microrganismo a população inicial apresentou adesão variando entre 6 e 7 log UFC/cm². A ação antimicrobiana das NCC foi avaliada em diferentes concentrações após 1 minuto de contato entre o antimicrobiano e os *coupons* contendo células aderidas. *Salmonella* apresentou maior redução no número de células aderidas, seguida por *E. coli*. Os resultados obtidos sugerem que as NCC apresentam potencial para desenvolvimento de um sanitizante para utilização em superfícies de contato com alimentos, visando evitar a fixação bacteriana em sua fase inicial evitando assim o desenvolvimento de biofilme.

Palavras-chave: Carvacrol; Nanocápsulas; Nanolipossomas; Patógenos; Nanotecnologia

ABSTRACT

Equipment and surfaces of food industries and food services are very susceptible to the development of biofilms, making it a major challenge to ensure food safety. The proper hygiene of these surfaces is very important for this control, but it uses chemical products that can generate environmental contamination besides being possibly one of the factors responsible for the emergence of more resistant microbial strains. There is a great demand for the use of natural compounds for the development of sanitizers, however these compounds present disadvantages such as high volatility, residual taste or degradation due to exposure to extreme environmental conditions. Encapsulation in nanoparticles using non-toxic matrices arises as a strategy to protect the compounds, maintaining their antimicrobial activity and providing prolonged release. The objective of this study was to encapsulate carvacrol, a natural compound that in several studies demonstrated the inactivation of pathogens in food, in nanoliposomes and polymer nanocapsules, to compare its physicochemical characteristics and antimicrobial action against pools of *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in tests *in vitro* and adhered in stainless steel. Nanoliposomes containing carvacrol (NLC) were prepared by the lipid film hydration technique, with a mean diameter of 270.83 nm, polydispersity of 0.22, encapsulation efficiency of 98.02 % and zeta potential of + 8.64 mV. Minimum bacterial concentration (MBC) of NLC was 3.53 mg / mL against *Salmonella* and 5.30 mg / mL against the other microorganisms. Nanocapsules containing carvacrol (NCC) were prepared using the interfacial deposition technique of the preformed polymer, having a mean diameter of 159.30 nm and polydispersity of 0.22, encapsulation efficiency of 97, 11% and zeta potential of + 44, 84 mV. The NCC CBM was 4.42 mg / mL against *E. coli* and 3.31 mg / mL against the other microorganisms. The results for MBC together with the physical-chemical characteristics showed that NCC presented better results than the NLC against the tested microorganisms, being selected for the next experiments. The kinetics of multiplication were determined for each bacteria ($\approx 8 \log \text{CFU} / \text{mL}$) using different concentrations of nanocapsules containing carvacrol (NCC). The results showed that after 2 hours of NCC contact with carvacrol concentration equivalent to $\frac{1}{2}$ CBM, they inhibited *Salmonella* and *E. coli* below the detection limit of the *drop plate method*, equal to 1.69 CFU / mL. The *L. monocytogenes* population was reduced by 2 log CFU / mL in 6 hours and *S. aureus* was inhibited below the detection limit of the method (1.69 log CFU / mL) in 48 hours using NCC with a concentration of carvacrol equivalent to the MBC. Afterwards, the pools of each

bacteria were separately adhered to AISI 304 stainless steel coupons. According to the microorganism, the initial population showed adhesion ranging between 6 and 7 log CFU / cm². The antimicrobial action of the NCC was evaluated at different concentrations after 1 minute of contact between the antimicrobial and the coupons containing adhered cells. *Salmonella* showed a larger reduction in the number of adhered cells, followed by *E. coli*. The results suggest that the NCC present potential for the development of a sanitizer for use in food contact surfaces, in order to avoid bacterial fixation in its initial phase, thus avoiding biofilm development.

Keywords: Carvacrol; Nanocapsules; Nanoliposomes; Pathogens; Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Representação esquemática de lipossoma28

Figura 2 – Representação esquemática de nanoesfera e nanocápsula29

CAPÍTULO 2: ARTIGO 1

Figura 1 – Os 5 estágios do desenvolvimento de biofilme39

CAPÍTULO 2: ARTIGO 2

Figura 1 - Cinética de multiplicação de *pools* de *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus in vitro* utilizando nanocápsulas contendo carvacrol (NCC) em diferentes concentrações90

Figura 2 – Inibição de *pools* de *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* aderidos em *coupons* de aço inoxidável utilizando nanocápsulas contendo carvacrol (NCC) em diferentes concentrações após 1 minuto de contato.....92

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2: ARTIGO 1

Tabela 1 – Antimicrobianos naturais com potencial uso como sanitizantes	44
Tabela 2 – Preparações comerciais de fagos como sanitizantes para aplicação direta em alimentos e/ou superfícies que entram em contato com alimentos..	53

CAPÍTULO 2: ARTIGO 2

Tabela 1 – Diâmetro médio, polidispersidade (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulação dos nanolipossomas contendo carvacrol (NLC) e nanocápsulas contendo carvacrol (NCC).....	84
Tabela 2 – Concentração Bactericida Mínima de carvacrol livre (controle), nanolipossomas contendo carvacrol (NLC) e nanocápsulas contendo carvacrol (NCC) contra os <i>pools</i> compostos por <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	86

LISTA DE EQUAÇÕES

CAPÍTULO 2: ARTIGO 2

Equação 1 – Cálculo de eficiência de encapsulação.....	81
Equação 2 – Cálculo de conversão de log UFC/mL para log UFC/cm ²	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

‰: percentual

®: marca registrada

°C: graus Celsius

µL: microlitro

µg: micrograma

BHI: Brain Heart Infusion

BPF: Boas Práticas de Fabricação

CBM: Concentração Bactericida Mínima

EE: Eficiência de Encapsulação

FDA: *Food and Drug Administration*

GRAS: *Generally Recognized as Safe*

ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

KHz: quilohertz

mg: miligrama

mV: milivolt

nm: nanômetro

NCC: nanocápsulas contendo carvacrol

NLC: nanolipossomas contendo carvacrol

PDI: polidispersidade

Pool: solução contendo microrganismos de mesma espécie, porém de diferentes cepas

QS: *quorum sensing*

rpm: rotações por minuto

UFC: unidades formadoras de colônias

WHO: *World and Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA	
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Adesão microbiana e formação de biofilmes	21
3.2 Superfícies de contato com alimentos	22
3.3 Higienização	23
3.4 Sanitizantes	24
3.5 Óleos essenciais	24
3.5.1 Carvacrol	25
3.6 Nanoencapsulação	26
3.6.1 Nanolipossomas	27
3.6.2 Nanopartículas poliméricas	28
3.6.2.1 Eudragit®	29
3.7 Microrganismos de interesse	30
3.7.1 <i>Salmonella</i>	30
3.7.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.7.3 <i>Escherichia coli</i>	32
3.7.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	32
CAPÍTULO 2 – ARTIGOS	
4 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 ARTIGO 1 - ANTIMICROBIANOS NATURAIS NANOPARTICULADOS PARA DESINFECÇÃO DE SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS	36

1. INTRODUÇÃO	37
2. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS	38
3. IMPORTÂNCIA DA HIGIENIZAÇÃO PARA A SEGURANÇA DE ALIMENTOS	41
4. ANTIMICROBIANOS NATURAIS COMO DESINFETANTES	43
5. BACTERÍOFAGOS COMO ANTIMICROBIANOS	52
6. ANTIMICROBIANOS NATURAIS NANOENCAPSULADOS COMO DESINFETANTES ALTERNATIVOS	56
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
4.2 ARTIGO 2 – ENCAPSULAÇÃO DE CARVACROL EM NANOLIPOSSOMAS E NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS: COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E AÇÃO ANTIMICROBIANA CONTRA BACTÉRIAS ADERIDAS EM AÇO INOXIDÁVEL	75
1. INTRODUÇÃO	76
2. MATERIAIS E MÉTODOS	79
2.1 Culturas Bacterianas	79
2.2 Preparação da solução de carvacrol para hidratação do filme lipídico	79
2.3 Encapsulação do carvacrol em nanoestruturas	79
2.3.1 Encapsulação do carvacrol em nanolipossomas.....	79
2.3.2 Encapsulação do carvacrol em nanocápsulas	80
2.4 Caracterização físico-química das nanoestruturas contendo carvacrol	80
2.5 Eficiência de encapsulação	81
2.6 Concentração Bactericida Mínima	81
2.7 Cinética de multiplicação <i>in vitro</i> dos microrganismos em presença de agente antimicrobiano	82
2.8 Preparação dos <i>coupons</i> de aço inoxidável AISI 304	82
2.9 Adesão microbiana e ação antimicrobiana	82
2.10 Análise estatística	83

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
3.1 Caracterização físico-química das nanoestruturas contendo carvacrol	83
3.2 Concentração Bactericida Mínima	85
3.3 Cinética de multiplicação de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Escherichi coli</i> e <i>Listeria monocytogenes in vitro</i> em presença de agentes antimicrobianos	87
3.4 Adesão microbiana e ação antimicrobiana	91
4. CONCLUSÃO	94
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

CAPÍTULO 3 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO

5. DISCUSSÃO GERAL	107
6. CONCLUSÃO	110
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1 INTRODUÇÃO

Uma das grandes preocupações da indústria de alimentos refere-se a contaminação microbiológica. Sabe-se que as bactérias podem viver de forma isolada ou associadas, organizadas em biofilmes (ESPER, 2011). Células bacterianas em biofilmes agem como um organismo multicelular, apresentando maior resistência do que células planctônicas (KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; MIAO *et al.*, 2017; VASUDEVAN, 2014). A formação de biofilmes em superfícies e equipamentos é um fator de grande impacto para o controle de qualidade e segurança dos alimentos, pois são fonte de contaminação por microrganismos patogênicos e deteriorantes, ocasionando perda da qualidade e redução da vida útil do alimento bem como doenças na população (MILLEZI *et al.*, 2012; PARIZZI, 2004).

Para evitar a formação de biofilmes é imprescindível que, além da utilização de equipamentos e utensílios com *design* e materiais apropriados, a higienização seja realizada de maneira eficiente, evitando a adesão bacteriana às superfícies, primeira etapa na formação de biofilmes (MACÊDO, 2006; SREY; JAHID; HA, 2013). A higienização é parte integrante das Boas Práticas de Fabricação (BPF) que, juntamente com a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), tem como objetivo a produção de alimentos seguros. A higienização é composta por duas etapas distintas: limpeza, realizada com detergentes, que tem o objetivo de remover resíduos orgânicos, e sanitização, realizada com sanitizantes, que visa a redução da quantidade de microrganismos a níveis seguros (FERNANDES *et al.*, 2017; MCDONNELL; RUSSELL, 1999; MENEGARO *et al.*, 2016).

Os sanitizantes utilizados atualmente na indústria de alimentos são produtos químicos, que podem ser carcinogênicos, causarem contaminação ambiental e um dos fatores responsáveis pelo surgimento de cepas microbianas mais resistentes (HRUDEY *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017).

Tendo em vista uma maior proteção ao meio ambiente e atendendo a demanda crescente dos consumidores por produtos naturais, atualmente estão sendo desenvolvidas tecnologias para criação de sanitizantes alternativos. Diversas substâncias naturais apresentam propriedades antimicrobianas, destacando-se os compostos antimicrobianos presentes nos óleos essenciais de plantas aromáticas, como o carvacrol, extraído de orégano e tomilho. O carvacrol apresenta propriedades antimicrobianas, sendo reconhecido como substância segura (GRAS: *Generally Recognized as Safe*) de acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA) (LEE; PARK, 2015).

Entretanto, alguns problemas de estabilidade, hidrofobicidade e volatilidade ainda são um empecilho para a utilização desse composto como matéria-prima para o desenvolvimento de sanitizantes (BRANEN; DAVIDSON, 2004; CHOLLET *et al.*, 2008; WEISHEIMER *et al.*, 2010). Visando minimizar os problemas acima expostos, a nanoencapsulação dos compostos naturais pode ser uma alternativa eficiente para proteger estes antimicrobianos dentro e/ou na superfície das nanopartículas, diminuindo assim sua volatilidade e aumentando sua estabilidade. Além disso, a encapsulação proporciona liberação progressiva e controlada dos compostos, mantendo as substâncias antimicrobianas em contato com as superfícies por maior período de tempo (ASBAHANI *et al.*, 2015; ENGEL *et al.*, 2017; MALHEIROS *et al.*, 2010; ZORZI *et al.*, 2015), evitando assim contaminação cruzada, adesão bacteriana e formação de biofilmes.

Dentre os nanomateriais mais estudados para aplicação em alimentos destacam-se nanolipossomas e nanopartículas poliméricas (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; LOPES; PINILLA; BRANDELLI, 2017). As nanopartículas poliméricas apresentam-se como nanocápsulas (nanopartícula polimérica contendo núcleo oleoso) ou nanoesferas (composto ativo adsorvido na superfície polimérica ou interior, não possui óleo em sua formulação) (REIS *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O material encapsulante pode ser natural ou sintético, destacando-se entre os sintéticos o Eudragit, muito usado pela indústria farmacêutica devido à grande variedade de tipos existentes, proporcionando características diversas às nanopartículas (PATRA *et al.*, 2017). Recomenda-se uso de nanopartículas poliméricas quando deseja-se liberação lenta do composto encapsulado (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012). Já os lipossomas são estruturas coloidais compostas por um núcleo aquoso e uma membrana fosfolipídica que podem encapsular materiais hidrossolúveis, lipossolúveis ou anfifílicos. São biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade e estabilidade em aplicações com alta atividade de água, comuns na indústria de alimentos (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; DESAI; PARK, 2005; MALHEIROS *et al.*, 2010).

Analisando os dados do Ministério da Saúde do Brasil entre 2007 e 2017 observa-se que a *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são os principais causadores de surtos alimentares no país (BRASIL, 2018), enquanto *Listeria monocytogenes* desperta preocupação, pois apresenta alta letalidade e vem causando diversos surtos nos últimos anos (SOUTH AFRICA, 2018). Neste contexto, o desenvolvimento de sanitizantes alternativos preparados com matéria-prima inócua, antimicrobianos naturais e tecnologias inovadoras pode representar um avanço para a higienização de superfícies em contato com alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Encapsular carvacrol em nanolipossomas e nanocápsulas visando à inibição de bactérias de importância em alimentos aderidas em aço inoxidável.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Encapsular carvacrol em nanolipossomas e nanocápsulas;
- b) Determinar as características físico-químicas dos nanolipossomas e nanocápsulas contendo carvacrol através de análise de tamanho, polidispersidade, eficiência de encapsulação e potencial zeta;
- c) Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de carvacrol livre, bem como do carvacrol encapsulado em nanolipossomas e nanocápsulas, contra *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*;
- d) Determinar a cinética de multiplicação *in vitro* de *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* em presença de carvacrol livre e encapsulado em nanocápsulas poliméricas utilizando diversas concentrações;
- e) Avaliar a ação inibitória de carvacrol, livre e encapsulado, contra *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* aderidos ao aço inoxidável.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Adesão microbiana e formação de biofilmes

Evitar a contaminação microbiana é um grande desafio para a indústria alimentícia. Uma das principais fontes de contaminações são os biofilmes que podem se formar em superfícies e equipamentos podendo ocasionar redução da vida útil do produto e doenças na população (MILLEZI *et al.*, 2012).

Os biofilmes são ecossistemas complexos, formados a partir de uma ou mais espécies de microrganismos, onde as células apresentam-se aderidas entre si e à uma superfície e são embebidas por uma matriz de exopolissacarídeos, formada por DNA, lipídios, proteínas e polissacarídeos (BJARNSHOLT, 2013; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; MACÊDO, 2006). Os biofilmes se formam quando ocorre aderência de um conglomerado de bactérias em equipamentos ou superfícies que contenham resíduos de nutrientes. A presença destes nutrientes ocorre devido à dificuldade de acesso do sanitizante a determinadas partes do equipamento (erro de projeto no *design* higiênico) ou devido a falhas no procedimento de higienização (ALLES; DUTRA, 2011; KASNOWSKI *et al.*, 2010).

O processo de formação de biofilmes passa por duas etapas bastante distintas, a primeira reversível e a segunda irreversível (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). Na primeira etapa, caracterizada como um processo reversível, ocorre a adesão bacteriana à superfície através de forças de Van der Waals e atração eletrostática. Enquanto na segunda etapa ocorrem formação de adesinas na superfície das células (proteínas que facilitam adesão dos microrganismos a superfícies) e ligações polares entre os microrganismos e a superfície (KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; MACÊDO, 2006).

A maioria das contaminações que ocorrem em indústrias de alimentos são atribuídos aos biofilmes pois são descontínuos e afetam somente porções dos produtos, corroborando a teoria de que a contaminação ocorre devido ao desprendimento de porções de biofilmes (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005; SZCZEPANSKI; LIPSKI, 2013).

Observa-se que, quando organizados em biofilmes, os microrganismos apresentam características fenotípicas diferentes das células planctônicas (microrganismos dispersos em meio aquoso, não fixados a uma superfície), adquirindo novos genes de virulência que facilitam sua sobrevivência em ambientes hostis (GIAOURIS *et al.*, 2015; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017). A remoção de biofilmes é bastante difícil pois, além de ocorrer interações entre os

microrganismos e resíduos alimentares, aumentando assim a adesão à superfície, a matriz de exopolissacarídeos atua como uma barreira de proteção contra ações mecânicas, antimicrobianos, ácidos, alta temperatura, radiação ultravioleta e outras modificações ambientais adversas (ESPER, 2011; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; MIAO *et al.*, 2017; VASUDEVAN, 2014).

3.2 Superfícies de contato com alimentos

Os biofilmes podem ser formados em diferentes tipos de superfícies de contato com alimentos como aço inoxidável, vidro, borracha, poliestireno, entre outros (PARIZZI, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2017; UCHIDA *et al.*, 2015). Apesar de qualquer tipo de superfície ser suscetível à formação de biofilmes, algumas características serão determinantes para a adesão microbiana tais como: rugosidade, porosidade, carga da superfície e hidrofobicidade do material, além do tipo de nutriente disponível, seu pH e temperatura (SREY; JAHID; HA, 2013; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2015). Geralmente materiais como o aço inoxidável e o vidro, que apresentam baixa rugosidade na superfície, permitem menor capacidade de aderência dos microrganismos do que teflon, náilon e polímeros em geral (SINDE; CARBALLO, 2000).

Aço inoxidável é um material bastante usado em equipamentos, utensílios e superfícies em indústrias de alimentos. Esse material não favorece a adesão microbiana porém, diversos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* são capazes de aderir no aço inoxidável em tempos de contato inferiores a 2 horas (HOOD; ZOTTOLA, 1997; SINDE; CARBALLO, 2000).

São utilizados nas indústrias de alimentos dois tipos de aço inoxidável, AISI 316 e AISI 304, estes materiais apresentam alta resistência, ductilidade e dificultam a adesão microbiana, porém diferem quanto à composição da liga metálica (WANG; PALMER; BEESE, 2016). O aço inoxidável AISI 304 contém 18% de cromo e 8% de níquel, enquanto o aço inoxidável AISI 316 contém 16% de cromo, 10% de níquel e 2% de molibdênio. Devido à presença de molibdênio o aço inoxidável AISI 316 apresenta melhor resistência à corrosão (PARDO *et al.*, 2008), porém devido seu alto custo, muitas vezes é substituído pelo aço inoxidável AISI 304 para confecção de superfícies e equipamentos (SINDE; CARBALLO, 2000). O aço inoxidável AISI 304 apresenta baixo custo, boa resistência mecânica e boa resistência à corrosão, entretanto, devido à alta energia superficial é mais suscetível à adesão

bacteriana e formação de biofilme em comparação com o aço inoxidável AISI 316 (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

3.3 Higienização

Conforme a legislação sanitária federal toda indústria de alimentos ou serviço de alimentação no Brasil deve implementar as Boas Práticas de Fabricação (BPF) como forma de garantir a qualidade sanitária e conformidade dos alimentos (ANVISA, 2017). As BPF são um conjunto de medidas que devem ser adotadas para garantir a segurança do alimento desde a seleção da matéria-prima até a expedição do produto final. É um processo composto por diversas etapas, sendo uma das mais importantes a etapa de higienização (MACHADO; DUTRA; PINTO, 2015).

Para realizar um processo de higienização eficaz, além da escolha do detergente apropriado ao tipo de sujidade e da utilização de um sanitizante compatível com os microrganismos a serem combatidos, a água utilizada deve ser própria para consumo e livre de microrganismos. Deve-se também adotar técnicas de avaliação do processo e medidas de correção quando encontradas inconformidades (SILVA, G.; DUTRA, P.; CADIMA, 2010).

A limpeza visa a remoção de resíduos orgânicos e minerais que aderem às superfícies, tais como: proteínas, lipídios, carboidratos, poeira, etc. enquanto a sanitização tem o objetivo de reduzir a quantidade de microrganismos presentes na superfície e equipamentos a níveis seguros e compatíveis com a obtenção de produtos em boas condições higiênico-sanitárias, bem como controle e prevenção da formação de biofilme (FERNANDES *et al.*, 2017; MCDONNELL; RUSSELL, 1999; MENEGARO *et al.*, 2016). A operação de limpeza nas indústrias de alimentos normalmente é realizada através da ação conjunta de um agente mecânico e um agente químico (detergente), que deve ser escolhido conforme o tipo de sujidade a ser removida. Os detergentes mais utilizados são os alcalinos e os ácidos (SILVA; DUTRA; CADIMA, 2010).

A etapa de sanitização deve ser iniciada imediatamente após a limpeza e enxague, podendo ser realizada através de agentes físicos (calor ou radiação) ou químicos (produtos saneantes com ação antimicrobiana). Na indústria de alimentos normalmente a sanitização ocorre através do uso de agentes químicos, sendo mais usados ácido peracético, compostos derivados de cloro, compostos derivados de iodo e compostos de amônio quaternário (FERREIRA *et al.*, 2010; FRAISE; MAILLARD; SATTAR, 2013).

3.4 Sanitizantes

Conforme definição da resolução RDC 14 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) os sanitizantes são produtos que reduzem o número de bactérias a níveis seguros conforme as normas da saúde (BRASIL, 2007).

De maneira geral, um bom sanitizante deve apresentar-se estável em diversas condições de uso, apresentar baixa toxicidade e corrosividade, possuir amplo espectro de ação antimicrobiana, destruir rapidamente os microrganismos e ser aprovado pelo Ministério da Saúde (ANDRADE, 2008).

Nas indústrias de alimentos os sanitizantes mais utilizados são hipocloritos, devido sua eficácia, baixo custo, fácil preparo e aplicação (MENEGARO *et al.*, 2016). Porém, esses compostos podem causar corrosão nos equipamentos e superfícies, transmitir sabores e odores indesejáveis ao alimento se aplicado em concentrações elevadas, ser potencialmente tóxicos para os trabalhadores e causar contaminação ambiental (SILVA; DUTRA; CADIMA, 2010; WANG *et al.*, 2017).

A preocupação com a proteção ao meio ambiente somada a uma demanda crescente dos consumidores por produtos naturais está propiciando o desenvolvimento de tecnologias para criação de sanitizantes alternativos. Muitos consumidores procuram produtos naturais em substituição aos sintéticos ou químicos uma vez que há indícios de que esses produtos são responsáveis pelo desencadeamento de efeitos carcinogênicos (HRUDEY *et al.*, 2015). Além disso, o uso descontrolado de antimicrobianos químicos pode ser o responsável pelo surgimento de cepas de microrganismos mais resistentes (WANG *et al.*, 2017).

Neste contexto, os óleos essenciais e seus compostos ativos podem ser uma alternativa segura, pois além de muitos apresentarem comprovada ação antimicrobiana contra um elevado espectro de microrganismos, a maioria deles são reconhecidos como substâncias seguras (GRAS: *Generally Recognized as Safe*) de acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA) (LEE; PARK, 2015).

3.5 Óleos essenciais

Diversos estudos já foram realizados com óleos essenciais e seus componentes majoritários devido às suas propriedades antimicrobianas e potencial utilização na indústria de alimentos (PATRIGNANI *et al.*, 2015). Os óleos essenciais são substâncias naturais complexas,

formados por uma mistura de compostos aromáticos e voláteis produzidos pelo metabolismo secundário de algumas plantas. São caracterizados pelo forte odor, por possuírem grande capacidade antimicrobiana e por serem facilmente degradados por fatores externos. Dentre as 17.000 espécies de plantas existentes no mundo, apenas 10% delas produzem óleos essenciais, sendo chamadas de plantas aromáticas (ASBAHANI *et al.*, 2015; ROCHA, C., 2014).

Devido à grande diversidade dos óleos essenciais em relação à composição química e arranjo estrutural sua ação antimicrobiana pode ser bastante variável. De maneira geral os antimicrobianos naturais derivados de óleos essenciais atuam através da desestabilização da membrana plasmática das bactérias, causando o vazamento dos componentes celulares levando a célula bacteriana à morte (BURT, 2004).

A alta sensibilidade e o forte odor característico dos óleos essenciais dificultam sua utilização em alimentos, pois é necessário utilizar grandes quantidades desses compostos para obter efeito bactericida, afetando as características sensoriais do alimento (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009). Neste sentido, muitos estudos estão adicionando como antimicrobianos em alimentos compostos extraídos dos óleos essenciais, tais como carvacrol, piperina, timol e outros (AZEREDO *et al.*, 2011; CALO *et al.*, 2015; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ; AMODIO; COLELLI, 2017; SOUZA *et al.*, 2016).

3.5.1 Carvacrol

O carvacrol é um fenol monoterpênóide presente nos óleos essenciais de diversas plantas aromáticas, principalmente orégano e tomilho. Esse composto apresenta atividade antibacteriana contra patógenos alimentares (Gram-positivos e Gram-negativos), fungos filamentosos e leveduras, além de possuir baixa toxicidade para humanos e ser considerado uma substância GRAS pelo FDA (BURT, 2004; CHANG *et al.*, 2017; MILADI *et al.*, 2016).

O carvacrol, por ser um composto altamente lipofílico, age na membrana celular dos microrganismos, alojando-se entre os ácidos graxos da cadeia, causando desestabilização de sua estrutura com posterior ruptura e vazamento dos íons K^+ e H^+ , causando morte celular (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; PASQUA, DI *et al.*, 2007; ULTEE; KETS; SMID, 1999).

Carvacrol já foi testado contra microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e esporulados como *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* demonstrando inibir o crescimento destas estirpes

(ESPINA *et al.*, 2017; GENDY *et al.*, 2015; SIVROPOULOU *et al.*, 1996; ULTEE; KETS; SMID, 1999). Também demonstra atividade contra biofilmes formados por *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* (CAMPANA, R.; BAFFONE, W., 2018). Apesar destas propriedades promissoras, a alta volatilidade, a baixa solubilidade em água e a suscetibilidade a degradação por agentes físicos (luz UV, temperatura) e químicos (ar, pH, umidade), podem comprometer a atividade biológica do carvacrol, fomentando assim o estudo sobre novas formas de aplicação e de proteção deste composto ativo.

3.6 Nanoencapsulação

A nanoencapsulação é uma técnica na qual uma substância ativa é revestida por um agente encapsulante formando uma cápsula com dimensões nanométricas (FREIXO, 2013). Segundo a IUPAC (União Internacional da Química Pura e Aplicada) as nanocápsulas devem ter dimensões entre 1 nm e 100 nm (1 nm equivale a 10^{-9} m), porém para nanopartículas utilizadas nas áreas farmacêuticas e biomédicas a faixa de tamanho é mais ampla, variando entre 5 e 1000 nm (FARAJI; WIPF, 2009; LEE; YUN; PARK, 2015; NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2014). Diversos autores consideram que o princípio a ser utilizado para caracterizar nanopartículas não deve ser unicamente seu tamanho, mas as propriedades que o material apresenta (LEE; YUN; PARK, 2015; LEE; PARK, 2015; VERT *et al.*, 2012). As propriedades das nanopartículas ocorrem devido à sua elevada área superficial; pois a grande quantidade de átomos e moléculas em sua superfície torna os nanomateriais mais reativos do que os mesmos materiais em escala macrométrica (LEE; PARK, 2015).

Atualmente as indústrias que mais utilizam as técnicas de nanoencapsulação são as indústrias farmacêuticas e de alimentos (PAULO; SANTOS, 2017). Na indústria de alimentos a nanoencapsulação é utilizada para encapsulação de compostos bioativos como vitaminas, antioxidantes e aromatizantes, visando diminuição da volatilidade e liberação controlada dos materiais encapsulados (LEE *et al.*, 2017). Além disso, estão ocorrendo diversas pesquisas testando o uso de nanopartículas como agentes antimicrobianos (ENGEL *et al.*, 2017; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ; AMODIO; COLELLI, 2017; PISOSCHI *et al.*, 2018).

Os nanomateriais mais estudados para aplicação em alimentos são nanoemulsões, nanopartículas metálicas produzidas por síntese verde, nanofibras, nanopartículas poliméricas

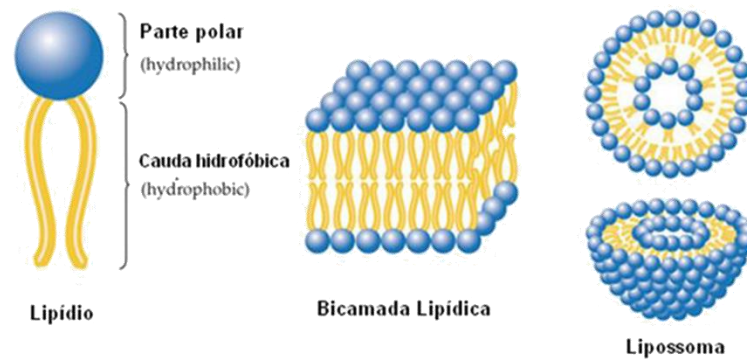
e nanolipossomas (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; JAGADISH *et al.*, 2018; LOPES; PINILLA; BRANDELLI, 2017; SRIVIDYA; GHOORA; PADMANABH, 2017).

3.6.1 Nanolipossomas

Nanolipossomas são um dos sistemas mais estudados para encapsulação de compostos bioativos, pois podem ser fabricados a partir de componentes atóxicos e usando métodos simples (MOZAFARI; JOHNSON; HATZIANTONIOU, 2008; NEGI, 2012). Lipossomas, independentemente de seu tamanho, são estruturas coloidais compostas por um núcleo interno aquoso e uma membrana formada por auto associação de moléculas fosfolipídicas em bicamadas (Figura 1). Seu mecanismo de formação baseia-se principalmente nas interações desfavoráveis que ocorrem entre as moléculas de água e os fosfolipídios, onde os grupos polares finais dos fosfolipídios são expostos à fase aquosa e as caudas de hidrocarbonetos, que são hidrofóbicas, são forçadas a formar uma bicamada (JESORKA; ORWAR, 2008). Devido ao mecanismo descrito acima, os fosfolipídios formam vesículas fechadas, ocorrendo, nesta fase, a encapsulação de solutos presentes no meio aquoso (MALHEIROS, 2011). Como os lipossomas formados apresentam fase aquosa e lipídica podem ser encapsulados materiais hidrossolúveis (imobilizados no núcleo), lipossolúveis (imobilizados na membrana fosfolipídica) ou anfifílicos (imobilizados simultaneamente no núcleo e na membrana fosfolipídica). Como o carvacrol é um composto lipossolúvel, sua encapsulação ocorre na membrana fosfolipídica (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; MOZAFARI; JOHNSON; HATZIANTONIOU, 2008). Para reduzir o lipossoma para tamanho nanométrico é necessário a utilização de técnicas como extrusão ou ultrassom (BARBA *et al.*, 2014).

Os lipossomas estão sendo estudados para aplicação na indústria de alimentos em encapsulação e liberação de enzimas, vitaminas, antioxidantes, aromatizantes e compostos bioativos devido à sua capacidade de proteger o material encapsulado das diversas mudanças químicas e enzimáticas às quais é submetido, incluindo mudanças de temperatura e pH extremos e por apresentarem baixa toxicidade e serem biodegradáveis (SANT'ANNA; MALHEIROS; BRANDELLI, 2011).

Figura 1. Representação esquemática de lipossoma



Fonte: www.speechfoodie.com

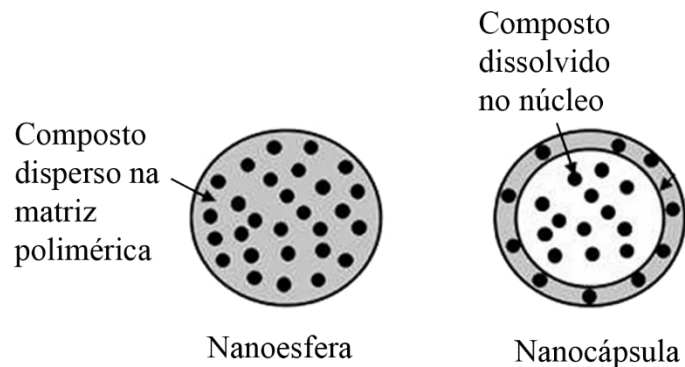
As principais vantagens da utilização de lipossomas em relação a outras tecnologias de encapsulação é que eles são biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade pois são formulados a partir de fosfolipídios naturais e, além disso, protegem os compostos encapsulados de inativação e dissolução em aplicações com alta atividade de água, comuns na indústria de alimentos (DESAI; PARK, 2005; HUA; WU, 2013; SERCOMBE *et al.*, 2015).

3.6.2 Nanopartículas Poliméricas

O tipo de nanopartículas mais utilizadas na indústria farmacêutica são as nanopartículas poliméricas devido a características como estabilidade em ambientes aquosos e liberação controlada da substância encapsulada (MOHAMMADI, G. *et al.*, 2017; SCHAFFAZICK, S. *et al.*, 2003). Conforme demonstrado na Figura 2 tais nanoestruturas podem apresentar-se como nanoesferas, nas quais o composto ativo encontra-se adsorvido na superfície polimérica da esfera ou em seu interior ou como nanocápsulas, onde o composto ativo encontra-se dissolvido em núcleo oleoso no interior da partícula polimérica (REIS *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A cinética e o mecanismo de liberação dos compostos nanoencapsulados dependem do polímero utilizado como encapsulante (OLIVEIRA; LIMA, 2006). Os polímeros utilizados para a formulação das nanopartículas podem ser naturais ou sintéticos, dependendo da característica desejada para a nanopartícula (MOHAMMADI *et al.*, 2017). Os polímeros naturais mais utilizados são alginato de sódio, albumina e quitosana. Já os polímeros sintéticos mais utilizados são poliácido lático (PLA), policaprolactona (PCL) e copolímeros do ácido metacrílico, como o Eudragit (MOHAMMADI *et al.*, 2017; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Figura 2. Representação esquemática de nanoesfera e nanocápsula



Adaptado de Schaffazick et al. (2003)

3.6.2.1 Eudragit®

Utilizados para revestimento de comprimidos desde a década de 50 os copolímeros de ácido metacrílico foram registrados sob a marca Eudragit no ano de 1954. Eudragit é um dos polímeros mais utilizados pela indústria farmacêutica nos dias atuais devido à diversidade de tipos disponíveis, escolhido conforme as propriedades físico-químicas do medicamento e processo de produção utilizado. É considerado seguro para ingestão humana até a dose de 2 mg/kg de peso corpóreo (PATRA *et al.*, 2017).

Estudos comprovam que o Eudragit é um dos materiais mais utilizados pela indústria farmacêutica para revestimento de comprimidos, sendo portanto um material não-tóxico para ingestão humana, além de ser biodegradável e apresentar capacidade de intumescimento, facilitando assim a liberação do composto contido em seu interior quando a nanocápsula é hidratada (OLIVEIRA; LIMA, 2006).

A escolha do tipo de Eudragit a ser utilizado deverá se basear no mecanismo de liberação desejada, rápida ou lenta, e ao ambiente a que a nanocápsula será submetida (pH, umidade, temperatura) (GOMES, G. S. *et al.*, 2017; OLIVEIRA; LIMA, 2006; TANG, J. *et al.*, 2011).

O Eudragit RS 100, polímero escolhido para esse trabalho, é um copolímero catiônico, biodegradável, composto por ácido metacrílico e metil metacrilato, contendo entre 4 e 8 % de amônio quaternário em sua fórmula. Possui carga positiva, baixa permeabilidade à água, capacidade de intumescimento em ampla faixa de pH e formação de grande número de poros na superfície da nanocápsula, propiciando liberação do composto encapsulado por difusão (KIM; PARK, 2010; MOHAMMADI *et al.*, 2017).

3.7 Microrganismos de interesse

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) estão relacionadas à ingestão de água ou alimentos contaminados, devido à presença de microrganismos e/ou suas toxinas. Existem mais de 250 tipos de DTA conhecidas, a maioria causada por bactérias, vírus ou parasitas e relacionadas, principalmente, a falhas durante o processamento e manipulação dos alimentos. Os principais sintomas de DTA são náuseas, vômitos e diarreia, acompanhadas ou não de febre, porém podem evoluir para perdas de funções vitais e morte, afetando principalmente crianças, idosos e imunodeprimidos (BRASIL, 2018; EFSA, 2018; SCALLAN *et al.*, 2011)

Dentre as bactérias que mais causam surtos alimentares no Brasil estão *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (BRASIL, 2018). Além disso, a legislação determina que, para a avaliação antimicrobiana de um sanitizante utilizado na indústria alimentícia e afins, devem ser utilizados como microrganismos teste *Salmonella choleraesuis*, *E. coli* e *S. aureus* (BRASIL, 2007). Já *Listeria monocytogenes* é uma bactéria que desperta preocupação, pois apresenta alta taxa de letalidade, em torno de 30 % dos casos (EFSA, 2018) e nos últimos anos ocorreram diversos surtos de listeriose no Brasil (embora não registrados) e no mundo (SOUTH AFRICA, 2018; EFSA, 2018).

3.7.1 *Salmonella*

Salmonella spp. pertencem à família *Enterobacteriaceae*, apresentam-se na forma de bacilos Gram-negativos, possuem mecanismos de fixação por fímbrias, são microrganismo anaeróbio facultativos, possuindo temperatura ótima de crescimento a 37 °C. São encontradas no trato intestinal do homem e animais, principalmente aves (MILAN; TIMM, 2015). São responsáveis por grande parte dos surtos alimentares que ocorrem no mundo e também no Brasil, principalmente *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis (BRASIL, 2018; EFSA, 2018).

Os principais alimentos envolvidos com salmoneloses são as preparações a base de ovos, principalmente maionese caseira, porém diversos outros alimentos com alto teor de umidade, proteína e carboidratos são suscetíveis à contaminação por *Salmonella* como carne bovina, aves, leite, frutos do mar e também frutas e vegetais (MALHEIROS *et al.*, 2007; SHINOHARA *et al.*, 2008).

Apresentam grande capacidade de formar biofilme e alta resistência a antimicrobianos, embora ainda não estejam claros como atuam seus mecanismos de resistência (FRANK; CHMIELEWSKI, 1997; YANG, Y. *et al.*, 2016). Possuem em sua membrana externa um lipopolissacarídeo que auxilia na fixação inicial da bactéria em superfícies hidrofóbicas como o aço inoxidável (BOWER; MCGUIRE; DAESCHEL, 1996) e fímbrias agregativas, estruturas que unem a célula bacteriana à superfície firmemente, dificultando a remoção dos biofilmes formados (MILAN; TIMM, 2015).

Dentre os sorovares de *Salmonella*, a legislação determina que os sanitizantes utilizados na área de alimentos tenham capacidade para inativar *S. choleraesuis*. Provavelmente a escolha desse sorovar deva-se à virulência apresentada por esse microrganismo que, juntamente com *Salmonella Dublin*, podem causar em crianças e pacientes imunodeprimidos um quadro septicêmico muito mais grave do que o causado por *Salmonella Typhi* (BRASIL, 2011).

3.7.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertencem à família *Micrococcaceae*, apresentam-se na forma de cocos Gram-positivos, agrupados em pares, cadeias curtas ou aglomerados em forma de cacho de uva. São imóveis, não esporulados e produtores de enterotoxina. *S. aureus* é um microrganismo Gram-positivo, catalase positivo, oxidase negativo e mesófilo, com temperatura ótima de crescimento a 35 °C. Estão presentes na pele, cabelo e cavidade nasal do homem, estando presente em torno de 30% da população, sendo esses indivíduos assintomáticos (OLAIMAT *et al.*, 2017), porém ao manipularem os alimentos sem os cuidados necessários podem tornar-se fonte de contaminação.

Os principais alimentos envolvidos em surtos são produtos à base de ovos, leite, carnes e açúcar (ANDRADE, 2008), porém podem sobreviver em alimentos com baixa atividade de água ($a_w \approx 0,85$) (OLAIMAT *et al.*, 2017).

Os surtos que ocorrem devido à contaminação por *Staphylococcus aureus* acontecem devido falhas na manipulação após o processamento e armazenamento em temperaturas inadequadas, pois estas condições são ideais para formação de sua enterotoxina, que não é degradada por tratamento térmico (OLAIMAT *et al.*, 2017). *Staphylococcus aureus* tem capacidade para sobreviver em ambientes diversos e de formar biofilmes em equipamentos e superfícies de contato com alimentos (ARGUDÍN *et al.*, 2012) devido à presença de adesina

intracelular polissacarídica (PIA), uma proteína com grande poder de aderência a superfícies (LIRA *et al.*, 2016).

3.7.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertence à família das *Enterobacteriaceae*, apresenta-se na forma de bacilos Gram-negativos, não esporulada, capaz de fermentar glicose com produção de gás e ácido e possuem temperatura ótima de multiplicação entre 35 e 40 °C. Sua presença em água ou alimentos é o principal indicador de contaminação fecal, pois é encontrada no intestino humano e de animais de sangue quente (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A maioria das cepas não representa perigo para o hospedeiro, porém algumas cepas apresentam altos graus de virulência, entre elas a *E. coli* O157:H7, um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos (CARVALHO; MITTELSTAEDT, 2006).

Os principais alimentos envolvidos em surtos decorrentes de contaminação por *E. coli* são leite cru, laticínios, água, sucos de frutas, vegetais consumidos crus e, principalmente carne bovina mal cozida (ANDRADE, 2008). Em vegetais e frutas a contaminação por *E. coli* pode estar associada a contaminação da água de irrigação por fezes de animais, manuseio inadequado ou higienização deficiente (LIU, C.; HOFSTRA; FRANZ, 2013)

Escherichia coli produz diferentes tipos de adesinas e apresenta fímbrias (estruturas responsáveis pela fixação em superfícies), facilitando assim o processo de adesão bacteriana, ou seja, a primeira etapa na formação de biofilmes (LIMA; CABRAL; SILVA, T., 2015). Esta bactéria é encontrada frequentemente em biofilmes em indústrias produtoras de laticínios e ovos (SHI, X.; ZHU, 2009).

3.7.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um bastonete Gram-positivo, que não produz toxina nem produz esporos, é capaz de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração e também em presença ou ausência de oxigênio (ANDRADE, 2008; CESARE *et al.*, 2018). Essa bactéria pode sobreviver e se multiplicar em condições ambientais diversas, causando uma séria doença chamada listeriose, que apresenta alta taxa de hospitalização e letalidade, podendo alcançar 30% de mortes, afetando principalmente idosos, gestantes e seus bebês e imunodeprimidos (ECDC & EFSA, 2018; SLEATOR; CLIFFORD; HILL, 2007). É uma doença que possui longo

tempo de incubação, portanto difícil de rastrear o alimento causador. Pacientes com listeriose muitas vezes apresentam também meningite, septicemia e outras doenças do sistema nervoso e em gestantes pode causar aborto (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

Os principais alimentos envolvidos em surtos decorrentes de contaminação por *L. monocytogenes* são leite e laticínios, carnes, salsichas, hambúrguer, produtos marinados, peixes curados e vegetais (JAMALI; CHAI; THONG, 2013)

A maneira mais comum de ocorrer transmissão de *L. monocytogenes* é através de alimentos contaminados (RAMASWAMY *et al.*, 2007), porém apresenta capacidade de formar biofilmes em superfícies de contato com alimentos (GANDHI; CHIKINDAS, 2007) e tolerar condições ambientais diversas, sendo bastante encontrado em áreas de processamento de alimentos (CHATURONGAKUL *et al.*, 2008).

CAPÍTULO 2 - ARTIGOS

4 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia e os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos a serem submetidos para publicação em periódicos especializados. Cada subtítulo desse capítulo corresponde a uma publicação

4.1 ARTIGO 1

Antimicrobianos naturais nanoparticulados para desinfecção de superfícies de contato com alimentos

Artigo submetido para publicação no periódico *Trends in Food Science & Technology* após formatação e tradução para o inglês.

4.2 ARTIGO 2

Encapsulação de carvacrol em nanolipossomas e nanocápsulas poliméricas: comparação das características físico-químicas e ação antimicrobiana contra bactérias aderidas em aço inoxidável

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Food Microbiology* após formatação e tradução para o inglês.

4.1 ARTIGO 1

ANTIMICROBIANOS NATURAIS NANOPARTICULADOS PARA DESINFECÇÃO DE SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS

Fabiola Ayres Cacciatore^a, Adriano Brandelli^a, Patrícia da Silva Malheiros^a

^a Departamento de Ciência de Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos - ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS - Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale – Prédio 43212 – CEP 91501-970 - Porto Alegre/RS/Brasil

RESUMO: A garantia da segurança dos alimentos é um dos grandes desafios da indústria de alimentos e serviços de alimentação, pois os equipamentos e superfícies utilizados nesse segmento são muito suscetíveis ao desenvolvimento de biofilmes, que muitas vezes são de difícil remoção. A higienização é uma das etapas mais importantes dentro das Boas Práticas de Fabricação (BPF) para a manutenção da segurança dos alimentos, sendo realizada através da utilização de detergentes e sanitizantes químicos. Entretanto, atualmente existe uma grande demanda dos consumidores pela utilização de produtos naturais. Diversas substâncias de origem vegetal, animal ou microbiana apresentam atividade antibacteriana contra os principais patógenos alimentares, demonstrando grande potencial para utilização na indústria de alimentos. Porém, algumas desvantagens como alta volatilidade, sabor e/ou gosto residual e degradação por exposição a condições extremas de pH ou temperatura têm sido descritas. A encapsulação em nanopartículas surge como uma alternativa para proteger os compostos bioativos, mantendo sua atividade antimicrobiana e proporcionando liberação controlada. Este artigo apresenta a importância da prevenção de biofilmes no setor de alimentos, as fases pelas quais o biofilme passa durante sua formação e a maneira como a higienização deve ser realizada. Em seguida são relatadas as vantagens da utilização de sanitizantes baseados em antimicrobianos naturais encapsulados em matrizes atóxicas.

Palavras-chave: desinfetante; nanotecnologia; segurança de alimentos; higienização; antimicrobianos naturais

1. INTRODUÇÃO

Nanotecnologia é uma área interdisciplinar de pesquisa, desenvolvimento e fabricação de estruturas que possuam ao menos uma dimensão entre 1 e 100 nm (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2014). Porém, para as áreas farmacêutica e biomédica são consideradas de dimensão nanométricas partículas com tamanho até 1000 nm, desde que apresentem propriedades físicas, químicas e biológicas diferentes das propriedades do mesmo material em escala macro (LEE; YUN; PARK, 2015). Devido a suas características únicas as nanopartículas estão cada vez mais presentes em produtos de consumo de diversos segmentos, como roupas, plásticos, suplementos dietéticos, produtos de higiene pessoal e de limpeza do ambiente (ROGERS *et al.*, 2018; TULVE *et al.*, 2015; WASUKAN *et al.*, 2015). O Projeto sobre Nanotecnologias Emergentes (PEN), uma iniciativa do governo dos Estados Unidos para mapear os produtos que utilizam nanotecnologia, bem como seus riscos para saúde e o meio ambiente, possui atualmente em sua base de dados mais de 1.600 produtos cadastrados. Na categoria limpeza de ambientes, estão cadastrados 147 produtos, sendo a grande maioria composta por produtos contendo nanopartículas de prata ou dióxido de titânio (disponível em <http://www.nanotechproject.org>). Entretanto, estudos demonstram que muitas nanopartículas metálicas apresentam toxicidade para humanos, gerando um impasse para sua utilização em superfícies que entram em contato com alimentos (BAHADAR *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2017).

Nas indústrias de alimentos um dos processos mais importantes para garantir a segurança dos alimentos é a higienização, composta por duas etapas: limpeza e desinfecção. Limpeza consiste na remoção de resíduos orgânicos de uma superfície através do uso de detergentes e desinfecção consiste na redução da quantidade de microrganismos presentes nestas superfícies a níveis compatíveis com a produção de alimentos seguros, realizada através do uso de sanitizantes (BERNARDI *et al.*, 2018; SIMÕES, M.; SIMÕES, L.; VIEIRA, 2010; SREY; JAHID; HA, 2013).

A maioria dos sanitizantes utilizados atualmente nas indústrias de alimentos são produtos químicos, sendo que alguns tipos representam risco para o trabalhador, para o ambiente e/ou para o consumidor; além de contribuir para o desenvolvimento de mecanismos de resistência nos microrganismos (BRIDIER *et al.*, 2015; FALCÓ *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2017). Nos últimos anos, os consumidores mostram-se muito preocupados com a utilização de produtos químicos em alimentos ou superfícies de contato com alimentos buscando por ativos

fabricados à base de produtos naturais (FALCÓ *et al.*, 2018; SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

Neste contexto, esta revisão foca em antimicrobianos naturais que possam ser utilizados como sanitizantes alternativos para uso em equipamentos e superfícies nas indústrias de alimentos e serviços de alimentação. Além disso, este artigo também destaca a relação entre antimicrobianos naturais aliados à nanotecnologia visando uma ação mais eficiente contra os microrganismos e liberação controlada de compostos encapsulados em matrizes não tóxicas.

2. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS

A contaminação microbiana é um grande desafio para a segurança de alimentos, principalmente os biofilmes, pois 80% dos microrganismos encontrados na indústria estão organizados desta forma (BOTTICELLA *et al.*, 2013). A formação de biofilmes é uma alternativa para que haja crescimento microbiano em condições de limitação de nutrientes ou em outras condições hostis para o crescimento microbiano (COSTERTON *et al.*, 1987; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

Os biofilmes se formam em superfícies com resíduos alimentares devido a falhas no procedimento de higienização, erro de projeto no design higiênico de equipamentos ou escolha equivocada de materiais para superfícies que entrem em contato com alimentos (KASNOWSKI *et al.*, 2010). As principais superfícies encontradas em indústria de alimentos e serviços de alimentação são borracha, alumínio, polímeros, vidro e aço inoxidável (WANG *et al.*, 2013). Os materiais hidrofóbicos, como os polímeros, permitem maior aderência microbiana do que os hidrofílicos como vidro e aço inoxidável (TEIXEIRA; RODRIGUES, 2015).

Quando os biofilmes se formam nessas superfícies de processamento de alimentos podem causar perda de qualidade e diminuição da vida útil dos produtos, bem como doenças na população, pois são formados por associações entre microrganismos deteriorantes e patogênicos (MILLEZI *et al.*, 2012). Os principais microrganismos deteriorantes presentes em biofilmes são *Pseudomonas* spp., *Micrococcus* spp., *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus* spp. (DALLA COSTA *et al.*, 2016; GIAOURIS, E. *et al.*, 2014). Dentre os microrganismos patogênicos destacam-se *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp. e *Staphylococcus* spp., (BRIDIER *et al.*, 2015; SREY; JAHID; HA, 2013).

Os biofilmes são sistemas biológicos, compostos por uma ou mais espécies de microrganismos, onde as células são organizadas de maneira funcional, aderidas a uma superfície e entre si através de uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) (BJARNSHOLT, 2013; JING; SAHLE-DEMESSIE; SORIAL, 2018). Os biofilmes apresentam-se como estruturas tridimensionais complexas, contendo, em seu interior, canais para fluxo de água, nutrientes e metabólitos (SATPATHY *et al.*, 2016). Dependendo do ambiente em que o biofilme se desenvolve, materiais não celulares como cristais minerais, partículas de corrosão e contaminantes podem ser encontrados na matriz de polissacarídeos (MERINO, L. *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de biofilmes em superfícies é um processo dinâmico composto de 5 etapas: (i) fixação inicial, (ii) adesão irreversível, (iii) formação de microcolônias (maturação I), (iv) maturação II e (v) dispersão. A Figura 1 apresenta as diferenças estruturais do biofilme em cada um dos estágios de seu desenvolvimento.

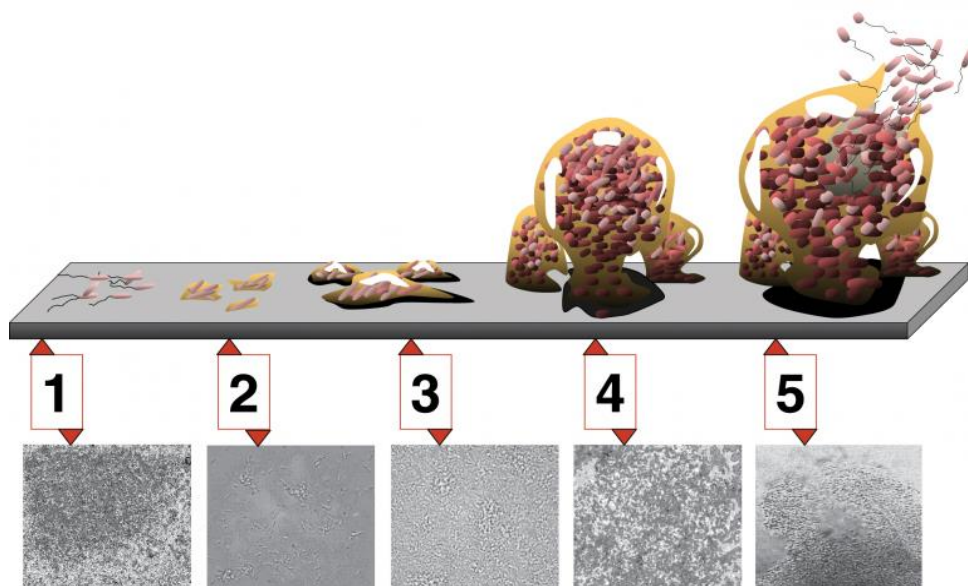


Figura 1. Os 5 estágios do desenvolvimento de biofilme.

Fotomicrografias do desenvolvimento de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

(1) Adesão inicial (reversível); (2) Adesão irreversível; (3) Maturação I; (4) Maturação II; (5) Dispersão. Reprodução de Monroe (2007) com permissão.

Na etapa inicial ocorre a adesão reversível. Nessa fase, as células bacterianas estão distantes da superfície mais de 50 nm e a força de adesão depende das propriedades da superfícies tais como hidrofobicidade, carga superficial e textura (KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; SREY; JAHID; HA, 2013). A adesão será facilitada se a superfície apresentar resíduos

alimentares ou de matriz de exopolissacarídeos, provenientes de falhas no processo de higienização (DALLA COSTA *et al.*, 2016; SREY; JAHID; HA, 2013). Nesta etapa a adesão pode ser passiva, ocorrendo através da força gravitacional, forças eletrostáticas e de Van der Waals, ou ativa, onde as fímbrias e flagelos desempenham papel fundamental na adesão à superfície (KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; MERINO, L. *et al.*, 2017; SREY; JAHID; HA, 2013).

A próxima etapa é caracterizada por ligações polares entre as células e a superfície, devido à proximidade entre elas (distantes 5 nm) além da formação de adesinas na superfície das células, que tornam a ligação do biofilme com a superfície mais forte (KOCOT; OLSZEWSKA, 2017). Após essa segunda etapa, a adesão torna-se irreversível e o biofilme somente poderá ser removido através da aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, sanitizantes e/ou aplicação de calor (AUGUSTIN; ALI-VEHMAS; ATROSHI, 2004; SINDE; CARBALLO, 2000).

Na terceira etapa (maturação I) inicia-se a produção de exopolissacarídeos, fortalecendo a ligação das células entre si e com a superfície, além de proteger o biofilme de condições ambientais adversas (SREY; JAHID; HA, 2013). Ocorre também o início da comunicação intercelular (quorum sensing, QS) facilitando assim a adesão de novas células planctônicas ao biofilme e a formação das micro colônias (KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; MIAO *et al.*, 2017). O QS desempenha um papel fundamental na formação de biofilmes, através da regulação da expressão gênica das bactérias conforme o monitoramento da densidade populacional. Quando a sinalização atinge um nível crítico os microrganismos agem como um único organismo multicelular, ativando ou suprimindo genes conforme a necessidade, visando a sobrevivência da população. O mecanismo de QS também é fundamental para a maturação e dispersão do biofilme (MIAO *et al.*, 2017; MIZAN; JAHID.; HA, 2015; VASUDEVAN, 2014).

A quarta etapa (maturação II) ocorre em torno de 10 dias após o início da formação do biofilme. Neste momento o biofilme apresenta uma estrutura tridimensional (plana ou em forma de cogumelo), com uma arquitetura complexa contendo canais e poros para transporte de água, nutrientes, metabólitos e moléculas sinalizadoras do QS. A forma tridimensional do biofilme depende da fonte de nutrientes e do tipo de microrganismo presente (MOORMEIER; BAYLES, 2017; SREY; JAHID; HA, 2013; WHITEHEAD; VERRAN, 2015). Nesta etapa o biofilme apresenta três áreas distintas: superfície, interior e base, onde as bactérias apresentam características distintas conforme a área em que estão localizadas. As bactérias da superfície são responsáveis pela formação da matriz de EPS, que possui grande resistência a

antimicrobianos além de funcionar como uma barreira física. Já as bactérias presentes no interior do biofilme são responsáveis por manter a estrutura tridimensional do biofilme e as da base são responsáveis por manter a adesão à superfície através de pili, fímbrias e flagelo (HEACOCK-KANG *et al.*, 2017).

A etapa 5, dispersão, é a finalização do ciclo do biofilme. Diversos fatores podem ser responsáveis pelo início desta etapa, tais como: falta de nutrientes, excesso de metabólitos, superpopulação, condições ambientais extremas ou degradação da matriz de EPS. Quando o stress é muito grande, as células destacam-se do biofilme, retomam sua forma planctônica e buscam um local com condições apropriadas para o desenvolvimento de um novo biofilme (MOORMEIER; BAYLES, 2017; SREY; JAHID; HA, 2013).

As bactérias, quando organizadas em biofilmes, apresentam características fenotípicas diferentes das células planctônicas, além de maior capacidade de troca genética, favorecendo assim sua sobrevivência em ambientes hostis e obtenção de novos genes de virulência (GIAOURIS *et al.*, 2015; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017). A remoção de biofilmes é bastante difícil, pois além das células bacterianas interagirem com os componentes dos resíduos de alimentos (proteínas, carboidratos, gorduras, sais, etc.), aumentando sua adesão à superfície, a matriz de exopolissacarídeos atua como uma barreira física de proteção contra antimicrobianos, ácidos, alta temperatura, radiação ultravioleta e outras modificações ambientais adversas (KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; MIAO *et al.*, 2017; VASUDEVAN, 2014). Portanto, evitar sua formação, ou seja, impedir a adesão inicial das bactérias, é a forma mais eficiente de evitar a contaminação microbiana através de biofilmes (SATPATHY *et al.*, 2016).

3. IMPORTÂNCIA DA HIGIENIZAÇÃO PARA A SEGURANÇA DE ALIMENTOS

Nos últimos anos os consumidores estão aumentando sua consciência sobre a importância de consumir alimentos seguros evitando assim as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) (MENEGARO *et al.*, 2016). Diversos pesquisadores apontam que uma das principais causas das contaminações ocorridas nas indústrias alimentícias sejam devido à presença de biofilmes, pois ocorrem de maneira descontínua e afetam somente porções do lote (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005; SZCZEPANSKI; LIPSKI, 2013). Considerando a higienização como um processo que elimina a microbiota patogênica e deteriorante presente

em equipamentos, sem alterar a qualidade do alimento, esta deve envolver o desenho higiênico de equipamentos, seleção de materiais adequados, e aplicação de agentes sanitizantes.

Para evitar a formação de biofilmes na indústria de alimentos é necessário que, além da utilização de equipamentos e superfícies com design e materiais apropriados, a higienização seja realizada de maneira eficiente, impedindo assim a adesão microbiana às superfícies (SATPATHY *et al.*, 2016). A higienização é composta por duas etapas: (i) limpeza, realizada com o uso de detergentes, visando a remoção de resíduos orgânicos e minerais, tais como poeira, proteínas, lipídios, etc. e (ii) sanitização, realizada com o uso de sanitizantes, visando a redução, a níveis seguros, da população de microrganismos deteriorantes e patogênicos, bem como controle e prevenção da formação de biofilme (FERNANDES *et al.*, 2017; MCDONNELL; RUSSELL, 1999; MENEGARO *et al.*, 2016).

Atualmente na indústria de alimentos são utilizados uma grande variedade de desinfetantes químicos, que são classificados em três principais grupos, conforme seu mecanismo de ação: (i) agentes oxidantes (compostos à base de cloro, peróxido de hidrogênio, ozônio e ácido peracético) que inibem a síntese protéica e as enzimas associadas à membrana, causando inativação irreversível, (ii) compostos ativos de superfície (compostos quaternário de amônio e álcoois) que desestabilizam as ligações da membrana celular levando à sua ruptura e (iii) iodóforos, que substituem componentes celulares por iodo, levando à morte celular (FERREIRA *et al.*, 2010; FRAISE; MAILLARD; SATTAR, 2013).

Os sanitizantes mais utilizados são hipocloritos, devido sua eficácia e baixo custo, porém essas substâncias geram corrosão nos equipamentos e superfícies, além de serem potencialmente tóxicos para os trabalhadores e causar contaminação ambiental. Já os sanitizantes a base de quaternário de amônio são biodegradáveis, apresentam menor perigo para os trabalhadores e não corroem os equipamentos, porém não são tão eficientes como os hipocloritos (WANG *et al.*, 2017).

Até o momento os detergentes e sanitizantes utilizados nas indústrias alimentícias são produtos químicos, criando um grande dilema para os fabricantes de alimentos: a necessidade de garantir a segurança do alimento sem afetar o meio ambiente (BRIDIER *et al.*, 2015). A preocupação com o meio ambiente aliada a uma crescente demanda dos consumidores por produtos naturais está propiciando o desenvolvimento de sanitizantes alternativos, produzidos a partir de matéria-prima natural. A substituição dos produtos químicos por naturais deve-se a indícios de que alguns produtos sintéticos podem ser potencialmente carcinogênicos (HRUDEY *et al.*, 2015). Além disso, o uso frequente de antimicrobianos químicos pode ser o

principal fator responsável pelo surgimento de cepas de microrganismos resistentes, tornando a etapa de higienização cada vez mais exigente (WANG *et al.*, 2017).

4. ANTIMICROBIANOS NATURAIS COMO DESINFETANTES

De acordo com a Diretiva 98/8/CE proposta pelo Conselho da União Europeia, biocidas são substâncias que destroem ou impedem o crescimento de um organismo prejudicial através de mecanismos químicos ou biológicos dividindo-se em quatro grupos: desinfetantes, conservantes, substâncias para controle de pragas e outros produtos (EUROPEAN COMMUNITIES, 1998).

Um biocida verde ou ecológico caracteriza-se como uma substância bactericida ou fungicida que mata ou retarda o crescimento do microrganismo causando dano mínimo ou nenhum dano ao meio ambiente (ASHRAF *et al.*, 2014). Para ganhar a denominação de biocida verde (*eco-friendly*) a substância deve ser considerada segura para seres vivos e ambiente, satisfazendo o conjunto de critérios da química verde (TANG *et al.*, 2005).

Diversas substâncias naturais apresentam propriedades antimicrobianas, demonstrando potencial para uso como matéria-prima para o desenvolvimento de sanitizantes alternativos. Alguns antimicrobianos naturais possuem como principais características uma alta eficiência contra patógenos, capacidade de penetração em biofilmes e fácil degradação no meio ambiente. Podem ser encontrados em diversos organismos, tais como plantas, animais, bactérias, algas e fungos. Enquanto os compostos antimicrobianos derivados de plantas, animais e bactérias já foram alvo de diversos estudos, os compostos derivados de algas e fungos começaram a receber maior atenção dos pesquisadores nas últimas décadas (BHAGAVATHY; SUMATHI; JANCY SHERENE BELL, 2011; BRIDIER *et al.*, 2015; COWAN, 1999; GYAWALI; IBRAHIM, 2014; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). A Tabela 1 sumariza alguns exemplos de antimicrobianos naturais avaliados como potenciais sanitizantes.

Tabela 1. Antimicrobianos naturais com potencial uso como sanitizantes

Antimicrobiano natural	Aplicação	Microrganismo alvo	Tempo de contato	Redução microbiana	Referência
Óleo essencial de orégano	Pano umedecido contendo sabão com 0,5 % de óleo essencial de orégano, usado para desinfetar superfícies de aço inoxidável, madeira e plástico	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Tempo para realização do procedimento padronizado de higienização	≈ 2 log UFC/pano (aço, madeira e plástico)	(RHOADES <i>et al.</i> , 2013)
		<i>Escherichia coli</i> O157:H7		≈ 5 log UFC/pano (aço) ≈ 4 log UFC/pano (madeira) ≈ 3.5 log UFC/pano (plástico)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>		≈ 3 log UFC/pano (aço) ≈ 4 log UFC/pano (madeira e plástico)	
		<i>Listeria monocytogenes</i>		≈ 3 log UFC/pano (aço) / ≈ 2 log UFC/pano (madeira e plástico)	

CONTINUA

Antimicrobiano natural	Aplicação	Microrganismo alvo	Tempo de contato	Redução microbiana	Referência
Óleo essencial de <i>Satureja thymbra</i> e hidrossol de <i>S. thymbra</i>	Biofilme aço inoxidável	<i>Salmonella</i> Enteritidis	60 min	> 4 log UFC cm ⁻²	(CHORIANOPOULOS <i>et al.</i> , 2008)
Óleo essencial de <i>Satureja thymbra</i>	Biofilme em filtros de fibra de vidro	<i>Pseudomonas fragi</i>	60 min	Eliminação do biofilme (≈ 8 log CFU/filtro)	(LEBERT; LEROY; TALON, 2007)
		<i>S. aureus</i>		1,3 log UFC/filtro	
		<i>L. monocytogenes</i>		2,5 log UFC/filtro	
Hidrossol de tomilho e alecrim	Maças	<i>E. coli</i> O157:H7	20 min	≈ 1,5 log UFC g ⁻¹	(TORNUK <i>et al.</i> , 2011)
Óleo essencial de tomilho	Alface e cenoura minimamente processados	<i>E. coli</i> O157:H7	5 min	1,48 –1,97 log UFC g ⁻¹	(SINGH, <i>et al.</i> , 2002)

CONTINUA

Antimicrobiano natural	Aplicação	Microrganismo alvo	Tempo de contato	Redução microbiana	Referência
Óleo essencial de <i>Cymbopogon (C.) nardus</i>	Aço inoxidável	<i>L. monocytogenes</i>	60 min	4,89 log UFC cm ⁻²	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2010)
				5,64 log UFC cm ⁻²	
Extrato de chá verde	Aço inoxidável	Vírus da Hepatite A	30 min	≈ 4 log UFC cm ⁻²	(RANDAZZO <i>et al.</i> , 2017)
	Vidro			≈ 3 log UFC cm ⁻²	
Óleo essencial de <i>Thymbra capitata</i> contendo até 93,31% de monoterpenos oxigenados (principalmente carvacrol)	Aço inoxidável	<i>E. coli</i>	10 min	≈ 3 log UFC cm ⁻²	(FALCÓ <i>et al.</i> , 2018)
	Vidro Polipropileno	<i>Salmonella</i> Enterica		≈ 1 log UFC cm ⁻²	

CONTINUA

Antimicrobiano natural	Aplicação	Microrganismo alvo	Tempo de contato	Redução microbiana	Referência
Nisina	Erva-doce recém cortada	Mesófilos	4 min	0,5 log UFC g ⁻¹	(MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2017)
		Enterobactérias		0,6 log UFC g ⁻¹	
		Fungos e leveduras		1,1 log UFC g ⁻¹	
Lactoferrina	Mesófilos	0,8 log UFC g ⁻¹			
	Enterobactérias				
		Fungos e leveduras			
Óleo essencial de manjerona e tomilho	Biofilme em polipropileno	<i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i>	10 min	Eliminação do biofilme (3,7 – 4,7 log UFC cm ⁻²)	(VIDÁCS <i>et al.</i> , 2018)
Lipossomas contendo carvacrol e timol combinados	Aço inoxidável	<i>S. aureus</i>	10 min	≈ 6 log UFC cm ⁻²	(ENGEL <i>et al.</i> , 2017)
		<i>S. Enteritidis</i>			

CONTINUA

Antimicrobiano natural	Aplicação	Microrganismo alvo	Tempo de contato	Redução microbiana	Referência
Nanopartículas de quitosanas contendo carvacrol	Cenouras recém cortadas	Mesófilos	4 min	1,6 – 2,1 log UFC g ⁻¹	(MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ; AMODIO; COLELLI, 2017)
		Psicrófilos		0,4 log UFC g ⁻¹	
		Enterobactérias		Sem redução	
		Fungos e leveduras		1.7 log UFC g ⁻¹	
		Bactérias ácido-láticas		5 log UFC g ⁻¹	
Óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> e <i>Cymbopogon citratus</i>	Biofilme em aço inoxidável	<i>S. Enteritidis</i>	20 min	Eliminação do biofilme ($\approx 7 \log \text{ UFC cm}^{-2}$)	(VALERIANO <i>et al.</i> , 2012)

CONTINUA

Antimicrobiano natural	Aplicação	Microrganismo alvo	Tempo de contato	Redução microbiana	Referência
Carvacrol	Biofilme em aço inoxidável	<i>E. coli O157:H7</i>	15 min	≈ 7,5 log UFC cm ⁻²	(CAMPANA; BAFFONE, 2018)
		<i>S. aureus</i>		≈ 6 log UFC cm ⁻²	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		≈ 7,5 log UFC cm ⁻²	
		<i>Enterococcus faecalis</i>		≈ 5 log UFC cm ⁻²	
		<i>Candida albicans</i>		≈ 6 log UFC cm ⁻²	

As maiores fontes de antimicrobianos naturais nos vegetais são as plantas aromáticas e medicinais, das quais são extraídos os óleos essenciais, cuja ação antimicrobiana provém dos compostos fenólicos e demais constituintes hidrofóbicos. Devido à grande diversidade desses compostos em relação à composição química e arranjo estrutural sua ação antimicrobiana pode ser bastante variável (DORMAN; DEANS, 2000; SAVOIA, 2012; STOJKOVIĆ *et al.*, 2013), porém, os óleos essenciais possuem características hidrofóbicas, interagindo com os lipídios da membrana celular, tornando esta estrutura mais permeável (BURT, 2004).

Os óleos essenciais apresentam efeito antibacteriano contra uma ampla gama de microrganismos. Friedman *et al.* (2002) testaram 96 óleos essenciais e 23 compostos isolados desses óleos contra 4 microrganismos: *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* e *L. monocytogenes* e determinaram que os óleos com maior atividade foram variáveis dependendo do microrganismo testado. Quando os testes foram realizados com os compostos isolados os autores verificaram que os 4 compostos mais eficientes contra os 4 microrganismos testados foram cinamaldeído, timol, carvacrol e eugenol. Sokovic *et al.* (2010) testaram óleos essenciais de 10 especiarias muito consumidas na alimentação (laranja-azedo, limão, lavanda, camomila, hortelã-pimenta, hortelã-verde, manjeriço, orégano, tomilho e sálvia) e determinaram que o orégano (*Origanum vulgare*) apresentou maior atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* O157:H7, *Micrococcus flavus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. epidermidis* e *S. aureus*. Outro estudo demonstrou que o óleo essencial de orégano é eficiente também para inibição de *S. aureus* e *L. monocytogenes* em queijo coalho (SOUZA *et al.*, 2016). Conforme Calo *et al.* (2015) a piperina, principal composto extraído da pimenta, apresenta atividade antibacteriana contra *Salmonella*, *S. aureus* e *Bacillus cereus*.

Além das ervas e especiarias, outra fonte de antimicrobianos naturais são os subprodutos vegetais, como bagaço, cascas e sementes de frutas e hortaliças, que possuem altos teores de compostos fenólicos e outros componentes bioativos que, além das propriedades funcionais, apresentam atividade antibacteriana contra uma ampla gama de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Além disso, a extração de antimicrobianos destes subprodutos pode evitar que milhares de toneladas de resíduos vegetais sejam descartados anualmente como lixo (CHANDA; BARAVALLIA; KANERIA, 2007; ENGELS *et al.*, 2009; GYAWALI; IBRAHIM, 2014; TIWARI *et al.*, 2009).

Antimicrobianos naturais também podem ter origem animal. Dentre os compostos mais estudados estão lactoferrina (glicoproteína do leite), quitosana (biopolímero presente no

exoesqueleto de crustáceos e artrópodes), lisozima (enzima presente em ovos), peptídeos da caseína e proteína do soro de leite (presentes no leite) (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

A quitosana é um polissacarídeo biodegradável, encontrado no exoesqueleto de crustáceos e parede celular de fungos, com grande atividade antibacteriana (Gram-negativos e Gram-positivos) e antifúngica. Possui status GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) concedido pelo FDA (*Food and Drug Administration*), sendo muito utilizada em medicamentos, tratamento de água, embalagens de alimentos e também como aditivo alimentar em países como Itália, Finlândia, Japão e Coreia (GARRIDO-MAESTU *et al.*, 2018; KONG *et al.*, 2010; PERINELLI *et al.*, 2018). Conforme Shen (2010) filmes contendo quitosana apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*. Em outros estudos, nanopartículas com quitosana inativaram *E. coli* e *L. monocytogenes* em 6 h e 12 h (SHANKAR; RHIM, 2018) e filmes de quitosana inibiram *Salmonella*, *E. coli* e *L. monocytogenes* (SONI *et al.*, 2018).

A lisozima é uma enzima encontrada em mamíferos, aves e peixes. É um antimicrobiano natural, classificado como GRAS, eficaz contra bactérias Gram-positivas, atuando diretamente no peptidoglicano da parede celular desses microrganismos (LIBURDI *et al.*, 2016; MAGNADÓTTIR, 2006; MURIEL-GALET *et al.*, 2013).

Diversos estudos já foram realizadas para determinar a eficiência desta enzima contra patógenos alimentares. Dehkordi *et al.* (2008) testaram a atividade antimicrobiana de lisozima contra *E. coli* O157:H7 e *S. aureus* em diversos pH e concentrações de NaCl, verificando que a atividade antimicrobiana contra esses microrganismos diminui conforme o pH torna-se mais ácido ou conforme aumenta a concentração de NaCl; quando utilizada em filmes foi eficiente contra *Bacillus subtilis* e *Streptococcus cremoris* (BOWER *et al.*, 2006); e, em combinação com óleo essencial de orégano e alecrim aumentou a vida de prateleira de carne, frango e peru (NTZIMANI *et al.*, 2010).

Alguns microrganismos produzem substâncias com propriedades antimicrobianas, tais como as bacteriocinas, que são peptídeos inibidores de bactérias especialmente Gram-positivas. Destacam-se as bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-lácticas, principalmente nisina, que é aprovada para uso como aditivo alimentar em mais de 50 países (AHMAD *et al.*, 2017; O'CONNOR *et al.*, 2015; OGAKI; FURLANETO, 2015).

Portanto, existem diversos compostos naturais que apresentam efetiva ação antimicrobiana. Porém, estudos avaliando seu potencial como sanificante para alimentos e/ou superfícies que entram em contato com alimentos são relativamente escassos. Neste sentido, a

tabela 1 mostra que os principais antimicrobianos avaliados como sanificantes são os óleos essenciais e seus constituintes. Timol e carvacrol foram os compostos que mostraram maior ação antimicrobiana em menor tempo de ação. Foram eficientes tanto para higienização de vegetais minimamente processados como superfícies (FALCÓ *et al.*, 2018; SINGH, N. *et al.*, 2002; TORNUK *et al.*, 2011). Além disso, apresentam amplo espectro de ação sendo efetivos para inativação de microrganismos em suspensão, aderidos em diferentes superfícies ou associados em biofilmes (CAMPANA; BAFFONE, 2018; ENGEL *et al.*, 2017; VIDÁCS *et al.*, 2018).

5. BACTERIÓFAGOS COMO ANTIMICROBIANOS

Além dos antimicrobianos produzidos por vegetais, animais e bactérias acima descritos, outra alternativa para o desenvolvimento de sanitizantes são os bacteriófagos, que são vírus ubíquos, encontrados no ambiente (solo e água) e também no trato digestivo de humanos. São parasitas obrigatórios que infectam apenas células bacterianas, necessitando de uma bactéria como célula hospedeira para realizar sua reprodução (BREN, 2007; CUI *et al.*, 2018; DONLAN, 2009). São bastante reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas, porém sua especificidade (cada fago é parasita de uma determinada bactéria) é um limitante para sua utilização como agente antibacteriano (EDWARDS *et al.*, 2016; ENDERSEN *et al.*, 2017). Os fagos podem ser utilizados em três momentos durante a cadeia produtiva de alimentos: adicionados às rações dos animais, através de aplicação direta em vegetais pós-colheita ou em superfícies de processamento de alimentos (BHARDWAJ *et al.*, 2015). Na tabela 2 estão apresentados alguns produtos comerciais preparados com fagos destacando a forma de aplicação e tipo de alimento e/ou superfície testados.

Tabela 2: Preparações comerciais de fagos como sanitizantes para aplicação direta em alimentos e/ou em superfícies que entram em contato com alimentos

Preparação comercial contendo fago	Microrganismo alvo	Aplicação	Alimento / superfície	Referência
Salmonex TM	<i>Salmonella</i> Enterica	Adicionado ao alimento	Carne picada Suíno picado Coxa de frango Coxa de peru	YEH <i>et al.</i> , 2017
SalmoFresh TM	<i>Salmonella</i> Enterica sorotipos Kentucky, Brandenburg, Enteritidis, Heidelberg, Typhimurium	Pulverizado na superfície	Superfícies de aço inoxidável e vidro Peito de peru	(WOOLSTON <i>et al.</i> , 2013) (SHARMA, DHAKAL; NANNAPANENI, 2015)
SalmoLyse TM	<i>Salmonella</i> Enterica sorotipos Kentucky Brandenburg Paratyphi	Pulverizado na superfície	Superfícies de aço inoxidável e vidro	(WOOLSTON <i>et al.</i> , 2013)

CONTINUA

Preparação comercial contendo fago	Microrganismo alvo	Aplicação	Alimento / superfície	Referência
Ecoshield® + SalmoFresh™ + ShigActive	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Enterica e <i>Shigella</i> spp.	Pulverizado na superfície	Brócolis, melão e morango	(MAGNONE <i>et al.</i> , 2013)
Ecoshield®	<i>E.coli</i> O157:H7	Pulverizado na superfície	Espinafre e alface	(BOYACIOGLU <i>et al.</i> , 2013)
			Lâminas de vidro e gesso, tomate, espinafre, brócolis e carne moída	(ABULADZE <i>et al.</i> , 2008)
		Pulverizado na superfície e imersão	Alface	(FERGUSON <i>et al.</i> , 2013)
Listshield®	<i>L. monocytogenes</i>	Pulverizado na superfície	Peito de frango	(YANG, S.; SADEKUZZAMAN; HA, S., 2017)

Diversos estudos demonstram a eficiência dos fagos para controle de patógenos em alimentos como *L. monocytogenes* em queijos (CARLTON *et al.*, 2005), *Mycobacterium smegmatis* em leite desnatado (ENDERSEN *et al.*, 2014), *Enterobacter sakazakii* em alimentos infantis (KIM *et al.*, 2007), *Listeria*, *Escherichia*, *Salmonella* e *Campylobacter* em carnes e vegetais (ENDERSEN *et al.*, 2014; GOODRIDGE; BISHA, 2011). Em 2006, foi aprovado, pela primeira vez nos Estados Unidos, o uso de um produto à base de fagos para controle de *L. monocytogenes*, aplicado por aspersão na superfície de carnes e produtos avícolas prontos para o consumo (BREN, 2007). A partir desta data diversos outros produtos contendo fagos foram aprovados naquele país para descontaminação de superfície de alimentos (carnes e vegetais minimamente processados) incluindo preparações contra *E. coli* O157:H7 (ENDERSEN *et al.*, 2014; SULAKVELIDZE, 2011). Fagos também podem ser usados como biossensores para detecção de patógenos em ambientes de processamento de alimentos, apresentando um tempo de resposta muito mais rápido do que os métodos da microbiologia clássica (SINGH; POSHTIBAN; EVOY, 2013).

Preparações com fagos podem ser uma ótima alternativa para descontaminação de superfícies, pois os fagos demonstram atividade antibacteriana principalmente contra patógenos ambientais como *L. monocytogenes*, além de possuírem capacidade de penetrar na matriz de EPS dos biofilmes, eliminando as bactérias presentes nas camadas internas, ao contrário dos sanitizantes químicos, cujo poder de penetração é bastante limitado (CUI *et al.*, 2018; ENDERSEN *et al.*, 2014, 2017; SULAKVELIDZE, 2011).

A atividade antibacteriana dos fagos em superfícies foi estudada por diversos autores, como Rashid *et al.* (2012) que comprovaram a eliminação de *Yersinia pestis* de 3 tipos diferentes tipos de superfície (vidro, gesso e aço inoxidável) após 5 minutos de contato com solução de fagos YPP-100. Da mesma maneira, outro estudo demonstrou que o coquetel de fagos (BEC8) é capaz de eliminar 5 log CFU.mL⁻¹ de *E. coli* O157:H7 aderidos à 3 diferentes superfícies (aço inoxidável, cerâmica e polietileno de alta densidade) após 1 hora de contato à temperatura de 37°C ou após 4 horas de contato à temperatura de 23°C (VIAZIS; LABUZA; DIEZ-GONZALEZ, 2015). Woolston *et al.* (2013) testaram os produtos comerciais Salmofresh™ e SalmoLyze™ contra diversas cepas de *Salmonella* em superfícies de vidro e aço inoxidável obtendo redução significativa de bactérias (2.1 – 4.3 log CFU. mL⁻¹) após 5 minutos de contato.

6. ANTIMICROBIANOS NATURAIS NANOENCAPSULADOS COMO DESINFETANTES ALTERNATIVOS

A nanotecnologia mostra-se com grande potencial para a solução de diversos problemas de segurança de alimentos. A denominação nanotecnologia envolve caracterização, fabricação e manipulação de estruturas que tenham ao menos uma dimensão compreendida entre 1 e 100 nm, porém para nanopartículas utilizadas nas áreas farmacêuticas e biomédicas a faixa de tamanho é mais ampla, variando entre 5 e 1000 nm (FARAJI; WIPF, 2009; LEE; YUN; PARK, 2015; NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2014).

Os nanomateriais podem ser utilizados na manutenção da segurança de alimentos através da aplicação de soluções contendo nanopartículas em superfícies, impedindo assim a adesão de microrganismos patogênicos e deteriorantes nestes locais, em substituição aos sanitizantes químicos (BATA-VIDÁCS *et al.*, 2013; SRIVIDYA; GHOORA; PADMANABH, 2017) ou em embalagens através da utilização de nanocompósitos ou nanosensores. Os nanocompósitos podem melhorar características da embalagem tais como permeabilidade gasosa, resistência mecânica, tração, barreira a umidade, dentre outras (DUNCAN, 2011). Os nanosensores detectam presença de microrganismos contaminantes ou modificações na integridade dos alimentos através dos metabólitos ou gases gerados (DOYLE, 2006; DURAN *et al.*, 2014).

Além disso, a nanotecnologia pode ser usada para inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes através de duas abordagens distintas: (i) um agente antimicrobiano é transformado em um material de tamanho nanométrico (ii) utiliza-se um sistema baseado em nanocarreadores para distribuição de antimicrobianos de tamanho convencional (SRIVIDYA; GHOORA; PADMANABH, 2017). Um dos fatores que favorecem a ação antimicrobiana dos nanomateriais é a diferença de tamanho entre microrganismos (10^{-6} m) e nanopartículas (10^{-9} m) (RAI; BAI, 2011).

A atividade antimicrobiana das nanopartículas depende de diversos fatores: (i) tamanho da nanopartícula, pois quanto menor o tamanho da partícula maior será a capacidade de penetrar através da membrana dos microrganismos (MORONES *et al.*, 2007; RAIMONDI *et al.*, 2005); (ii) forma das nanopartículas, pois quanto mais facetada a partícula, maior sua eficiência antibacteriana devido maior aderência e contato com o microrganismo (MORONES *et al.*, 2007; PAL; TAK; SONG, 2007); (iii) concentração de nanopartículas, pois quanto maior a quantidade de nanopartículas presentes na solução,

maior a eficiência antimicrobiana (MORONES *et al.*, 2007; SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004); (iv) carga elétrica, pois a interação eletrostática é favorecida quando a nanopartícula apresenta potencial zeta positivo devido aos microrganismos apresentarem carga negativa em sua superfície (JIANG; MASHAYEKHI; XING, 2009; ZAND *et al.*, 2012); (v) sensibilidade microbiana às nanopartículas, pois os microrganismos apresentam sensibilidade diferente devido sua morfologia (SANTOS *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2011).

Um sistema baseado em nanocarreadores muito usado em alimentos é a encapsulação de compostos antimicrobianos em matrizes não tóxicas. A encapsulação é uma alternativa para preservar as características do composto bioativo, protegê-lo de condições adversas, além de possibilitar a utilização de pequenas quantidades do composto e proporcionar liberação controlada, mantendo a capacidade antimicrobiana ativa por maior tempo. Em geral, ao realizar uma comparação entre a ação bactericida do antimicrobiano livre e encapsulado nota-se que o antimicrobiano encapsulado inicialmente apresenta menor atividade, porém sua atividade dura por mais tempo que o antimicrobiano livre (WEISS, J. *et al.*, 2009).

Os nanocarreadores mais estudados para aplicação em alimentos são nanoemulsões, nanopartículas metálicas produzidas por síntese verde, nanopartículas poliméricas, nanolipossomas e nanofibras (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; JAGADISH *et al.*, 2018; LOPES; PINILLA; BRANDELLI, 2017; SRIVIDYA; GHOORA; PADMANABH, 2017). Nanoemulsões são dispersões estáveis contendo gotas em tamanho nanométrico, compostas por uma fase aquosa e uma fase oleosa em presença de surfactante, muito utilizada para encapsulação de compostos pouco solúveis em água, como os óleos essenciais e seus compostos (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; DAUDT *et al.*, 2013). Dentre os diferentes sistemas de encapsulamento compatíveis com aplicações em alimentos as nanoemulsões são os sistemas mais utilizados pois proporcionam uma distribuição homogênea de compostos hidrofóbicos em matrizes alimentares hidrofílicas, além de melhor difusividade e menor alteração nas características organolépticas dos alimentos (DONSI *et al.*, 2011; TERJUNG *et al.*, 2012). O uso de nanoemulsões de óleos essenciais em combinação com outras estratégias para diminuição da carga microbiana em alimentos (tecnologia de barreiras), está demonstrando resultados eficientes (PRAKASH *et al.*, 2018; SEVERINO *et al.*, 2014). Em diversos testes realizados as nanoemulsões foram utilizadas principalmente de duas formas: como agente sanitizante durante lavagem de vegetais minimamente processados ou como filmes comestíveis para

revestimento de vegetais *in natura* (BHARGAVA *et al.*, 2015; VU *et al.*, 2011), demonstrando eficiência contra microrganismos patogênicos. Bhargava *et al.* (2015) ao testarem nanoemulsão contendo 0,05% de óleo essencial de orégano como sanitizantes em superfícies de folhas de alface obtiveram redução de 3,44, 3,05 e 2,31 log CFU.g⁻¹ g em *L. monocytogens*, *E. coli* O157:H7 e *S. Typhimurium*, respectivamente, em comparação com o controle. Em estudo similar realizado com lavagem de nanoemulsão de carvacrol ou eugenol em folhas de espinafre ocorreu uma redução de 4,5 log CFU.g⁻¹ de *E. coli* e *S. enterica* (RUENGVISESH *et al.*, 2015). De maneira semelhante, testes utilizando incorporação de nanoemulsões de óleos essenciais em filmes comestíveis demonstraram bons resultados contra microrganismos patogênicos. Acevedo-Fani *et al.* (2015) desenvolveram filme comestível de alginato de sódio contendo nanoemulsão de óleo essencial de tomilho e obtiveram redução de 4,71 log CFU.g⁻¹ de *E. coli* inoculada em placas contendo meio TSA-NaCl. Em outro estudo, ao testar filme comestível de alginato de sódio incorporado com nanoemulsão de óleo essencial de capim-limão os autores verificaram que os níveis de *E. coli* inoculada em maçãs mantiveram-se abaixo do nível de detecção durante 2 semanas (SALVIA-TRUJILLO *et al.*, 2015). Já Kim *et al.* (2013) ao revestirem ameixa com filme de cera de carnaúba contendo nanoemulsão de óleo essencial de capim-limão observaram redução de 2,8 log CFU.g⁻¹ de *Salmonella Typhimurium* e *E. coli* O157: H7.

Nanopartículas metálicas são produzidas a partir da redução de íons metálicos, utilizando processos químicos ou biotecnológicos (nanobiotecnologia verde), que utiliza algas, bactérias, fungos, vírus, leveduras e plantas para gerar materiais não-tóxicos. Nanopartículas metálicas podem ser sintetizadas a partir de metais como ouro, prata, platina, cobre, zinco, etc., sendo utilizadas em diversas aplicações biomédicas, farmacêuticas e alimentos (JAGADISH *et al.*, 2018; RAI, 2013). Destacam-se para aplicações em embalagens ativas para alimentos as nanopartículas de prata, devido a características únicas como biocompatibilidade química e amplo espectro antimicrobiano contra diversas bactérias e fungos (JAGADISH *et al.*, 2018; PRABHU; POULOSE, 2012). Devido aos potenciais riscos causados pela ingestão de nanopartículas de prata que migram das embalagens para alimentos e bebidas existe um grande controle das autoridades de segurança de alimentos, restringindo a utilização comercial deste tipo de embalagem (CARBONE *et al.*, 2016; JAGADISH *et al.*, 2018). Diversos autores pesquisaram sobre a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata contra agentes patogênicos. Metak (2015) comprovou ação bactericida de embalagem de polietileno

contendo nanopartículas de prata e titânio frente *S. aureus*, coliformes, *E. coli* e *Listeria* para preservação de maçã, cenoura, pão, queijo e suco de laranja. Embalagens de EVOH (copolímeros de etileno e álcool vinílico) contendo nanopartículas de prata demonstraram eficiência contra *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* quando testadas com frango, porco, alface, queijo e maçã (MARTÍNEZ-ABAD; LAGARON; OCIO, 2012). Mastromatteo et al. (2015) testaram revestimento de alginato de cálcio contendo nanopartículas de prata em queijo “Fior de latte” contra *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* e *E. coli*, obtendo aumento na *shelf life* do produto.

Nanopartículas poliméricas podem ser de dois tipos: nanoesferas (composto ativo encontra-se adsorvido na superfície polimérica da esfera ou em seu interior, não apresentando óleo em sua composição) e nanocápsulas (composto ativo encontra-se dissolvido em núcleo oleoso no interior da partícula polimérica) (REIS *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O uso de nanopartículas poliméricas é recomendado quando deseja-se liberação lenta do composto ativo (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012). Diversos compostos naturais com ação antibacteriana ou antifúngica já foram encapsulados em nanopartículas apresentando bons resultados contra microrganismos patogênicos. Por exemplo, nanopartículas de PLGA poli(ácido lático-co-ácido glicólico) contendo eugenol e trans-cinnamaldeído inibiram crescimento de *Salmonella* spp e *Listeria* spp em testes *in vitro* (GOMES, C.; MOREIRA; CASTELL-PEREZ, 2011). Anetol e carvone encapsulados em nanoesferas demonstraram maior eficiência do que os mesmo compostos em solução livre contra *S. aureus*, *E. coli* e *S. tiphy* em testes *in vitro* (ESFANDYARI-MANESH *et al.*, 2013) enquanto nanopartículas carregadas com carvacrol demonstraram eficiência em testes *in vitro* contra *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli* (KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011). Zhang et al. (2014) demonstraram que nanopartículas de zeína contendo timol apresentaram maior atividade contra *S. aureus* do que solução livre de timol em testes *in vitro* após 12 horas de contato. Além dos compostos derivados de óleos essenciais também existem diversos estudos testando nanopartículas carregadas com nisina, um peptídeo antimicrobiano produzido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* muito usado na indústria de alimentos como conservante (ERCOLINI *et al.*, 2010). Lv et al.(2014) demonstraram que nisina encapsulada em quitosana apresentou maior eficiência contra *Pseudomonas aeruginosa*, *S. enterica*, *Micrococcus luteus* e *Enterobacter aerogenes* quando comparada a nisina livre. Outros autores encontraram resultados semelhantes (maior eficiência da

nisina encapsulada quando comparada com livre) contra *L. monocytogenes* em testes *in vitro* (PROMBUTARA *et al.*, 2012) e em leite (XIAO *et al.*, 2011).

Nanolipossomas são estruturas formadas por um núcleo aquoso e uma membrana composta de bicamada fosfolipídica que podem encapsular compostos hidrossolúveis (imobilizados no núcleo), lipossolúveis (imobilizados na membrana fosfolipídica) ou anfifílicos (imobilizados simultaneamente no núcleo e na membrana fosfolipídica) (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014). Estudos utilizando nanolipossomas carregados com nisina demonstraram que atividade antimicrobiana dos lipossomas contra *L. monocytogenes* mostrou-se eficiente durante 10 h (IMRAN *et al.*, 2012) e que utilização de refrigeração em associação com nanolipossomas carregados com nisina, em leite desnatado, manteve as contagens de *L. monocytogenes* abaixo do nível de detecção do método durante 14 dias (MALHEIROS; DAROIT *et al.*, 2010). Além disso, estudos demonstram potencial antimicrobiano de nanolipossomas contendo nisina contra *Listeria*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* (NIAZ *et al.*, 2018) e de nanopartículas de EDTA carregadas com lisozima e nisina contra *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, e *B. cereus* (MORSY; ELSABAGH; TRINETTA, 2018). Lopes *et al.* (2017) demonstraram que nanolipossomas contendo nisina mantiveram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* durante 14 dias e Chang (2018) demonstrou que nanopartículas de nisina mostraram-se termoestáveis, mantendo seu potencial antimicrobiano contra *S. aureus* após autoclavagem.

Nanofibras são fibras muito finas, com diâmetro inferior a 100 nm produzidas a partir de diferentes polímeros convencionais ou biopolímeros, utilizando a técnica de electrospinning. As nanofibras apresentam grande área superficial, alta resistência mecânica e estruturas muito porosas. Quando as nanofibras são elaboradas a partir de polímeros com propriedades antibacterianas, como a quitosana quaternizada, ou quando são adicionados agentes antibacterianos durante o processo de electrospinning estes materiais demonstram potencial para aplicação em dispositivos médicos e odontológicos, purificação de água, têxteis, embalagens de alimentos e filmes comestíveis (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; GOTTENBOS *et al.*, 2002; IGNATOVA *et al.*, 2006; SUN, Y.; SUN, G., 2001; YAO *et al.*, 2008). Estudos demonstraram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus* das nanofibras de celulose (JIA; ZHOU; ZHANG, 2011); e contra os mesmos microrganismos nanofibras de quitosana apresentaram inibição de *S. aureus* em 30 minutos de contato e redução de 98,8 % de *E. coli* após 90 minutos de contato (IGNATOVA; MANOLOVA; RASHKOV, 2007). Nanofibras também podem

ser utilizadas para incorporação de antimicrobianos visando estabilizar a estrutura e função do composto imobilizado. Por exemplo, a sakacina (bacteriocinas produzida por *Lactobacillus sakei* 2a) foi imobilizada por aprisionamento na matriz nanofibrosa das membranas de celulose bacteriana produzidas por *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582 mantendo boa atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. Quercitina, um flavonol polifenólico presente em plantas comestíveis e medicinais, que apresenta ação antimicrobiana, foi encapsulada em nanofibras visando inibir *C. albicans* biofilms. Os autores sugerem que essas nanofibras poderiam ser utilizadas as revestimentos em dispositivos biomédicos para inibir contaminações microbianas (VASHISTH *et al.*, 2013). O uso dessas nanofibras contendo antimicrobianos poderia ser avaliado visando prevenir a contaminação de equipamentos e superfícies que entram em contato com alimentos.

Nos últimos anos estudos estão sendo realizados com o intuito de utilizar antimicrobianos naturais encapsulados como sanitizante para uso direto em alimentos ou em superfícies que entram em contato com alimentos. Martínez-Hernández *et al.* (2017) testaram a utilização de nanopartículas de quitosana-tripolifosfato carregadas com carvacrol para desinfecção de cenouras cruas fatiadas utilizando como controle desinfecção com hipoclorito de sódio. Os resultados obtidos pelas nanopartículas foram similares ao controle quanto a análise físico-química e sensorial das cenouras após 13 dias; porém, na análise microbiológica os resultados para o tratamento utilizando nanopartículas foram melhores do que para o controle (as cenouras tratadas com hipoclorito apresentaram concentração microbiológica 2 a 3 log maiores do que as cenouras tratadas com as nanopartículas contendo carvacrol). Já no estudo desenvolvido por Engel *et al.* (2017) foram realizados testes, em coupons de aço inoxidável com resíduos de leite, de soluções contendo timol e carvacrol livres e nanolipossomas carregados simultaneamente com carvacrol e timol contra pools de *Salmonella* e *S. aureus*. Os resultados obtidos demonstraram que enquanto as soluções livres inibiram 6 log CFU.cm⁻² de ambos microrganismos em 1 minuto, a solução contendo lipossomas necessitou um tempo de 10 minutos para obter o mesmo efeito, sugerindo que os lipossomas podem ser utilizados para obtenção de proteção residual em superfícies que entrem em contato com alimentos.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

A grande preocupação dos consumidores acerca da utilização de desinfetantes químicos em alimentos, principalmente entre o público consumidor de produtos vegetarianos e orgânicos, alavancou o início de pesquisas para o desenvolvimento de sanitizantes alternativos, obtidos a partir de antimicrobianos naturais e matrizes atóxicas. Dentre os antimicrobianos naturais destacam-se os compostos extraídos de óleos essenciais de plantas aromáticas, sendo muito utilizado em alimentos o carvacrol, devido à sua alta atividade antimicrobiana aliada a seu status GRAS, e as bacteriocinas, peptídeos produzidos principalmente por bactérias lácticas, destacando-se a nisina, única permitida para adição em alimentos em países como Brasil.

A encapsulação de antimicrobianos naturais apresenta-se como uma boa alternativa para o uso desses compostos na indústria de alimentos, pois esta tecnologia oferece proteção aos compostos sensíveis quando expostos a condições ambientais adversas como as encontradas em plantas de processamento de alimentos, além de utilizar pequenas quantidades do composto encapsulado e proporcionar liberação prolongada, gerando um efeito antimicrobiano residual. Dentre os diferentes tipos de nanocarreadores os mais utilizados para aplicações em alimentos são as nanoemulsões, nanopartículas poliméricas e nanolipossomas, devido principalmente a suas propriedades de liberação controlada dos compostos encapsulados.

Estudos relacionados a antimicrobianos naturais encapsulados em nanomateriais como sanitizantes para aplicação em superfícies que entram em contato com alimentos merecem atenção. O desenvolvimento de um sanificante que alie a ação imediata do composto livre com o efeito residual gerado pelo mesmo composto encapsulado pode ser uma perspectiva promissora.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABULADZE, T. *et al.* Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008. v. 74, n. 20, p. 6230–6238.

ACEVEDO-FANI, A. *et al.* Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, 2015. v. 47, p. 168–177.

- AHMAD, V. *et al.* Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2017. v. 49, p. 1–11.
- ASHRAF, M. *et al.* Green biocides, a promising technology: Current and future applications to industry and industrial processes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2014. v. 94, n. 3, p. 388–403.
- AUGUSTIN, M.; ALI-VEHMAS, T.; ATROSHI, F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2004. v. 7, n. 1, p. 55–64.
- BAHADAR, H. *et al.* Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. **Iranian Biomedical Journal**, 2016. v. 20, n. 1, p. 1–11.
- BATA-VIDÁCS, I. *et al.* **Nanotechnology and Microbial Food Safety**. Badajoz: Formatex Research Center, 2013.
- BERK, Z. **Food Process Engineering and Technology**. San Diego: Academic Press, 2013.
- BERNARDI, A. *et al.* Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. **Lwt**, 2018. v. 97, n. June, p. 25–30.
- BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P.; JANCY SHERENE BELL, I. Green algae *Chlorococcum humicola*- a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2011. v. 1, n. SUPPL. 1, p. S1–S7.
- BHARDWAJ, N. *et al.* Lytic bacteriophages as biocontrol agents of foodborne pathogens. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, 2015. v. 10, n. 11, p. 708–723.
- BHARGAVA, K. *et al.* Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, 2015. v. 47, p. 69–73.
- BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS. Supplementum**, 2013. n. 136, p. 1–51.
- BLANCO-PADILLA, A. *et al.* Food antimicrobials nanocarriers. **Scientific World Journal**, 2014. v. 2014, p. 1–11.
- BOTTICELLA, G. *et al.* **Listeria monocytogenes , biofilm formation and fresh cut produce**. Badajoz: Formatex Research Center, 2013.
- BOWER, C. K. *et al.* Characterization of fish-skin gelatin gels and films containing the antimicrobial enzyme lysozyme. **Journal of Food Science**, 2006. v. 71, n. 5, p. 1–5.
- BOYACIOGLU, O. *et al.* Biocontrol of *Escherichia coli* O157 : H7 on fresh-cut leafy greens using a bacteriophage cocktail in combination with modified atmosphere packaging. **Bacteriophage**, 2013. v. 3, n. 1, p. 1–7.
- BREN, L. Bacteria-eating virus approved as food additive. **FDA consumer**, 2007. v. 41, n. 1, p. 20–22.
- BRIDIER, A. *et al.* Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, 2015. v. 45, n. 1, p. 167–178.

- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, 2004. v. 94, p. 223–253.
- CALO, J. R. *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, 2015. v. 54, p. 111–119.
- CAMPANA, R.; BAFFONE, W. Carvacrol efficacy in reducing microbial biofilms on stainless steel and in limiting re-growth of injured cells. **Food Control**, 2018. v. 90, p. 10–17.
- CARBONE, M. *et al.* Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. **Journal of King Saud University - Science**, 2016. v. 28, n. 4, p. 273–279.
- CARLTON, R. M. *et al.* Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2005. v. 43, n. 3, p. 301–312.
- CHANDA, S.; BARAVALIA, Y.; KANERIA, M. Fruit and vegetable peels—strong natural source of antimicrobics. Badajoz: Formatex Research Center, 2007. p. 444–450.
- CHANG, R. *et al.* Preparation of extra-small nisin nanoparticles for enhanced antibacterial activity after autoclave treatment. **Food Chemistry**, 2018. v. 245, n. November, p. 756–760.
- CHORIANOPOULOS, N. G. *et al.* Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: Bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, 2008. v. 104, n. 6, p. 1586–1596.
- COSTERTON, J. W. *et al.* Bacterial biofilm in nature and disease. Calgary: **Annual Review of Microbiology**, 1987. v. 41, n. 1, p. 435–464.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 1999. v. 12, n. 4, p. 564–82.
- CUI, H. *et al.* Sequential effect of phages and cold nitrogen plasma against *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on different vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, 2018. v. 268, n. December 2017, p. 1–9.
- DALLA COSTA, K. *et al.* Formation of bacterial biofilms in different surfaces of food industries. **Journal of the Institute Cândido Tostes**, 2016. v. 71, n. 2, p. 75.
- DAUDT, R. M. *et al.* Nanotechnology as a strategy for the development of cosmetics. **Science and Culture**, 2013. v. 65, n. 3.
- DEHKORDI, S. *et al.* Antimicrobial effects of lysozyme in combination with *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil at different pH and NaCl concentrations on *E. coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 2008. v. 7, n. 11, p. 1458–1463.
- DONLAN, R. M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. **Trends in Microbiology**, 2009. v. 17, n. 2, p. 66–72.
- DONSÌ, F. *et al.* Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, 2011. v. 44, n. 9, p. 1908–1914.

- DORMAN, H.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol**, 2000. v. 88, p. 308–316.
- DOYLE, M. Nanotechnology: a brief literature review. **FRI briefings**, 2006. n. June, p. 1–10.
- DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2011. v. 363, n. 1, p. 1–24.
- DURAN, N. *et al.* Nanotechnology : Prospects and Perspectives. 2014. n. July 2015, p. 1–49.
- EDWARDS, R. A. *et al.* Computational approaches to predict bacteriophage-host relationships. **FEMS Microbiology Reviews**, 2016. v. 40, n. 2, p. 258–272.
- ENDERSEN, L. *et al.* Phage Therapy in the Food Industry. **Annual Review of Food Science and Technology**, 2014. v. 5, n. 1, p. 327–349.
- ENDERSEN, L. *et al.* Investigating the biocontrol and anti-biofilm potential of a three phage cocktail against *Cronobacter sakazakii* in different brands of infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, 2017. v. 253, n. April, p. 1–11.
- ENGEL, J. B. *et al.* Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, 2017. v. 252, n. March, p. 18–23.
- ENGELS, C. *et al.* Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009. v. 57, n. 17, p. 7712–7718.
- ERCOLINI, D. *et al.* Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. **Food Microbiology**, 2010. v. 27, n. 1, p. 137–143.
- ESFANDYARI-MANESH, M. *et al.* Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**, 2013. v. 7, n. 4, p. 290–295.
- EUROPEAN COMMUNITIES. **Directiva 98/8/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Fevereiro de 1998 relativa à colocação de produtos biocidas no mercado.** Official Journal.
- FALCÓ, I. *et al.* Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2018. n. February, p. 0–1.
- FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2009. v. 17, n. 8, p. 2950–2962.
- FATHI, M.; MOZAFARI, M.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, 2012. v. 23, n. 1, p. 13–27.
- FERGUSON, S. *et al.* Lytic bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157. **Bacteriophage**, 2013. v. 3, n. 1, p. e24323.
- FERNANDES, M. *et al.* Formation of multi-species biofilms by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing and

effectiveness of chemical sanitation procedures. **International Dairy Journal**, 2017. v. 72, p. 23–28.

FERREIRA, C. *et al.* **Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2010.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2005. v. 33, n. 3, p. 291–296.

FRAISE, A. P.; MAILLARD, J.; SATTAR, S. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization**. 5. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2013.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.; MANDRELL, R. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, 2002. v. 65, n. 10, p. 1545–1560.

GARRIDO-MAESTU, A. *et al.* Engineering of chitosan-derived nanoparticles to enhance antimicrobial activity against foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. **Carbohydrate Polymers**, 2018. v. 197, n. June, p. 623–630.

GIAOURIS, E. *et al.* Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, 2014. v. 97, n. 3, p. 289–309.

GIAOURIS, E. *et al.* Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, 2015. v. 6, n. JUL, p. 1–26.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. **Journal of Food Science**, 2011. v. 76, n. 2, p. 16–24.

GOODRIDGE, L. D.; BISHA, B. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. **Bacteriophage**, 2011. v. 1, n. 3, p. 130–137.

GOTTENBOS, B. *et al.* In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. **Biomaterials**, 2002. v. 23, n. 6, p. 1417–1423.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, 2014. v. 46, p. 412–429.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**.

HEACOCK-KANG, Y. *et al.* Spatial transcriptomes within the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture. **Molecular Microbiology**, 2017. v. 106, n. November, p. 976–985.

HRUDEY, S. *et al.* Evaluating evidence for association of human bladder cancer with drinking-water chlorination disinfection by-products. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, 2015. v. 18, p. 213–241.

IACUMIN, L.; MANZANO, M.; COMI, G. Phage inactivation of *Listeria*

- monocytogenes on San Daniele dry-cured ham and elimination of biofilms from equipment and working environments. **Microorganisms**, 2016. v. 4, n. 1, p. 4.
- IGNATOVA, M. *et al.* Electrospun nano-fibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and poly(vinyl alcohol). **Carbohydrate Research**, 2006. v. 341, n. 12, p. 2098–2107.
- IGNATOVA, M.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I. Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning. **European Polymer Journal**, 2007. v. 43, n. 4, p. 1112–1122.
- IMRAN, M. *et al.* Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. **Food Hydrocolloids**, 2012. v. 29, n. 2, p. 407–419.
- JAGADISH, K. *et al.* Ecofriendly synthesis of metal/metal oxide nanoparticles and their application in food packaging and food preservation. **Impact of Nanoscience in the Food Industry**, 2018. p. 197–216.
- JIA, B.; ZHOU, J.; ZHANG, L. Electrospun nano-fiber mats containing cationic cellulose derivatives and poly (vinyl alcohol) with antibacterial activity. **Carbohydrate Research**, 2011. v. 346, n. 11, p. 1337–1341.
- JIANG, W.; MASHAYEKHI, H.; XING, B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. **Environmental Pollution**, 2009. v. 157, n. 5, p. 1619–1625.
- JING, H.; SAHLE-DEMESSIE, E.; SORIAL, G. Inhibition of biofilm growth on polymer-MWCNTs composites and metal surfaces. **Science of the Total Environment**, 2018. v. 633, p. 167–178.
- KASNOWSKI, M. *et al.* Biofilm formation in the food industry and surface validation methods. **Electronic Journal of Veterinary Medicine**, 2010. v. 15, p. 1–23.
- KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2011. v. 84, n. 1, p. 163–171.
- KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.
- KIM, I. *et al.* Plum coatings of lemongrass oil-incorporating carnauba wax-based nanoemulsion. **Journal of Food Science**, 2013. v. 78, n. 10.
- KIM, K.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M. Enterobacter sakazakii bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, 2007. v. 115, n. 2, p. 195–203.
- KOCOT, M.; OLSZEWSKA, A. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. **LWT - Food Science and Technology**, 2017. v. 84, p. 47–57.
- KONG, M. *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, 2010. v. 144, n. 1, p. 51–63.
- LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**,

2007. v. 24, n. 3, p. 281–287.

LEE, B.; YUN, Y.; PARK, K. Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. **Chemical Engineering Science**, 2015. v. 125, p. 158–164.

LIBURDI, K. *et al.* Lysozyme immobilized on chitosan beads: Kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines. **Food Control**, 2016. v. 63, p. 46–52.

LOPES, N.; PINILLA, C.; BRANDELLI, A. Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior. **Food Hydrocolloids**, 2017. v. 70, p. 1–7.

LV, Y. *et al.* Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, 2014. v. 35, p. 305–314.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish and Shellfish Immunology**, 2006. v. 20, n. 2, p. 137–151.

MAGNONE, J. P. *et al.* Additive approach for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* spp. on contaminated fresh fruits and vegetables using bacteriophage cocktail and produce wash. **Journal of Food Protection**, 2013. v. 76, n. 8, p. 1336–1341.

MALHEIROS, P. S. *et al.* Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, 2010. v. 27, n. 1, p. 175–178.

MARTÍNEZ-ABAD, A.; LAGARON, J. M.; OCIO, M. J. Development and characterization of silver-based antimicrobial ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films for food-packaging applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012. v. 60, n. 21, p. 5350–5359.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B. *et al.* Microbial inactivations with hydrolysed lactoferrin and other natural antimicrobials in fresh-cut fennel. **LWT - Food Science and Technology**, 2017. v. 84, p. 353–358.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B.; AMODIO, M. L.; COLELLI, G. Carvacrol-loaded chitosan nanoparticles maintain quality of fresh-cut carrots. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2017. v. 41, p. 56–63.

MASTROMATTEO, M. *et al.* Packaging solutions to prolong the shelf life of Fiordilatte cheese: Bio-based nanocomposite coating and modified atmosphere packaging. **LWT - Food Science and Technology**, 2015. v. 60, n. 1, p. 230–237.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, D. Antiseptics and Disinfectants : Activity , Action , and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 1999. v. 12, n. 1, p. 147–179.

MENEGARO, A. *et al.* Sanitizantes: Concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. **SAP - Scientia Agraria Paranaensis**, 2016. v. 15, n. 2, p. 171–174.

MERINO, L. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. **Food Research International**, 2017. n. July.

METAK, A. M. Effects of Nanocomposite Based Nano-Silver and Nano-Titanium Dioxide on Food Packaging Materials. **International Journal of Applied Science and Technology**, 2015. v. 5, n. 2.

- MIAO, J. *et al.* Formation and development of *Staphylococcus* biofilm: With focus on food safety. **Journal of Food Safety**, 2017. v. 37, n. 4, p. 1–11.
- MILLEZI, F. *et al.* Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety**, 2012. v. 32, n. 3, p. 351–359.
- MIZAN, M. F. R.; JAHID, I. K.; HA, S. Do. **Microbial biofilms in seafood: A food-hygiene challenge**. **Food Microbiology**. Elsevier Ltd.
- MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, 2007. v. 5, n. 11, p. 2458–2461.
- MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. Micro Review *Staphylococcus aureus* biofilm : a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, 2017. v. 104, n. March, p. 365–376.
- MORONES, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, 2007. v. 16, n. 10, p. 2346–2353.
- MORSY, M. K.; ELSABAGH, R.; TRINETTA, V. Evaluation of novel synergistic antimicrobial activity of nisin, lysozyme, EDTA nanoparticles, and/or ZnO nanoparticles to control foodborne pathogens on minced beef. **Food Control**, 2018. v. 92, p. 249–254.
- MURIEL-GALET, V. *et al.* Covalent immobilization of lysozyme on ethylene vinyl alcohol films for nonmigrating antimicrobial packaging applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013. v. 61, n. 27, p. 6720–6727.
- NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. **National Nanotechnology Initiative Strategic Plan**. Executive Office of the President of the United States.
- NIAZ, T. *et al.* Potential of polymer stabilized nano-liposomes to enhance antimicrobial activity of nisin Z against foodborne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, 2018. v. 96, n. October 2017, p. 98–110.
- NTZIMANI, A. G.; GIATRAKOU, V. I.; SAVVAIDIS, I. N. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: Microbiological and sensory evaluation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2010. v. 11, n. 1, p. 187–196.
- O'CONNOR, P. *et al.* Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective. **Current Opinion in Food Science**, 2015.
- OGAKI, M.; FURLANETO, M. Review: General aspects of bacteriocins. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2015. v. 18, n. 4, p. 267–276.
- OLIVEIRA, M. *et al.* Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, 2010. v. 21, n. 4, p. 549–553.
- PAL, S.; TAK, Y.; SONG, J. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, 2007. v. 290, n. 42, p. 1712–1720.
- PERINELLI, D. R. *et al.* Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial

activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2018. v. 117, n. January, p. 8–20.

PRAKHU, S.; POULOSE, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters**, 2012. v. 2, n. 1, p. 32.

PRAKASH, A. *et al.* Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. **Food Research International**, 2018. v. 111, n. December 2017, p. 509–523.

PROMBUTARA, P. *et al.* Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. **Food Control**, 2012. v. 24, n. 1–2, p. 184–190.

RAI, M. Green Nanobiotechnology: biosynthesis of metallic nanoparticles and their applications as nanoantimicrobials. **Science and Culture**, 2013. v. 65, n. 3.

RAI, R. V.; BAI, J. A. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, 2011. n. February, p. 197–209.

RAIMONDI, F. *et al.* Nanoparticles in energy technology: Examples from electrochemistry and catalysis. **Angewandte Chemie - International Edition**, 2005. v. 44, n. 15, p. 2190–2209.

RANDAZZO, W. *et al.* Effect of green tea extract on enteric viruses and its application as natural sanitizer. **Food Microbiology**, 2017. v. 66, p. 150–156.

RASHID, M. *et al.* A *Yersinia pestis*-specific, lytic phage preparation significantly reduces viable *Y. pestis* on various hard surfaces experimentally contaminated with the bacterium. **Bacteriophage**, 2012. v. 2, n. 3, p. 168–177.

REIS, C. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2006. v. 2, n. 1, p. 8–21.

RHOADES, J. *et al.* Oregano essential oil as an antimicrobial additive to detergent for hand washing and food contact surface cleaning. **Journal of Applied Microbiology**, 2013. v. 115, n. 4, p. 987–994.

ROGERS, K. R. *et al.* Characterization of engineered nanoparticles in commercially available spray disinfectant products advertised to contain colloidal silver. **Science of the Total Environment**, 2018. v. 619–620, p. 1375–1384.

RUENGVISESH, S. *et al.* Inhibition of bacterial pathogens in medium and on spinach leaf surfaces using plant-derived antimicrobials loaded in surfactant micelles. **Journal of Food Science**, 2015. v. 80, n. 11, p. M2522–M2529.

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

SANTOS, C. *et al.* **Nanomaterials with Antimicrobial Properties : Applications in Health Sciences**. Badajoz: Formatex Research Center, 2013. V. 1.

SATPATHY, S. *et al.* Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2016. v. 7, p. 56–66.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, 2012. v. 7, n. 8, p. 979–990.

SCHAFFAZICK, S. *et al.* Characterization and physical-chemical stability of polymer nanoparticulate systems for drug administration. **New Chemistry**, 2003. v. 26, n. 5, p. 726–737.

SEVERINO, R. *et al.* Antibacterial and physical effects of modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against *Listeria innocua* in green beans. **International Journal of Food Microbiology**, 2014. v. 191, p. 82–88.

SHANKAR, S.; RHIM, J. W. Preparation of sulfur nanoparticle-incorporated antimicrobial chitosan films. **Food Hydrocolloids**, 2018. v. 82, p. 116–123.

SHARMA, C. S.; DHAKAL, J.; NANNAPANENI, R. Efficacy of lytic bacteriophage preparation in reducing *Salmonella in vitro*, on turkey breast cutlets, and on ground turkey. **Journal of Food Protection**, 2015. v. 78, n. 7, p. 1357–1362.

SHEN, X. L. *et al.* Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. **Food Hydrocolloids**, 2010. v. 24, n. 4, p. 285–290.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.; VIEIRA, M. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, 2010. v. 43, n. 4, p. 573–583.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, 2000. v. 17, p. 439–447.

SINGH, A.; POSHTIBAN, S.; EVOY, S. Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. **Sensors**, 2013. v. 13, n. 2, p. 1763–1786.

SINGH, N. *et al.* Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. **LWT - Food Science and Technology**, 2002. v. 35, n. 8, p. 720–729.

SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, 2014. v. 64, p. 27–37.

SOKOVIĆ, M. *et al.* Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. **Molecules**, 2010. v. 15, n. 11, p. 7532–7546.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2004. v. 275, n. 1, p. 177–182.

SONI, B. *et al.* Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan/TEMPO biocomposite packaging films. **Food Packaging and Shelf Life**, 2018. v. 17, n. May, p. 73–79.

SONI, K. A.; NANNAPANENIN, R. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw walmon fillet tissue. **Journal of Food Protection**, 2010. v. 73,

n. 1, p. 32–38.

SOUZA, G. *et al.* Effects of the Essential Oil from *Origanum vulgare* L. on Survival of Pathogenic Bacteria and Starter Lactic Acid Bacteria in Semihard Cheese Broth and Slurry. **Journal of Food Protection**, 2016. v. 79, n. 2, p. 246–252.

SREY, S.; JAHID, I.; HA, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, 2013. v. 31, n. 2, p. 572–585.

SRIVIDYA, N.; GHOORA, M. D.; PADMANABH, P. R. **Antimicrobial nanotechnology: research implications and prospects in food safety**. Anantapur: Elsevier Inc., 2017.

STOJKOVIĆ, D. *et al.* In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013. v. 93, n. 13, p. 3205–3208.

SULAKVELIDZE, A. Safety by Nature: Potential Bacteriophage Applications. **Microbe**, 2011. v. 6, n. 3, p. 122–126.

SUN, Y.; SUN, G. Novel Regenerable N-Halamine Polymeric Biocides. I. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Hydantoin-Containing Polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, 2001. v. 80, n. 13, p. 2460–2467.

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, 2013. v. 36, n. 1, p. 224–229.

TAJKARIMI, M.; IBRAHIM, S.; CLIVER, D. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, 2010. v. 21, n. 9, p. 1199–1218.

TANG, S.; SMITH, R.; POLIAKOFF, M. Principles of green chemistry: Productively. **Green Chemistry**, 2005. v. 7, n. 11, p. 761–762.

TEIXEIRA, P.; RODRIGUES, D. Adhesion to food contact surfaces. **Biotechnology Bulletin**, 2015. v. Série 2, n. 6, p. 31–34.

TERJUNG, N. *et al.* Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. **Food and Function**, 2012. v. 3, n. 3, p. 290–301.

TIWARI, B. *et al.* Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009. v. 57, n. 14, p. 5987–6000.

TORNUK, F. *et al.* Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh cut carrots and apples. **International Journal of Food Microbiology**, 2011. v. 148, n. 1, p. 30–35.

TULVE, N. *et al.* Characterization of silver nanoparticles in selected consumer products and its relevance for predicting children's potential exposures. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 2015. v. 218, n. 3, p. 345–357.

VALERIANO, C. *et al.* The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, 2012. v. 25, n. 2, p. 673–677.

VASHISTH, P. *et al.* Antibiofilm activity of quercetin-encapsulated cytocompatible nanofibers against *Candida albicans*. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, 2013. v. 28, n. 6, p. 652–665.

- VASUDEVAN, R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. **Journal of Microbiology & Experimentation**, 2014. v. 1, n. 3, p. 1–16.
- VIAZIS, S.; LABUZA, T.; DIEZ-GONZALEZ, F. Bacteriophage mixture inactivation kinetics against *Escherichia coli* O157: H7 on hard surfaces. **Journal of Food Safety**, 2015. v. 35, n. 1, p. 66–74.
- VIDÁCS, A. *et al.* Optimization of essential oil-based natural disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surfaces. **Journal of Molecular Liquids**, 2018. v. 255, p. 257–262.
- VU, K. D. *et al.* Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. **Food Research International**, 2011. v. 44, n. 1, p. 198–203.
- WANG, H. *et al.* Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. **Food Control**, 2013. v. 33, n. 2, p. 378–384.
- WANG, H. *et al.* Biofilm formation of *Yersinia enterocolitica* and its persistence following treatment with different sanitation agents. **Food Control**, 2017. v. 73, p. 433–437.
- WASUKAN, N. *et al.* Determination of silver in personal care nanoproducts and effects on dermal exposure. **Journal of Nanoparticle Research**, 2015. v. 17, n. 11, p. 1–11.
- WEISS, J. *et al.* **Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials**. New York: Academic Press, 2009.
- WHITEHEAD, K. A.; VERRAN, J. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. **Current Opinion in Food Science**, 2015. v. 2, p. 84–91.
- WOOLSTON, J. *et al.* Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces. **Bacteriophage**, 2013. v. 3, n. 3, p. e25697.
- XIAO, D.; DAVIDSON, P.; ZHONG, Q. Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. **LWT - Food Science and Technology**, 2011. v. 44, n. 10, p. 1977–1985.
- XIE, Y. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011. v. 77, n. 7, p. 2325–2331.
- YANG, S.; SADEKUZZAMAN, M.; HA, S. Reduction of *Listeria monocytogenes* on chicken breasts by combined treatment with UV-C light and bacteriophage ListShield. **LWT - Food Science and Technology**, 2017. v. 86, p. 193–200.
- YAO, C. *et al.* Surface modification and antibacterial activity of electrospun polyurethane fibrous membranes with quaternary ammonium moieties. **Journal of Membrane Science**, 2008. v. 320, n. 1–2, p. 259–267.
- YEH, Y. *et al.* Bacteriophage application on red meats and poultry: Effects on *Salmonella* population in final ground products. **Meat Science**, 2017. v. 127, p. 30–34.
- ZAND, A. *et al.* Comprehensive study of sporicidal and sporstatic effect of CuO and

AgO metal nanoparticles upon spore of *Clostridium botulinum* type E. **African Journal of Microbiology Research**, 2012. v. 6, n. 7, p. 1417–1422.

ZHANG, Y. *et al.* Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, 2014. v. 142, p. 269–275.

4.2. ARTIGO 2

ENCAPSULAÇÃO DE CARVACROL EM NANOLIPOSSOMAS E NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS: COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E AÇÃO ANTIMICROBIANA CONTRA BACTÉRIAS ADERIDAS EM AÇO INOXIDÁVEL

Fabiola Ayres Cacciatore^a, Michelle Dalmás^a, Caroline Maders^a, Adriano Brandelli^a,
Patrícia da Silva Malheiros^a

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos - ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS - Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale – Prédio 43212 – CEP 91501-970 - Porto Alegre/RS/Brasil

RESUMO: Este estudo teve como objetivo encapsular carvacrol em nanolipossomas e nanocápsulas poliméricas, comparar suas características físico-químicas e ação antimicrobiana contra *poools* de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes in vitro* e aderidos em aço inoxidável. Nanolipossomas contendo carvacrol (NLC) foram preparados através da técnica de hidratação do filme lipídico, apresentando diâmetro médio de 270,83 nm, polidispersidade de 0,22, eficiência de encapsulação de 98,02 % e potencial zeta de + 8,64 mV. Concentração bactericida mínima (CBM) dos NLC foi de 3,53 mg/mL contra *Salmonella* e 5,30 mg/mL contra os demais microrganismos. Nanocápsulas contendo carvacrol (NCC) foram preparadas usando técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, apresentando diâmetro médio de 159,30 nm, polidispersidade de 0,22, eficiência de encapsulação de 97,11 % e potencial zeta de + 44,84 mV. CBM das NCC foi de 4,42 mg/mL contra *E. coli* e de 3,31 mg/mL contra os demais microrganismos. A cinética de multiplicação foi determinada para cada bactéria ($\approx 8 \log$ UFC/mL) utilizando diferentes concentrações de NCC. Os resultados mostraram que após 2 horas de contato $\frac{1}{2}$ CBM de NCC inibiram *Salmonella* e *E. coli* abaixo do limite de detecção do método. A população de *L. monocytogenes* foi reduzida em $\approx 2 \log$ UFC/mL em 6 horas e *S. aureus* foi inibido abaixo do limite de detecção da técnica em 48 horas utilizando a CBM de NCC. Após, os *poools* de cada

bactéria foram aderidos, separadamente, em coupons de aço inoxidável AISI 304 resultando em uma população inicial de ≈ 6 a $7 \log$ UFC/cm². A ação antimicrobiana das NCC foi avaliada em diferentes concentrações após 1 minuto de contato. *Salmonella* e *E. coli* foram inibidas abaixo do limite de detecção do método utilizando a CBM de NCC. Nesta mesma concentração, *L. monocytogenes* e *S. aureus* foram reduzidos em $\approx 4 \log$ UFC/cm² e $3,5 \log$ UFC/cm², respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que as NCC desenvolvidas apresentam potencial para utilização em superfícies de contato com alimentos, especialmente em frigoríficos de aves devido à inibição da *Salmonella* e *E. coli*, visando evitar a fixação bacteriana em sua fase inicial e consequente formação de biofilmes.

Palavras-chaves: nanotecnologia, antimicrobianos naturais, carvacrol, bactérias de origem alimentar, aço inoxidável

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Os sintomas mais comuns de DTA são náuseas, vômitos e diarreia, acompanhadas ou não de febre, porém podem evoluir para perdas de funções vitais e morte (BRASIL, 2018; EFSA, 2018; SCALLAN *et al.*, 2011). Os principais microrganismos causadores de DTA no Brasil são *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2018), enquanto na Europa destacam-se são *Campylobacter*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* (EFSA, 2018).

Dentre os veículos de disseminação de patógenos em ambientes de processamento de alimentos estão as superfícies contaminadas como equipamentos, facas, placas de corte, tanques e cubas. Esses utensílios e equipamentos podem ser fabricados de diversos materiais, principalmente aço inoxidável e polipropileno (CHIA *et al.*, 2009). As características dessas superfícies como hidrofobicidade, composição e rugosidade (TRESSE *et al.*, 2007), além das características intrínsecas dos microrganismos como a presença de fímbrias e flagelo (LI; MCLANDBOROUGH, 1999), influenciam a capacidade de adesão bacteriana.

Visando reduzir a presença de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes em superfícies de contato com alimentos, as indústrias e serviços de alimentação realizam o procedimento de higienização (MCDONNELL; RUSSELL, 1999; SATPATHY *et al.*, 2016) que inicia-se com a limpeza seguida pela desinfecção. Geralmente, a desinfecção

é realizada utilizando produtos químicos como compostos liberadores de cloro, ácido peracético e quaternário de amônio (FERREIRA *et al.*, 2010; PHILLIPS, 2016), os quais podem gerar subprodutos potencialmente carcinogênicos (HRUDEY *et al.*, 2015; PHILLIPS, 2016) e também contribuir para o desenvolvimento de bactérias resistentes (WANG *et al.*, 2017).

Além disso, os consumidores estão mais conscientes de que a utilização de alguns reagentes químicos em alimentos ou superfícies de processamento podem oferecer riscos à saúde, aumentando a busca por produtos fabricados com insumos naturais (BRIDIER *et al.*, 2015; FALCÓ *et al.*, 2018; SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014). Neste sentido, os óleos essenciais e seus principais compostos ativos podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos sanitizantes, pois apresentam propriedades antimicrobianas contra um amplo espectro de microrganismos (RANDAZZO *et al.*, 2017; SÁNCHEZ; AZNAR, 2015; STOJKOVIĆ *et al.*, 2013).

Dentre os compostos extraídos de óleos aromáticos destaca-se o carvacrol, um fenol monoterpênico extraído de orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) que apresenta ação bactericida contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e seus biofilmes (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; SZCZEPANSKI; LIPSKI, 2013). O carvacrol apresenta *status* GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) concedido pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e é aprovado pela Comissão Europeia para utilização como saborizante de alimentos (EFSA, 2013; MAISANABA *et al.*, 2017). Porém, a utilização dos óleos essenciais ou seus compostos nas indústrias de alimentos é dificultada devido a características como alta volatilidade, sabor e/ou aroma residual, baixa estabilidade e grande suscetibilidade a variações ambientais. A nanoencapsulação surge como uma estratégia para proteção dos antimicrobianos contra os problemas acima expostos, além da encapsulação proporcionar maior interação com a superfície (DONSÌ *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2015) e possibilidade de liberação controlada do princípio ativo.

Nanomateriais são caracterizados por possuírem pelo menos uma dimensão entre 1 e 100 nm (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2014), porém para as aplicações farmacêuticas e biológicas, as partículas com tamanho até 1000 nm são consideradas como nanopartículas, desde que apresentem propriedades biológicas, físicas e químicas diferentes do material quando em escala macroscópica (LEE; YUN; PARK, 2015; SCENIHR, 2010). A ação antimicrobiana dos nanomateriais é favorecida pela diferença de tamanho existente entre microrganismos (10^{-6} m) e nanopartículas (10^{-9} m),

favorecendo a penetração das nanopartículas através da membrana plasmática (RAI; BAI, 2011).

Para aplicações em alimentos, os sistemas de encapsulamento mais estudados são nanoemulsões, nanofibras, nanopartículas poliméricas e nanolipossomas, destacando-se os dois últimos (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; JAGADISH *et al.*, 2018; LOPES; PINILLA; BRANDELLI, 2017; SRIVIDYA; GHOORA; PADMANABH, 2017).

As nanopartículas poliméricas apresentam estabilidade em ambientes aquosos e liberação lenta do composto encapsulado (MOHAMMADI *et al.*, 2017; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Apresentam-se sob forma de nanocápsulas (composto ativo oleoso ou dissolvido em núcleo oleoso) ou nanoesferas (composto ativo adsorvido no polímero encapsulante, não apresenta óleo em sua formulação) (REIS *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os polímeros usados como material encapsulante podem ser naturais ou sintéticos, conforme características desejadas (MOHAMMADI *et al.*, 2017). Dentre os polímeros sintéticos destaca-se o Eudragit®, muito usado pela indústria farmacêutica, devido à grande diversidade de tipos existentes (PATRA *et al.*, 2017). Eudragit® RS 100 apresenta grande capacidade de intumescimento e, quando usado como agente encapsulante, forma uma nanocápsula bastante porosa (PHAECHAMUD; THUREIN; CHANTADEE, 2018).

Já os nanolipossomas são vesículas esféricas formadas por um núcleo aquoso e membrana de bicamada fosfolipídica capazes de encapsular compostos lipossolúveis (na membrana), hidrossolúveis (no núcleo) ou anfífilicos (simultaneamente na membrana e no núcleo) (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; LOPES; PINILLA; BRANDELLI, 2017).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi encapsular carvacrol em nanolipossomas e nanocápsulas poliméricas, comparando suas características físico-químicas e ação antimicrobiana contra *pools* de *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes in vitro* e aderidos em superfícies de aço inoxidável. Além disso, a cinética de multiplicação *in vitro* foi determinada para os mesmos microrganismos em presença de carvacrol livre e encapsulado em nanocápsulas poliméricas utilizando diversas concentrações do antimicrobiano.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Culturas bacterianas

Foram utilizados 4 *pools* bacterianos, cada um composto por 3 cepas: (1) *pool de E. coli*: *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* 25972 e *E. coli* DH5- α ; (2) *pool de Salmonella*: *S. Heidelberg* 22295, *S. Minnesota* 7301007 e *S. Enteritidis* SE86; (3) *pool de S. aureus*: *S. aureus* ATCC 2993, *S. aureus* S6 e *S. aureus* S8; (4) *pool de L. monocytogenes*: *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* 7459 e *L. monocytogenes* J11. Todas as cepas utilizadas neste trabalho pertencem à Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS). As cepas foram cultivadas, separadamente, em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia, Índia), a 37 °C, por 18-24 horas. Em seguida, cada suspensão foi ajustada para concentração de 8 log UFC/mL, através da diluição em caldo BHI para obter uma absorbância de 0,5 (DO_{630nm}), usando espectrofotômetro Ultrospec™ 3100 pro (GE Healthcare, Inglaterra). Após o ajuste de concentração, foram reunidos 3 mL de caldo BHI, contendo as 3 cepas de cada microrganismo, totalizando 9 mL de *pool*.

2.2. Preparação da solução de carvacrol para hidratação do filme lipídico

Para a solução de carvacrol diluiu-se 0,106 g de carvacrol (Sigma Aldrich, Estados Unidos, com 98% de pureza) em 10 mL de água destilada contendo 0,1 g de Tween 80 (Labsynth, Brasil), obtendo concentração de 10,6 mg/mL.

2.3. Encapsulação do carvacrol em nanoestruturas

O carvacrol foi encapsulado em dois tipos de nanoestruturas diferentes: nanolipossomas e nanocápsulas poliméricas. Os nanolipossomas contendo carvacrol (NLC) foram preparados usando a técnica de hidratação do filme lipídico, enquanto as nanocápsulas poliméricas contendo carvacrol (NCC) foram preparadas utilizando técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado.

2.3.1. Encapsulação do carvacrol em nanolipossomas

Carvacrol foi encapsulado em nanolipossomas pela técnica de hidratação do filme lipídico (MALHEIROS *et al.*, 2010). Resumidamente, 0,08 g de fosfatidilcolina de soja

(Lipoid GMBH - Alemanha) foram diluídas em 20 mL de clorofórmio. Após remoção do solvente em rotaevaporador, o filme lipídico foi mantido em dessecador a vácuo *overnight*. O filme foi então reidratado com 10 mL da solução contendo carvacrol (descrito no item 2.2.), homogeneizado utilizando banho maria a 40 °C e vortex, obtendo-se a solução contendo carvacrol encapsulado em lipossomas. Para redução e uniformização do tamanho dos lipossomas formados a solução foi submetida a ultrasonicação (ultrassom de ponta modelo VCX 400) com ajuste de frequência para 50 KHz (Sonics & Materials Inc., Estados Unidos) em 3 ciclos de 1 minuto em banho de gelo.

2.3.2. Encapsulação do carvacrol em nanocápsulas

As nanocápsulas contendo carvacrol foram preparadas através da técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado (GUTERRES *et al.*, 1995). Foi preparada uma fase orgânica contendo 0,100 g de Eudragit RS 100 (Evonik, Alemanha), 330 µL de ácido caprílico, 1,06g de carvacrol e 26,87 mL de acetona. Esta fase orgânica foi vertida, sob agitação magnética, em uma solução aquosa contendo 0,077 g de polisorbato 80 (Tween 80) diluído em 53,3 mL de água ultrapurificada ocorrendo então a formação das nanocápsulas. Por fim, a acetona foi eliminada e o volume reduzido a 10 mL em rotaevaporador por um período de aproximadamente 3 horas com banho maria mantido a 40 °C.

2.4. Caracterização físico-química das nanoestruturas contendo carvacrol

Diâmetro médio e polidispersidade foram determinados em equipamento NanoBrook Omni modelo EMI9863 (Brookhaven Instruments, Estados Unidos) e potencial zeta em equipamento ZetaPALS modelo 31450 (Brookhaven Instruments, Estados Unidos) após diluição em água ultrapura na proporção de 1:10. Todas as medidas foram realizadas imediatamente após a encapsulação.

2.5. Eficiência de encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada de acordo com Shao et al. (2018) com modificações. Realizou-se uma leitura de varredura (190 – 900 nm) utilizando espectrofotômetro Ultrospec™ 3100 pro (GE Healthcare, Inglaterra) para determinação do comprimento de onda de máxima absorção do carvacrol (297 nm). Foi traçada a curva padrão de absorbância de carvacrol em 297 nm utilizando-se soluções-padrão com concentrações de 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL e 0,8 mg/mL. Centrifugou-se as amostras a 10.000 x g a 4 °C por 20 min, tomou-se alíquota do sobrenadante (0,1 mL), dilui-se em 4,9 mL de etanol 95% e realizou-se a leitura em 297 nm, determinando-se a absorbância da amostra. Os experimentos foram realizados em triplicata. Calculou-se a concentração de cada amostras através da equação da reta determinada anteriormente, $y = 0,3431x + 0,1305$ ($R^2 = 0,9835$), onde y representa absorbância (nm) e x representa a concentração da amostra (mg/mL). A eficiência de encapsulação foi calculada através da equação a seguir:

$$EE (\%) = \frac{(\text{conc. inicial} - \text{conc. sobrenadante})}{\text{conc. inicial}} \times 100 \quad (1)$$

2.6. Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Foi determinada a CBM dos nanolipossomas contendo carvacrol (NLC), bem como das nanocápsulas contendo carvacrol (NCC) para cada um dos 4 *pools* usando metodologia proposta por *Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2008) com modificações. Primeiramente foram adicionados 100 µL de caldo BHI em cada poço. Após, 100 µL da solução sanificante foi adicionada no primeiro poço. Depois de realizada a homogeneização 100 µL da solução do primeiro poço foi transferida para o segundo poço, do segundo para o terceiro e assim sucessivamente. Em seguida, 100 µL da *pool* de bactérias (8 log UFC/mL) foram adicionados em cada poço, sendo que no último poço não foram adicionadas bactérias, servindo assim de controle negativo. Essa técnica foi realizada separadamente para NLC e para NCC e repetida para os 4 *pools* de microrganismos diferentes. Após incubação das placas de microdiluição (37 °C/24 h) transferiu-se 20 µL de cada poço para placa contendo meio de cultura seletivo para cada microrganismo. Após 24 horas de incubação, observou-se crescimento ou não de

colônias. Considerou-se como CBM a menor concentração de antimicrobiano que inativou a bactéria alvo.

2.7. Cinética de multiplicação *in vitro* dos microrganismos em presença de agente antimicrobiano

A cinética de multiplicação *in vitro* dos quatro *pools* testados foi realizada utilizando metodologia desenvolvida por Garcia & Isenberg (2010) com modificações. Primeiramente, cada *pool* bacteriano foi ajustado para 8 log UFC/mL. Foram testadas soluções antimicrobianas de carvacrol livre e NCC nas concentrações $\frac{1}{4}$ CBM, $\frac{1}{2}$ CBM, CBM e 2 CBM, diluídos em tubos contendo 10 mL de caldo BHI. Os tubos de ensaio foram mantidos em estufa a 30 °C e retiradas amostras em tempos pré-determinados (0,25, 2, 4, 6, 24 e 48 horas). Para cada amostra foram realizadas diluições seriadas e semeadura em placa com meio seletivo para cada microrganismo usando técnica da gota (MILES; MISRA, 1938) seguida de incubação a 37 °C durante 18-24 horas. Foi realizado controle positivo utilizando água ultrapurificada em substituição ao antimicrobiano.

2.8. Preparação dos *coupons* de aço inoxidável AISI 304

Os *coupons* de aço inoxidável AISI 304 (2 cm x 2 cm x 1 mm) foram lavados com detergente neutro, enxaguados com água e secos a 60 °C. Depois de secos os *coupons* foram colocados em frascos, autoclavados (121 °C, por 15 minutos), e novamente secos a 60 °C (ROSSONI; GAYLARDE, 2000). Os *coupons* foram mantidos em frascos estéreis a temperatura ambiente até a realização dos testes.

2.9. Adesão microbiana e ação antimicrobiana

Os *coupons* de aço inoxidável AISI 304 foram imersos em um frasco contendo 10 mL de cada um dos *pools* (8 log UFC/mL), a 37 °C, por 15 minutos, visando aderência dos microrganismos aos *coupons*. Após esse período os *coupons* foram lavados em 10 mL de água peptonada 0,1 % para remoção das células não aderidas. Cada *coupon* com as células microbianas aderidas foi imerso durante 1 minuto em um frasco contendo solução antimicrobiana. Foram testadas NCC nas concentrações $\frac{1}{2}$ CBM e CBM. Após 1 minuto o *coupon* foi lavado em 10 mL de água peptonada 0,1 % para remoção da solução

antimicrobiana e imerso em outro frasco contendo 10 mL de água peptonada 0,1 %, que foi então submetido à lavadora ultrassônica USC700 (UNIQUE, Brasil) durante 10 minutos com potência de 55 Hz, para que as células aderidas se soltassem dos *coupons* e se transferissem para a solução aquosa (SINDE; CARBALLO, 2000). Foram realizadas quatro diluições seriadas de cada *coupon* e 20 µL de cada diluição foi semeada em meio de cultura seletivo para cada microrganismo através do método da gota (MILES; MISRA, 1938) e incubadas a 37 °C durante 18-24 horas. Foi realizado controle positivo submetendo o *coupon* a 10 mL de água peptonada 0,1 % após adesão das células microbianas e controle negativo submetendo o *coupon* a 10 mL de solução clorada 200 ppm (BRASIL, 2016). O limite de detecção deste método é de aproximadamente 1,69 UFC/mL, equivalente a 1,92 log UFC/cm² (MALHEIROS *et al.*, 2009). Para conversão de log UFC/mL para log UFC/cm² foi utilizada a equação a seguir:

$$\log \text{UFC/cm}^2 = \frac{\log \text{UFC/mL} \times 10 \text{ mL}}{\text{área total do coupon (cm}^2\text{)}} \quad (2)$$

2.10. Análise estatística

Os dados referente à caracterização físico-química das nanoestruturas e as contagens bacterianas foram analisadas estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA), fator único, aplicando o teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o *software* SAS Studio online. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização físico-química das nanoestruturas contendo carvacrol

Duas tecnologias distintas foram avaliadas para encapsulação de carvacrol em sistemas nanoparticulados e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Tanto os nanolipossomas como as nanocápsulas poliméricas contendo carvacrol apresentaram tamanho adequado para serem considerados nanotecnológicos, já que são menores do que 1000 nm, conforme determinado para a área da saúde (LEE; YUN; PARK, 2015; SCENIHR, 2010). Comparando o diâmetro médio de ambas formulações verifica-se que houve diferença significativa entre elas ($p < 0,05$). As nanocápsulas contendo carvacrol (NCC) apresentaram tamanho menor (160 nm) do que os nanolipossomas contendo

carvacrol (NLC) (270 nm), o que pode facilitar a penetração das nanopartículas através da membrana dos microrganismos (MORONES *et al.*, 2007; RAIMONDI *et al.*, 2005; SEIL; WEBSTER, 2012). Avaliando a uniformidade de tamanho das nanopartículas, ou seja, a polidispersidade (PDI), observa-se que não houve variação significativa ($p > 0,05$) entre os valores encontrados para nanocápsulas e nanolipossomas. A Tabela 1 mostra que ambas formulações apresentaram valores de PDI próximos a 0,2, sugerindo menor probabilidade de agregação das nanopartículas e maior estabilidade da solução (KLANG *et al.*, 2012; KLANG; VALENTA, 2011).

Tabela 1. Diâmetro médio, polidispersidade (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulação dos nanolipossomas contendo carvacrol (NLC) e nanocápsulas contendo carvacrol (NCC)

	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade	Potencial zeta (mV)	Eficiência de Encapsulação (%)
NLC	270,83 ± 1,20 ^a	0,22 ± 0,05 ^a	+ 8,64 ± 0,94 ^b	98,02 ± 0,04 ^a
NCC	159,30 ± 9,20 ^b	0,22 ± 0,02 ^a	+ 44,84 ± 1,68 ^a	97,11 ± 0,20 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Em relação ao potencial zeta houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações. Entretanto, os dois valores foram positivos, favorecendo a atração eletrostática das nanopartículas com os microrganismos, que apresentam carga de superfície negativa, facilitando a ação do antimicrobiano carvacrol na parede celular (SHAABAN; EDRIS, 2015; ZAND *et al.*, 2012). O potencial zeta determina a diferença de carga elétrica entre a camada iônica ao redor da partícula e a carga da solução ao redor desta partícula (LU; CHIU, 2006). Utiliza-se essa medida para avaliação da estabilidade das soluções contendo nanopartículas, pois quanto maior o valor absoluto de potencial zeta, maior será a repulsão entre elas, diminuindo assim a frequência de colisões e a possibilidade de precipitação de agregados (ARIAS *et al.*, 2008; MALHEIROS; DAROIT; BRANDELLI, 2010). Entre as duas formulações analisadas as nanocápsulas apresentaram valor maior para potencial zeta, possivelmente devido à natureza catiônica do polímero Eudragit (MOHAMMADI, G. *et al.*, 2017; OLIVEIRA; LIMA, 2006). Portanto, as nanocápsulas contendo carvacrol apresentam maior estabilidade do que os nanolipossomas contendo carvacrol.

As duas formulações apresentaram alta eficiência de encapsulação, não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) entre ambas. A alta lipofilicidade do Eudragit possivelmente proporcionou uma formação rápida das nanopartículas, havendo menor dispersão de carvacrol na fase aquosa (LEO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2013) enquanto os nanolipossomas, devido à sua facilidade em encapsular compostos lipofílicos em sua membrana, apresentam alta eficiência de encapsulação para compostos oleosos como o carvacrol (KUMAR *et al.*, 2010). A eficiência de encapsulação é fortemente influenciada pela natureza e características físico-químicas do composto ativo e do material encapsulante, bem como das interações eletrostáticas que ocorrem entre eles (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996).

Diversos estudos encontraram valores semelhantes para tamanho de nanocápsulas e/ou nanolipossomas, polidispersidade, potencial zeta e eficiência de encapsulação. Por exemplo, Santos *et al.* (2013) encapsularam clotrimazol em nanocápsulas de Eudragit RS 100 e encontraram tamanho de 144 nm, PDI 0,18, potencial zeta + 12 mV e eficiência de encapsulação de 99%. Yin *et al.* (2016) testaram Eudragit S 100 com quitosana para encapsular psoralidina e obtiveram nanocápsulas com diâmetro médio de 132,5 nm, PDI 0,17 e eficiência de encapsulação de 98,1%. Em outra pesquisa utilizando Eudragit RS 100 combinado com diferentes proporções de PLGA (poli (ácido lático-co-ácido glicólico) para encapsular nistatina os autores encontraram tamanho das nanocápsulas variando entre 128 e 362 nm (MOHAMMADI *et al.*, 2017). Por outro lado, Engel *et al.* (2017) desenvolveram nanolipossomas carregados com timol e carvacrol que mediram 270 nm, PDI 0,33 e potencial zeta de + 39,9 mV. Da mesma forma, Sebaaly *et al.* (2015) ao estudarem diversas formulações de nanolipossomas de fosfolipídios de soja com colesterol carregados com eugenol encontraram diâmetro médio variando entre 225 e 260 nm, PDI entre 0,15 e 0,25 e eficiência de encapsulação entre 56 e 84%.

3.2. Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os resultados de CBM para as duas tecnologias de encapsulação de carvacrol, bem como avaliação da CBM para carvacrol livre em solução, estão apresentados na Tabela 2. Observa-se que foi necessária uma concentração menor do carvacrol livre em comparação ao carvacrol encapsulado para inativar todas as bactérias avaliadas. Esse resultado era esperado uma vez que a liberação do composto antimicrobiano presente no interior das nanopartículas ocorre de forma lenta conforme relatado por outros estudos

(MALHEIROS; DAROIT; BRANDELLI, 2010; WEISS *et al.*, 2009). Além disso, espera-se que a encapsulação proteja os compostos ativos dos fatores ambientais como água, luz, oxigênio, pH, etc. mantendo sua ação bactericida por maior período de tempo (LIOLIOS *et al.*, 2009; MOZAFARI; JOHNSON; HATZIANTONIOU, 2008).

Tabela 2. Concentração Bactericida Mínima de carvacrol livre (controle), nanolipossomas contendo carvacrol (NLC) e nanocápsulas contendo carvacrol (NCC) contra os *pools* compostos por *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*

Amostra	CBM (mg/mL)			
	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Controle	1,77 ± 0,76 ^a	1,33 ± 0 ^b	1,33 ± 0 ^c	1,77 ± 0,76 ^c
NLC	3,53 ± 1,53 ^a	5,30 ± 0 ^a	5,30 ± 0 ^a	5,30 ± 0 ^a
NCC	3,31 ± 0 ^a	4,42 ± 1,91 ^a	3,31 ± 0 ^b	3,31 ± 0 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Neste estudo, os valores de CBM para o carvacrol livre variam de 1,33 a 1,77 mg/mL para todos os microrganismos avaliados (Tabela 2). Outros estudos com carvacrol livre determinaram CBM variando entre 1,6 e 3,2 mg/mL contra *E. coli* (SANTURIO *et al.*, 2011), 0,2 e 4,8 mg/mL contra *Salmonella* (BURT, 2004) e 6,0 mg/mL contra *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* (LIOLIOS *et al.*, 2009). Quando carvacrol foi encapsulado em nanopartículas de quitosana a CBM encontrada contra *S. aureus* e *E. coli* foi 4,1 e 8,2 mg/mL, respectivamente (KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011). Santos *et al.* (2015) ao testarem carvacrol incluso em ciclodextrina encontraram CBM de 1,1 mg/mL para *Salmonella* Typhimurium e 1,0 mg/mL para *E. coli*. Wang *et al.* (2009) ao encapsularem carvacrol em alginato de cálcio determinaram CBM de 100 µL/L para *E. coli*. Existe variabilidade entre os valores encontrados nas pesquisas pois são utilizadas diversas metodologias, sendo difícil realizar uma comparação (REYES-JURADO *et al.*, 2015). Além disso, cada cepa reage de maneira diferente aos óleos essenciais e seus compostos, portanto a utilização de *pool* de microrganismos em vez de uma única cepa para simular um cenário é mais realista (KIM; MARSHALL; WEI, 1995).

Apesar da utilização de diversas tecnologias para encapsulamento de óleos essenciais de tomilho e orégano e seus compostos, poucas informações acerca da CBM

destes compostos encapsulados em lipossomas e nanocápsulas poliméricas estão disponíveis (ENGEL *et al.*, 2017; GORTZI *et al.*, 2007; LIOLIOS *et al.*, 2009).

Ao comparar os valores determinados para CBM das NCC com os valores de CBM dos NLC, percebe-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as tecnologias de encapsulação para inibição de *Salmonella* e *Escherichia coli*. As bactérias Gram-negativas apresentam menor suscetibilidade antibacteriana a compostos hidrofóbicos como o carvacrol pois a membrana externa presente nestes microrganismos dificulta a penetração dos compostos, diminuindo a quantidade de antimicrobiano que atinge a parede celular dos microrganismos alvo (BURT, 2004). Porém, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as tecnologias de encapsulação contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. As NCC apresentaram maior eficácia na inibição destes microrganismos Gram-positivos do que os NLC. Considerando esse resultado e as características físico-químicas apresentadas na Tabela 1, as NCC foram selecionadas para os demais experimentos.

3.3. Cinética de multiplicação de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* *in vitro* em presença de agentes antimicrobianos

O teste de cinética de multiplicação bacteriana *in vitro* apresenta maior precisão na análise da eficiência do agente antimicrobiano quando comparado com CBM (ARHIN *et al.*, 2009). Através deste teste pode-se obter informações sobre as interações entre o agente antimicrobiano e o microrganismo, revelando se os efeitos do antimicrobiano são dependentes do tempo ou da concentração (PFALLER; SHEEHAN; REX, 2004). A contagem do número de células de *S. aureus*, *Salmonella*, *E. coli* e *L. monocytogenes* que se desenvolveram nos tubos contendo soluções de carvacrol livre e NCC em diferentes concentrações durante 48 horas de incubação estão demonstrados na Figura 1. O inóculo inicial foi de aproximadamente 8 log UFC/mL. Todos os microrganismos foram inibidos em tempos curtos de contato (0,25 h) e após 48 horas de tratamento com carvacrol livre nas concentrações de 2 CBM e CBM (Figura 1). Porém, quando utilizou-se concentrações subletais ($\frac{1}{2}$ CBM e $\frac{1}{4}$ CBM) de carvacrol livre *L. monocytogenes* (Figura 1c) foi o único microrganismo que apresentou crescimento. A população de *L. monocytogenes* (Figura 1c) para concentrações de $\frac{1}{2}$ CBM e $\frac{1}{4}$ CBM de carvacrol livre foi de 6,2 log

UFC/mL e 5 log UFC/mL, respectivamente, em 0,25 h e de 7,1 log UFC/mL e 7,9 log UFC/mL, respectivamente, após 48 horas de tratamento.

Observa-se que o tratamento durante 48 horas com NCC em concentrações de 2 CBM e CBM foi eficiente para inibir totalmente o crescimento de *S. aureus* (Figura 1d), *Salmonella* (Figura 1a) e *E. coli* (Figura 1b), porém para *L. monocytogenes* (Figura 1c) ambas concentrações de NCC provocaram redução de 1,0 log UFC/mL. Possivelmente o *pool* de *L. monocytogenes* mostrou-se mais resistente por apresentar diferentes graus de resistência a antimicrobianos conforme a cepa (BUNCIC *et al.*, 2001; CAPITA *et al.*, 2001). Esse comportamento não foi repetido pela *Salmonella*, que em diversos estudos demonstrou pequena variação entre os sorotipos na cinética de crescimento em presença de fatores antimicrobianos (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2011; OSCAR, 2000), concordando com o resultado encontrado nesse trabalho, onde o *pool* de *Salmonella* mostrou pouca resistência ao tratamento com antimicrobianos.

Quando os testes foram realizados com concentrações subletais de NCC ($\frac{1}{2}$ CBM e $\frac{1}{4}$ CBM) os resultados foram bastante diversos, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre os testes para diferentes microrganismos (Figura 1). Para *S. aureus* (Figura 1d) $\frac{1}{2}$ CBM de NCC causaram redução de log 2,7 log UFC/mL enquanto $\frac{1}{4}$ CBM de NCC causaram redução de 1,3 log UFC/mL, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) entre si. Para *Salmonella* (Figura 1a) e *E. coli* (Figura 1b) $\frac{1}{2}$ CBM causou inibição total e $\frac{1}{4}$ CBM provocou redução de 1,0 log UFC/mL, demonstrando que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre ambos microrganismos. Para *L. monocytogenes* concentração de NCC $\frac{1}{2}$ CBM causou redução de 1,5 log UFC/mL e NCC $\frac{1}{4}$ provocou redução de 2,3 log UFC/mL demonstrando diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas concentrações. A exposição de microrganismos a concentrações subletais de sanitizantes químicos pode favorecer ou suprimir mecanismos de expressão gênica dos microrganismos, modificando sua resposta ao stress causado pelo antimicrobiano (BRASCHI *et al.*, 2018).

Avaliando a ação das NCC em tempos de contato curtos pode-se perceber que o único microrganismo que apresentou inibição abaixo do limite de detecção da técnica quando concentração das NCC foi 2 CBM e CBM no tempo 0,25 h foi *Salmonella* (Figura 1a), enquanto *E. coli* (Figura 1b) no tempo 0,25 h apresentou inibição total quando concentração das NCC era 2 CBM, porém com concentração de CBM a inibição total deste microrganismo ocorreu somente em 2 horas. *S. aureus* (Figura 1d) no tempo 0,25 h apresentou crescimento de 3,5 log UFC/mL e 5,7 log UFC/mL para concentrações de

NCC de 2 CBM e CBM, respectivamente, obtendo-se inibição total para este microrganismo somente com 48 horas de experimento. Por outro lado, *L. monocytogenes* (Figura 1c) mostrou-se o microrganismo mais resistente ao antimicrobiano encapsulado durante as 48 horas de ensaio, apresentando para concentração de 2 CBM de NCC no tempo 0,25 h população de 5,0 log UFC/mL e 9,7 log UFC/mL após 48 horas, e para concentração de NCC CBM no tempo 0,25 h população de 5,7 log UFC/mL e 9,3 log UFC/mL após 48 horas. Perez-Conesa et. al (2006) reportaram que *E. coli* O157:H7 demonstrou maior sensibilidade a carvacrol encapsulado em Surfynol com concentração de 0,9% em comparação com *L. monocytogenes*. De Sousa et al. (2012) demonstraram que *L. monocytogenes* apresentou redução de 4 log UFC/mL quando exposta a uma solução de carvacrol livre (0,6 µL/mL) durante 24 horas em caldo de vegetais, enquanto Barbosa et al. (2016) observaram que após 5 minutos de contato de uma solução de óleo essencial de orégano (0,6 µL/mL) com vegetais folhosos houve redução de 3 log UFC/mL nas contagens de *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Enteritidis*. Xu et al. (2008) demonstraram que uma solução de carvacrol 400 mg/L causa redução da contagem de *E. coli* abaixo do nível de detecção em 6 horas, porém uma solução com 800 mg/L causa a mesma redução de população em 30 minutos.

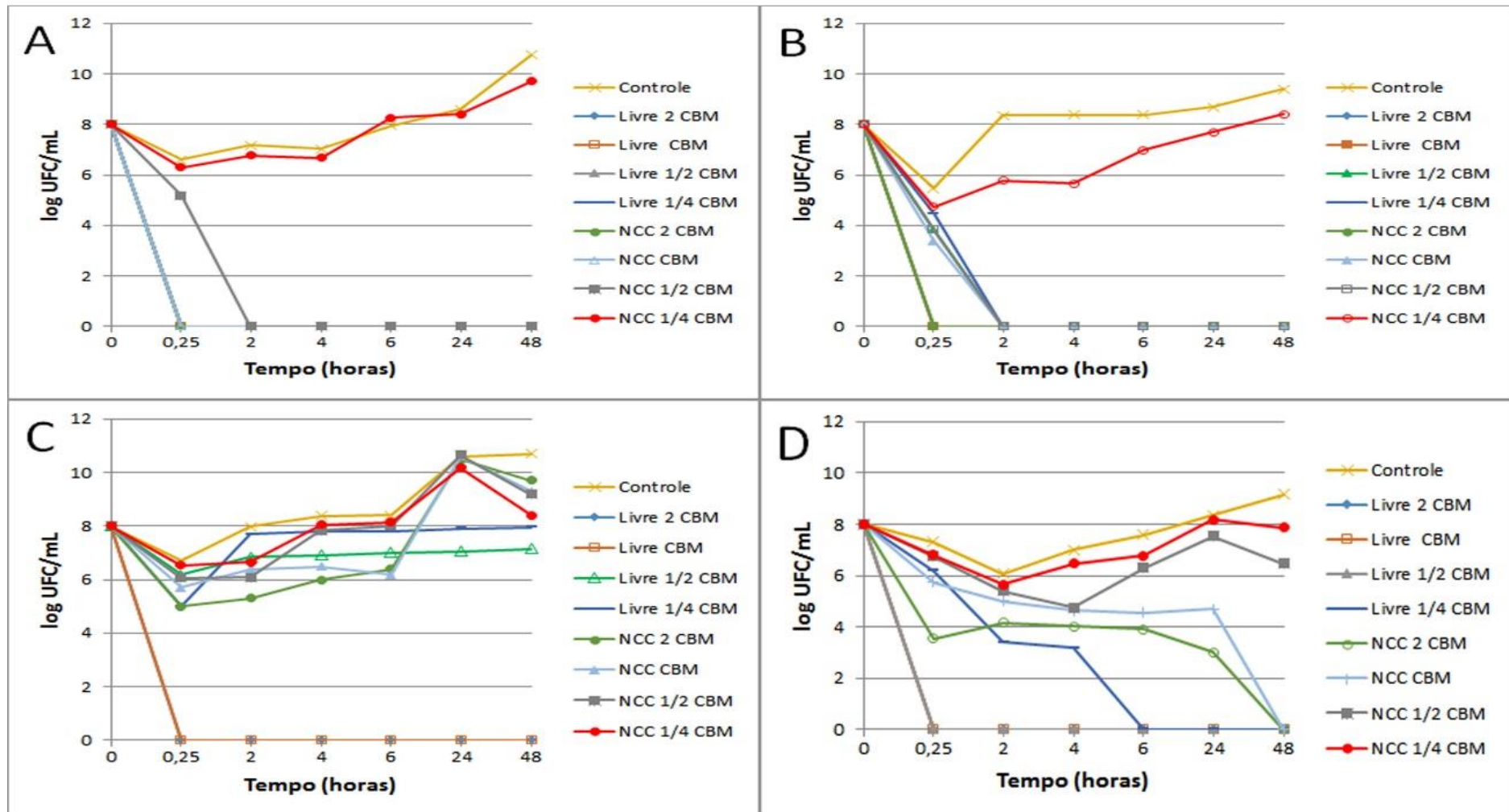


Figura 1. Cinética de multiplicação de pools de *Salmonella* (A), *Escherichia coli* (B), *Listeria monocytogenes* (C) e *Staphylococcus aureus* (D) *in vitro* utilizando nanocápsulas contendo carvacrol (NCC) em diferentes concentrações. O controle é a população de cada microrganismo sem adição de antimicrobiano.

3.4. Adesão microbiana e ação antimicrobiana

Na literatura são encontrados diversos estudos sobre o efeito antimicrobiano de óleos essenciais e seus compostos em células planctônicas (células não aderidas a superfícies), porém poucos estudos são realizados em células fracamente aderidas, ou seja, a primeira etapa para formação de biofilmes (ENGEL *et al.*, 2017; KEREKES *et al.*, 2013; SIENIAWSKA *et al.*, 2013; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010; SZCZEPANSKI; LIPSKI, 2013). Dentre os materiais mais utilizados na área de alimentos suscetíveis à adesão microbiana está o aço inoxidável (HOOD; ZOTTOLA, 1997).

Neste trabalho, após 15 minutos de contato de um inóculo inicial ajustado para 8 log UFC/mL, todos os microrganismos avaliados aderiram ao aço inoxidável em torno de 6 a 7 log UFC/cm², conforme mostrado na Figura 2. Outros autores encontraram valores semelhantes para adesão microbiana em aço inoxidável. Por exemplo, no estudo realizado por Engel *et al.* (2017) após 15 minutos de contato entre *Salmonella* e aço inoxidável o número de células aderidas foi de 5,5 a 6,5 log UFC/cm², enquanto no estudo de Valeriano *et al.* (2012) após 48 h de contato do aço com *Salmonella* o número de células aderidas foi de 5,7 log UFC/cm². De maneira similar valores próximos a 6 log UFC/cm² de adesão foram encontrados para *Staphylococcus aureus* após 15 minutos de contato com o aço (ENGEL *et al.*, 2017) e *S. aureus* e *E. coli* O157:H7 após 2 horas (BAE; BAEK; LEE, 2012).

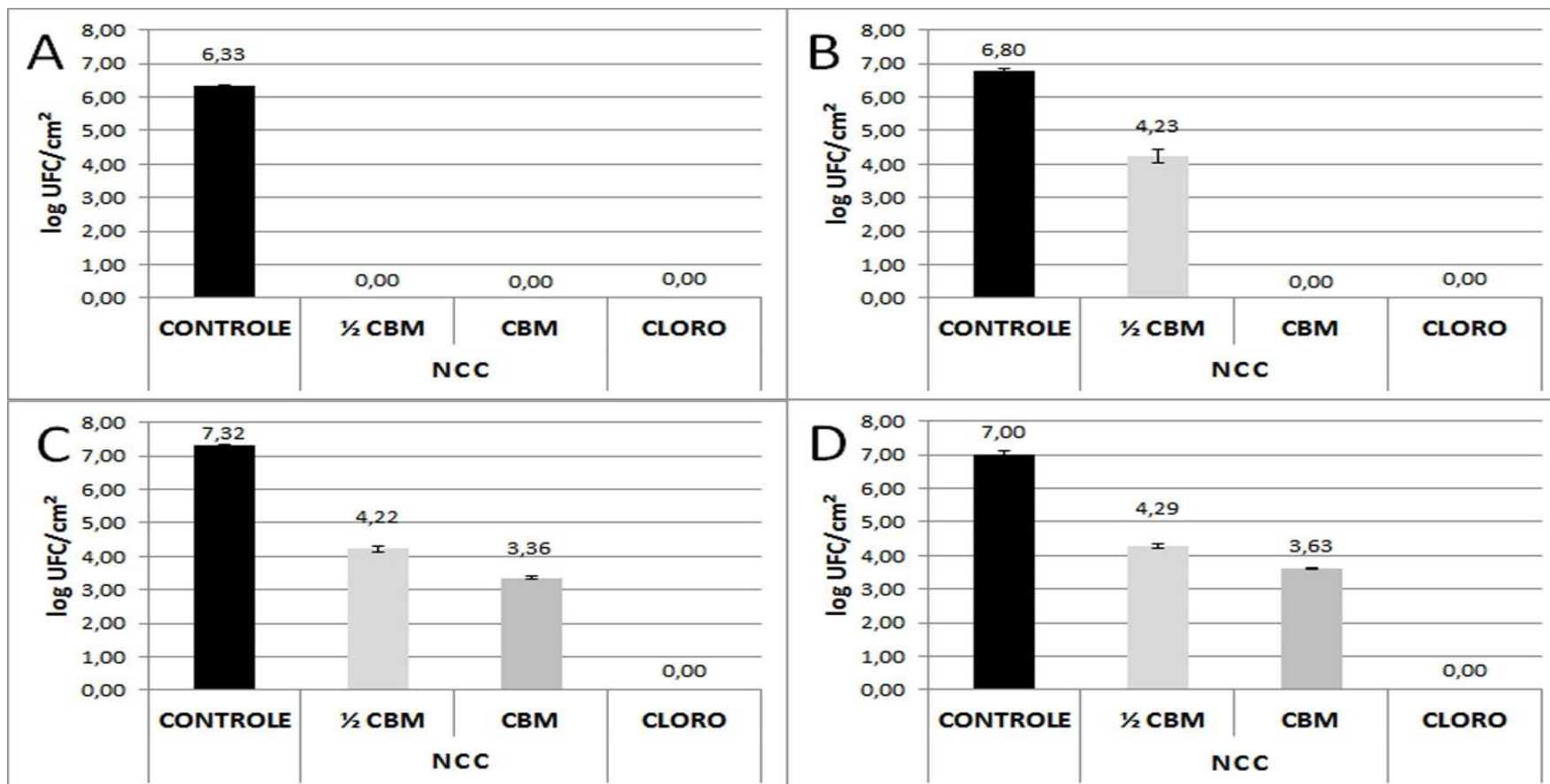


Figura 2. Inibição de *pools* de *Salmonella* (A), *Escherichia coli* (B), *Listeria monocytogenes* (C) e *Staphylococcus aureus* (D) aderidos em *coupons* de aço inoxidável utilizando nanocápsulas contendo carvacrol (NCC) em diferentes concentrações após 1 minuto de contato. O controle refere-se a população de cada microrganismo que aderiu à superfície do *coupon* de aço inoxidável sem adição de antimicrobiano.

Em relação ao tempo para desinfecção das superfícies, a maioria dos estudos com óleos essenciais demonstrou a necessidade de 1 hora de contato, tornando esses processos antieconômicos e impraticáveis para uso industrial (VIDÁCS *et al.*, 2018). Já o cloro para ter ação bactericida deve ser aplicado em superfícies com uma concentração entre 100 e 200 ppm de cloro livre com tempo de contato mínimo de 10 minutos (BRASIL, 2016; FDA, 2018). Neste trabalho, a superfície de contato (aço inoxidável) não apresentava sujidades e outros microrganismos além das bactérias utilizadas para adesão. A solução de cloro, utilizada como controle negativo, inibiu totalmente o crescimento dos microrganismos após 1 minuto de contato com o *coupon* de aço inoxidável, comportamento repetido para todos os microrganismos testados. Para as NCC os resultados foram bastante diversos, conforme demonstrado na Figura 2. O melhor resultado ocorreu para *Salmonella* (Figura 2a) considerando que ½ CBM (1,65 mg/mL) foi suficiente para reduzir a população aderida para valores abaixo do limite de detecção do método. Para *E. coli* (Figura 2b), *L. monocytogenes* (Figura 2c) e *S. aureus* (Figura 2d) houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os testes para diferentes concentrações. *E. coli* foi inibida abaixo do limite de detecção do método utilizando a CBM (4,42 mg/mL) de NCC enquanto ½ CBM (2,21 mg/mL) reduziu aproximadamente 2,5 log UFC/cm². Para *L. monocytogenes*, quando a concentração de NCC era igual a CBM (3,31 mg/mL), a redução foi de 4 log UFC/cm² e de 3 log UFC/cm² quando a concentração de NCC era igual a ½ CBM (1,65 mg/mL). Dentre os microrganismos testados, *S. aureus* foi o que apresentou maior resistência às nanocápsulas contendo carvacrol, apresentando redução de 3,5 log UFC/cm² quando a concentração de NCC era igual a CBM (3,31 mg/mL) e de 2,5 log UFC/cm² quando a concentração de NCC era igual a ½ CBM (1,65 mg/mL).

Biofilmes maduros são de difícil remoção, apresentando grande resistência a sanitizantes, portanto evitar a adesão inicial de microrganismos às superfícies são estratégias de extrema importância para as indústrias (SINDE; CARBALLO, 2000; SZCZEPANSKI; LIPSKI, 2013). Percebe-se que com 1 minuto de contato as NCC com concentração igual a CBM foram eficientes para inibir *Salmonella* (Figura 2a) e *E. coli* (Figura 2b), porém para *L. monocytogenes* (Figura 2c) e *S. aureus* (Figura 2d) as NCC com concentração igual a CBM conseguiram diminuir a população microbiana em 50 %, o que pode indicar discrepâncias quando comparados com os resultados de CBM (Tabela 2); no entanto, deve-se salientar que o teste para determinação de CBMs foi realizado em caldo BHI, com tempo de incubação de 18 - 24 horas enquanto os testes para redução de bactérias aderidas foram conduzidos em tempos menores (1 min). Além disso, a resistência a sanitizantes de bactérias aderidas é geralmente

maior do que a de bactérias planctônicas (NOSTRO *et al.*, 2007; TONDO *et al.*, 2010). Campana & Baffone, (2018), utilizando solução de 1 % de carvacrol livre em biofilmes de *E. coli* O157:H7 aderidos em aço inoxidável, observaram redução de 5 log UFC/cm² e 5,5 log UFC/cm², para tempos de contato de 30 segundos e 5 minutos, respectivamente. Trevisan *et al.* (2018) reportaram redução de 5 log UFC/cm² após 1 hora de contato entre a superfície de aço inoxidável e solução de carvacrol livre (1,25 mg/mL) em biofilme de *S. Typhimurium*, enquanto Engel *et al.* (2017) demonstraram redução de 1,7 log UFC/cm² em *Salmonella* aderida em *coupons* de aço inoxidável após contato de 1 minuto com solução de carvacrol livre com concentração de 0,331 mg/mL. Os resultados não demonstram muita similaridade com os dados obtidos neste estudo, porém, devido às diferenças existentes entre cepas de mesma espécie microbiana os resultados de pesquisas realizados com uma determinada cepa não podem ser estendidos com segurança a qualquer outra cepa da mesma espécie (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2011; WHITING; GOLDEN, 2002). Carvacrol utilizado em concentrações subletais demonstrou capacidade de inibir formação de biofilme de *S. aureus* em superfícies de poliestireno (NOSTRO *et al.*, 2007) e aço inoxidável (RODRIGUES *et al.*, 2017) e também de biofilmes de *Salmonella* em superfícies de poliestireno (AMARAL *et al.*, 2015; SONI *et al.*, 2013). Possivelmente a inibição da formação de biofilme ocorre porque os óleos essenciais quando em concentrações subletais interagem com as proteínas dos microrganismos, reduzindo sua fixação à superfície (NOSTRO *et al.*, 2007).

4. CONCLUSÃO

Carvacrol foi adequadamente encapsulado em nanolipossomas e nanocápsulas poliméricas. Ambas apresentaram tamanho adequado, baixo índice de polidispersidade e alta eficiência de encapsulação. Entretanto, as nanocápsulas poliméricas contendo carvacrol apresentaram menor tamanho e potencial zeta positivo, favorecendo a interação com microrganismos. As soluções antimicrobianas quando usadas em concentrações iguais ou superiores à CBM demonstraram ação bactericida contra *pools* de *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella*, não apresentando as mesmas propriedades contra *L. monocytogenes* em testes *in vitro*. Considerando a população aderida ao aço inoxidável, os efeitos antimicrobianos das nanocápsulas contendo carvacrol demonstraram-se dependentes do *pool* bacteriano (*S. aureus*, *Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes*) e da concentração utilizada (2 CMB, CBM e ½ CBM). Em ambos os testes (adesão microbiana seguida de ação antimicrobiana e cinética de

multiplicação) a solução contendo nanocápsulas de carvacrol mostrou-se mais eficiente contra *Salmonella* seguido por *E. coli*, porém os resultados obtidos para *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* demonstraram que as nanopartículas apresentaram eficácia também contra esses microrganismos. Esse resultado sugere que carvacrol encapsulado em nanopartículas poliméricas demonstra potencial para ser utilizado como sanitizantes de superfícies, sendo que mais estudos são necessários para essa finalidade.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, V. *et al.* Effect of carvacrol and thymol on *Salmonella* spp. biofilms on polypropylene. **International Journal of Food Science and Technology**, 2015. v. 50, n. 12, p. 2639–2643.

ARHIN, F. F. *et al.* Time-kill kinetics of oritavancin and comparator agents against *Streptococcus pyogenes*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2009. v. 34, n. 6, p. 550–554.

ARIAS, J. L. *et al.* Stability of fenbendazole suspensions for veterinary use. Correlation between zeta potential and sedimentation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008. v. 34, n. 4–5, p. 257–262.

BAE, Y.; BAEK, S.; LEE, S. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, 2012. v. 153, n. 3, p. 465–473.

BARBOSA, I. *et al.* Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in leafy vegetables. **Food Control**, 2016. v. 59, p. 468–477.

BLANCO-PADILLA, A. *et al.* Food antimicrobials nanocarriers. **Scientific World Journal**, 2014. v. 2014, p. 1–11.

BRASIL. **RDC N°110, de 6 de setembro de 2016. Regulamento Técnico que estabelece os requisitos mínimos para o registro de produtos saneantes categorizados como água sanitária e alvejantes à base de hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio.**

BRASIL. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2018.

BRIDIER, A. *et al.* Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, 2015. v. 45, n. 1, p. 167–178.

BUNCIC, S. *et al.* Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? **International Journal of Food Microbiology**, 2001. v. 65, n. 3, p. 201–212.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, 2004. v. 94, p. 223–253.

BURT, S. A. *et al.* Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007. v. 73, n. 14, p. 4484–4490.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1996. v. 85, n. 5, p. 530–536.

CAMPANA, R.; BAFFONE, W. Carvacrol efficacy in reducing microbial biofilms on stainless steel and in limiting re-growth of injured cells. **Food Control**, 2018. v. 90, p. 10–17.

CAPITA, R. *et al.* Influence of strain and trisodium phosphate concentration on growth parameters of *Listeria monocytogenes in vitro*. **Letters in Applied Microbiology**, 2001. v. 32, n. 6, p. 428–432.

CHIA, T. W. R. *et al.* Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, 2009. v. 26, n. 8, p. 853–859.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard edition**. Wayne: CLSI, 2008.

DONSÌ, F. *et al.* Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, 2011. v. 44, n. 9, p. 1908–1914.

EFSA. **Register of Feed Additives, 226th edition**. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2013.

ENGEL, J. B. *et al.* Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel.

International Journal of Food Microbiology, 2017. v. 252, n. March, p. 18–23.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL [ECDC] & EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY [EFSA]. The European Union Summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017.

EFSA Journal, 2018. v. 12, n. 2, p. 1–312.

FALCÓ, I. *et al.* Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2018. n. February, p. 0–1.

FDA. **CFR - Code of Federal Regulations Title 21 CFR 312.35. Federal Register Final Rule**. Office of the Federal Register.

FERREIRA, C. *et al.* **Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2010.

GARCIA, L. S.; ISENBERG, H. D. **Clinical microbiology procedures handbook**. Washington: ASM Press, 2010.

GORTZI, O. *et al.* Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. **Molecules**, 2007. v. 12, n. 5, p. 932–945.

GUTERRES, S. *et al.* Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, 1995. v. 113, n. 1, p. 57–63.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms

during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, 1997. v. 37, p. 145–153.

HRUDEY, S. *et al.* Evaluating evidence for association of human bladder cancer with drinking-water chlorination disinfection by-products. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, 2015. v. 18, p. 213–241.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, 2012. v. 3, n. JAN, p. 1–24.

JAGADISH, K. *et al.* Ecofriendly Synthesis of Metal/Metal Oxide Nanoparticles and Their Application in Food Packaging and Food Preservation. **Impact of Nanoscience in the Food Industry**, 2018. p. 197–216.

KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2011. v. 84, n. 1, p. 163–171.

KEREKES, E. B. *et al.* Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, 2013. v. 115, n. 4, p. 933–942.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. I. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1995. v. 43, n. 11, p. 2839–2845.

KLANG, V. *et al.* Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, 2012. v. 43, n. 2–3, p. 85–103.

KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2011. v. 21, n. 1, p. 55–76.

KUMAR, A. *et al.* Development and characterization of liposomal drug delivery system for

Nimesulide. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2010. v. 2, n. SUPPL. 4, p. 87–89.

LEE, B.; YUN, Y.; PARK, K. Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. **Chemical Engineering Science**, 2015. v. 125, p. 158–164.

LEO, E. *et al.* In vitro evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. **International Journal of Pharmaceutics**, 2004. v. 278, n. 1, p. 133–141.

LI, J.; MCLANDSBOROUGH, L. A. The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. **International Journal of Food Microbiology**, 1999. v. 53, n. 2–3, p. 185–193.

LI, W. *et al.* Influence of surfactant and oil composition on the stability and antibacterial activity of eugenol nanoemulsions. **LWT - Food Science and Technology**, 2015. v. 62, n. 1, p. 39–47.

LIANO, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella* Enterica kinetic behavior. **Food Microbiology**, 2011. v. 28, n. 4, p. 828–837.

LIOLIOS, C. C. *et al.* Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry**, 2009. v. 112, n. 1, p. 77–83.

LOPES, N.; PINILLA, C.; BRANDELLI, A. Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior. **Food Hydrocolloids**, 2017. v. 70, p. 1–7.

LU, C.; CHIU, H. Adsorption of zinc(II) from water with purified carbon nanotubes. **Chemical Engineering Science**, 2006. v. 61, n. 4, p. 1138–1145.

MAISANABA, S. *et al.* New advances in active packaging incorporated with essential oils or

their main components for food preservation. **Food Reviews International**, 2017. v. 33, n. 5, p. 447–515.

MALHEIROS, P. S. *et al.* Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, 2010. v. 27, n. 1, p. 175–178.

MALHEIROS, P. S. . *et al.* Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. **Journal of Food Safety**, 2009. v. 29, n. 2009, p. 302–317.

MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D.; BRANDELLI, A. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. **Trends in Food Science and Technology**, 2010. v. 21, n. 1, p. 284–292.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, D. Antiseptics and disinfectants : activity , action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 1999. v. 12, n. 1, p. 147–179.

MILES, A.; MISRA, S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, 1938. v. 38, p. 732–749.

MOHAMMADI, G. *et al.* Preparation, physicochemical characterization and anti-fungal evaluation of the Nystatin-loaded Eudragit RS100/PLGA nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2017. v. 38, p. 90–96.

MORONES, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, 2007. v. 16, n. 10, p. 2346–2353.

MOZAFARI, M.; JOHNSON, C.; HATZIANTONIOU, S. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, 2008. v. 18, n. 1, p. 309–327.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. **National Nanotechnology Initiative Strategic Plan. Executive Office of the President of the United States.**

NOSTRO, A. *et al.* Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and

Staphylococcus epidermidis biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, 2007. v. 56, n. 4, p. 519–523.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polymers in obtaining drug delivery systems. **Electronic Pharmacy Magazine**, 2006. v. 3, n. 1, p. 29–35.

OSCAR, T. P. Variation of lag time and specific growth rate among 11 strains of *Salmonella* inoculated onto sterile ground chicken breast burgers and incubated at 25 ° C. **Journal of Food Safety**, 2000. v. 20, p. 225–236.

PATRA, C. *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical sciences**, 2017. v. 3, n. 1, p. 33–45.

PEREZ-CONESA, D.; MCLANDSBOROUGH, L.; WEISS, J. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 : H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. **Journal of Food Protection**, 2006. v. 69, n. 12, p. 2947–2954.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, 2004. v. 17, n. 2, p. 268–280.

PHAECHAMUD, T.; THUREIN, S. M.; CHANTADEE, T. Role of clove oil in solvent exchange-induced doxycycline hyclate-loaded Eudragit RS in situ forming gel. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2018. v. 13, n. 2, p. 131–142.

PHILLIPS, C. A. Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. **International Journal of Food Science and Technology**, 2016. v. 51, n. 8, p. 1731–1743.

RAI, R. V.; BAI, J. A. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, 2011. n. February, p. 197–209.

- RAIMONDI, F. *et al.* Nanoparticles in energy technology: Examples from electrochemistry and catalysis. **Angewandte Chemie - International Edition**, 2005. v. 44, n. 15, p. 2190–2209.
- RANDAZZO, W. *et al.* Effect of green tea extract on enteric viruses and its application as natural sanitizer. **Food Microbiology**, 2017. v. 66, p. 150–156.
- REIS, C. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2006. v. 2, n. 1, p. 8–21.
- REYES-JURADO, F. *et al.* Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. **Food Engineering Reviews**, 2015. v. 7, n. 3, p. 275–297.
- RODRIGUES, J. B. *et al.* Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. **Food Control**, 2017. v. 73, p. 1237–1246.
- ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, 2000. v. 61, n. 1, p. 81–85.
- SÁNCHEZ, G.; AZNAR, R. Evaluation of natural compounds of plant origin for inactivation of enteric viruses. **Food and Environmental Virology**, 2015. v. 7, n. 2, p. 183–187.
- SANTOS, E. H. *et al.* Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT - Food Science and Technology**, 2015. v. 60, n. 1, p. 583–592.
- SANTOS, S. S. *et al.* Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, 2013. v. 33, n. 3, p. 1389–1394.
- SANTURIO, D. *et al.* Antimicrobial activity of spice essential oils against *Escherichia coli* strains isolated from poultry and cattle. **Ciência Rural**, 2011. v. 41, n. 6, p. 1051–1056.

SATPATHY, S. *et al.* Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2016. v. 7, p. 56–66.

SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens.

Emerging Infectious Diseases, 2011. v. 17, n. 1, p. 7–15.

SCENIHR. Scientific Basis for the Definition of the Term “ Nanomaterial ”. **Scientific**

Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 2010. n. July, p. 1–43.

SCHAFFAZICK, S. *et al.* Characterization and physical-chemical stability of polymer nanoparticulate systems for drug administration. **New Chemistry**, 2003. v. 26, n. 5, p. 726–737.

SEBAALY, C. *et al.* Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes.

Food Chemistry, 2015. v. 178, p. 52–62.

SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. **International Journal of Nanomedicine**, 2012. v. 7, p. 2767–2781.

SHAABAN, H. A.; EDRIS, A. E. Factors Affecting the Phase Behavior and Antimicrobial Activity of Carvacrol Microemulsions. **Journal of Oleo Science J. Oleo Sci**, 2015. v. 64, n. 4, p. 393–404.

SHAO, Y. *et al.* Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, 2018. v. 193, n. March, p. 144–152.

SIENIAWSKA, E. *et al.* Antimicrobial efficacy of *Mutellina purpurea* essential oil and α -pinene against *Staphylococcus epidermidis* grown in planktonic and biofilm cultures.

Industrial Crops and Products, 2013. v. 51, p. 152–157.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.; VIEIRA, M. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, 2010. v. 43, n. 4, p. 573–583.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* to

stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, 2000. v. 17, p. 439–447.

SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, 2014. v. 64, p. 27–37.

SONI, K. *et al.* Inhibition and inactivation of *Salmonella* Typhimurium biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. **Journal of Food Protection**, 2013. v. 76, n. 2, p. 205–212.

SOUSA, J. DE *et al.* Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, 2012. v. 154, n. 3, p. 145–151.

SRIVIDYA, N.; GHOORA, M. D.; PADMANABH, P. R. **Antimicrobial nanotechnology: research implications and prospects in food safety**. Anantapur: Elsevier Inc., 2017.

STOJKOVIĆ, D. *et al.* In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013. v. 93, n. 13, p. 3205–3208.

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, 2013. v. 36, n. 1, p. 224–229.

TONDO, E. C. *et al.* Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010. v. 41, p. 1027–1037.

TRESSE, O. *et al.* Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. **Journal of Food Protection**, 2007. v. 70, n. 7, p. 1569–1578.

TREVISAN, D. *et al.* Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2018. v.

54, n. 1, p. 1–8.

VALERIANO, C. *et al.* The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, 2012. v. 25, n. 2, p. 673–677.

VIDÁCS, A. *et al.* Optimization of essential oil-based natural disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surfaces. **Journal of Molecular Liquids**, 2018. v. 255, p. 257–262.

WANG, H. *et al.* Biofilm formation of *Yersinia enterocolitica* and its persistence following treatment with different sanitation agents. **Food Control**, 2017. v. 73, p. 433–437.

WANG, Q. *et al.* In vitro evaluation of the activity of microencapsulated carvacrol against *Escherichia coli* with K88 pili. **Journal of Applied Microbiology**, 2009. v. 107, n. 6, p. 1781–1788.

WEISS, J. *et al.* **Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials**. New York: Academic Press, 2009.

WHITING, R. C.; GOLDEN, M. H. Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation, and toxin production in broth. **International Journal of Food Microbiology**, 2002. v. 75, n. 1–2, p. 127–133.

XU, J. *et al.* The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, 2008. v. 47, n. 3, p. 174–179.

YIN, J.; XIANG, C.; SONG, X. Nanoencapsulation of psoralidin via chitosan and Eudragit S100 for enhancement of oral bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, 2016. v. 510, n. 1, p. 203–209.

ZAND, A. *et al.* Comprehensive study of sporicidal and sporstatic effect of CuO and AgO metal nanoparticles upon spore of *Clostridium botulinum* type E. **African Journal of Microbiology Research**, 2012. v. 6, n. 7, p. 1417–1422.

CAPÍTULO 3 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO

5 DISCUSSÃO GERAL

A utilização de nanotecnologia para encapsulação de antimicrobianos visando a inibição de microrganismos de importância em alimentos ainda é pouco explorada. Este trabalho traz informações importantes acerca da utilização desta tecnologia inovadora, juntamente com antimicrobianos naturais, para o desenvolvimento de sanitizantes para superfícies de contato com alimentos. Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de encapsular carvacrol utilizando duas tecnologias distintas: nanolipossomas e nanocápsulas.

Ambas tecnologias demonstraram capacidade de encapsulação de carvacrol e formaram partículas com tamanho adequado para serem considerados nanotecnológicos na área da saúde, ou seja, menores que 1000 nm (SCENIHR, 2010).

Nanolipossomas contendo carvacrol (NLC) foram preparados através da técnica de hidratação do filme lipídico, apresentando diâmetro médio de 270,83 nm, polidispersidade de 0,22, eficiência de encapsulação de 98,02 % e potencial zeta de + 8,64 mV. Concentração bactericida mínima (CBM) dos NLC foi de 3,53 mg/mL contra *Salmonella* e 5,30 mg/mL contra os demais microrganismos.

Nanocápsulas contendo carvacrol (NCC) foram preparadas usando técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, apresentando diâmetro médio de 159,30 nm, polidispersidade de 0,22, eficiência de encapsulação de 97,11 % e potencial zeta de + 44,84 mV. CBM das NCC foi de 4,42 mg/mL contra *E. coli* e de 3,31 mg/mL contra os demais microrganismos.

Em relação ao tamanho, as NCC foram menores do que os NLC, o que pode facilitar sua penetração através da membrana citoplasmática dos microrganismos (MORONES *et al.*, 2007; RAIMONDI *et al.*, 2005; SEIL; WEBSTER, 2012). Quanto à análise de polidispersidade verifica-se que ambas formulações apresentaram resultados semelhantes e próximos a 0,2, sugerindo menor probabilidade de agregação das nanopartículas (KLANG *et al.*, 2012; KLANG; VALENTA, 2011). Já o potencial zeta de ambas formulações apresentaram resultado positivo, favorecendo a atração eletrostática com os microrganismos, os quais apresentam carga superficial negativa (SHAABAN; EDRIS, 2015; ZAND *et al.*, 2012). O potencial zeta é usado para avaliar estabilidade de soluções, pois quanto maior seu valor absoluto, menor a possibilidade de colisões das partículas e maior sua estabilidade (ARIAS *et al.*, 2008; MALHEIROS; DAROIT, D.; BRANDELLI,

2010). Possivelmente as NCC apresentaram maior potencial zeta devido à natureza catiônica do polímero encapsulante, Eudragit (MOHAMMADI *et al.*, 2017; OLIVEIRA; LIMA, 2006), portanto as NCC possivelmente apresentem maior estabilidade do que NLC. Ambas as formulações apresentaram alta eficiência de encapsulação, possivelmente devido à natureza hidrofóbica do composto ativo (carvacrol) encapsulado bem como dos agentes encapsulantes (Eudragit e Lipoid S100). A alta lipofilicidade do Eudragit proporciona rápida formação da nanocápsula, havendo menor dispersão de carvacrol na fase aquosa (LEO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2013). Já os lipossomas apresentam facilidade em encapsular compostos oleosos em sua membrana, obtendo-se alta eficiência de encapsulação de óleos essenciais e seus compostos (KUMAR *et al.*, 2010).

A CBM dos NLC foi de 3,53 mg/mL contra *Salmonella* e 5,30 mg/mL contra *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, enquanto que a CBM das NCC foi de 4,42 mg/mL contra *E. coli* e de 3,31 mg/mL contra os demais microrganismos. Considerando esse resultado e as características físico-químicas apresentadas na tabela 1 do artigo 2 (menor tamanho e maior potencial zeta positivo), as NCC foram selecionadas para os demais experimentos.

Para análise de eficiência de antimicrobianos o teste de cinética de multiplicação bacteriana *in vitro* apresenta maior precisão quando comparado à CBM, pois revela se os efeitos do antimicrobiano são dependentes do tempo ou da concentração (ARHIN *et al.*, 2009; PFALLER; SHEEHAN; REX, 2004). Neste teste, ao avaliar a ação das NCC, verificou-se que quando usadas em concentrações letais (2CBM e CBM) em tempos de contato curtos (0,25 h) o único microrganismo que apresentou inibição abaixo do limite de detecção do método foi *Salmonella*, enquanto *L. monocytogenes* mostrou-se o microrganismo mais resistente, apresentando população de ≈ 5 log UFC/mL para ambas concentrações neste tempo. Já quando avaliou-se a ação das NCC após tratamento de 48 horas verificou-se que ambas concentrações foram eficientes para inibição abaixo do limite de detecção do método de *S. aureus*, *Salmonella* e *E. coli*, porém *L. monocytogenes* apresentou redução de ≈ 1 log UFC/mL em relação ao controle para ambas concentrações nesse tempo. Ao avaliar a ação de carvacrol livre em concentrações de 2 CBM e CBM observou-se que tanto com 0,25 horas como em 48 horas de tratamento houve inibição abaixo do limite de detecção do método para todos os microrganismos avaliados.

O teste de adesão bacteriana em *coupons* de aço inoxidável AISI 304 demonstrou que após inóculo inicial de 8 log UFC/cm² ocorreu adesão variando entre 6 log e 7 UFC/cm² para todos microrganismos avaliados. A ação antimicrobiana das NCC foi avaliada em

diferentes concentrações após 1 minuto de contato, observando-se que ½ CBM e CBM de NCC inibiram *Salmonella* abaixo do limite de detecção do método enquanto *E. coli* foi inibida quando utilizou-se CBM de NCC. Os resultados mostraram que após 2 horas de contato ½ CBM de NCC inibiram *Salmonella* e *E. coli* abaixo do limite de detecção do método. A população de *L. monocytogenes* foi reduzida em 2 log/UFC em 6 horas e *S. aureus* foi inibido abaixo do limite de detecção da técnica em 48 horas utilizando a CBM de NCC. Demonstrando maior resistência, *S. aureus* e *L. monocytogenes* apresentaram resultados semelhantes, com redução de $\approx 4 \log \text{ UFC/cm}^2$ para CBM de NCC e de $\approx 3 \log \text{ UFC/cm}^2$ para ½ CBM de NCC.

Portanto, este trabalho mostrou que o carvacrol encapsulado em nanocápsulas poliméricas apresenta potencial para o desenvolvimento de um sanitizante alternativo capaz de inibir microrganismos de importância em alimentos, especialmente *Salmonella* e *E. coli*, aderidos em aço inoxidável. Mais estudos e a aprovação por órgãos regulamentadores são necessários para uma possível aplicação na indústria de alimentos.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

- Carvacrol foi adequadamente encapsulado em nanolipossomas e nanocápsulas poliméricas. Ambas apresentaram tamanho adequado, baixo índice de polidispersidade e alta eficiência de encapsulação.
- As NCC apresentaram menor tamanho e potencial zeta mais positivo do que os NLC, o que sugere maior capacidade de interação com microrganismos.
- Para determinação de CBM foi necessária uma concentração de carvacrol livre menor em comparação ao carvacrol encapsulado em ambas nanopartículas, NCC e NLC, sugerindo liberação lenta do composto.
- No teste de cinética de multiplicação *in vitro* as NCC mostraram maior eficiência contra *Salmonella* seguida de *E. coli* enquanto *Listeria monocytogenes* demonstrou maior resistência.
- As nanocápsulas contendo carvacrol com concentração de carvacrol equivalente a CBM foram capazes de reduzir a concentração de *L. monocytogenes* e *S. aureus* aderidos em aço inoxidável em aproximadamente 4 log UFC/cm², enquanto *Salmonella* e *E. coli* foram inibidas abaixo do limite de detecção do método (limite de detecção do método *drop plate* igual a 1,92 log UFC/cm²).
- A encapsulação de carvacrol em nanopartículas poliméricas de Eudragit demonstram potencial para uso como sanitizante de superfícies devido à inibição de *Salmonella* e *E. coli*, sendo necessários mais estudos e aprovação por órgãos reguladores para essa finalidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRICA, S. **Listeria outbreak situation report (11 June 2018)**. National Listeria Incident Management Team: Pretoria, 2018.
- ALLES, M.; DUTRA, C. **Design higiênico de máquinas para indústrias de alimentos e bebidas**. São Paulo: SENAI, 2011.
- ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.
- ANVISA. Regularização de Empresas - Alimentos: Boas Práticas de Fabricação. [S.l.], 2017. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/alimentos/empresas/boas-praticas-de-fabricacao>>. Acesso em: 1º ago. 2017.
- ARGUDÍN, M. A. *et al.* Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. **Applied and Environmental Microbiology**, 2012. v. 78, n. 8, p. 2930–2935.
- ARHIN, F. F. *et al.* Time-kill kinetics of oritavancin and comparator agents against *Streptococcus pyogenes*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2009. v. 34, n. 6, p. 550–554.
- ARIAS, J. L. *et al.* Stability of fenbendazole suspensions for veterinary use. Correlation between zeta potential and sedimentation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008. v. 34, n. 4–5, p. 257–262.
- ASBAHANI, A. El *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, 2015. v. 483, p. 220–243.
- AZEREDO, G. *et al.* Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, 2011. v. 44, p. 1541–1548.
- BARBA, A. A. *et al.* Ultrasonic energy in liposome production: Process modelling and size calculation. **Soft Matter**, 2014. v. 10, n. 15, p. 2574–2581.
- BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS. Supplementum**, 2013. n. 136, p. 1–51. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23635385>.
- BLANCO-PADILLA, A. *et al.* Food antimicrobials nanocarriers. **Scientific World Journal**, 2014. v. 2014, p. 1–11.

- BOWER, C. K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, 1996. v. 7, p. 152–157.
- BRANEN, J. K.; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, 2004. v. 90, n. 1, p. 63–74.
- BRASIL. **Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana**. ANVISA. Disponível em: <<http://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201611/08140937-rdc-14-2007.pdf>>.
- BRASIL. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da Salmonella spp.** 1a. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BRASIL. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2018.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, 2004. v. 94, p. 223–253.
- CALO, J. R. *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, 2015. v. 54, p. 111–119. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>>.
- CAMPANA, R.; BAFFONE, W. Carvacrol efficacy in reducing microbial biofilms on stainless steel and in limiting re-growth of injured cells. **Food Control**, 2018. v. 90, p. 10–17. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.029>>.
- CARVALHO, V.; MITTELSTAEDT, S. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 – revisão. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, 2006. v. 24, n. 3, p. 175–182.
- CESARE, A. *et al.* Modelling the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in pasta salads at different storage temperatures and packaging conditions. **Food Microbiology**, 2018. v. 76, p. 154–163. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.013>>.
- CHANG, Y. *et al.* Endolysin LysSA97 is synergistic with carvacrol in controlling *Staphylococcus aureus* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, 2017.
- CHATURONGAKUL, S. *et al.* Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, 2008. v. 5, p. 1–18.
- CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Formation and Control in Food Processing Facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2003. v. 2, p. 22–32.
- CHOLLET, E. *et al.* Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened

- cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, 2008. v. 19, p. 982–989.
- DESAI, H.; PARK, H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, 2005. v. 23, n. 7, p. 1361–1394.
- EFSA. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update. **EFSA Supporting Publications**, 2018. v. 15, n. 7. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1448>>.
- ENGEL, J. B. *et al.* Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, 2017. v. 252, n. March, p. 18–23. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.003>>.
- ESPER, L. Formação de Biofilmes Microbianos. Rio de Janeiro: [s.n.], 2011.
- ESPINA, L. *et al.* Potential use of carvacrol and citral to inactivate biofilm cells and eliminate biofouling. **Food Control**, 2017. v. 82, p. 256–265.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL [ECDC] & EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY [EFSA]. The European Union Summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**, 2018. v. 12, n. 2, p. 1–312. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2090.htm?WT.mc_id=EFSAHL01&emt=1>.
- FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2009. v. 17, n. 8, p. 2950–2962. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.043>>.
- FATHI, M.; MOZAFARI, M.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, 2012. v. 23, n. 1, p. 13–27. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>>.
- FERNANDES, M. *et al.* Formation of multi-species biofilms by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing and effectiveness of chemical sanitation procedures. **International Dairy Journal**, 2017. v. 72, p. 23–28.
- FERREIRA, C. *et al.* **Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2010.
- FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilms formed in raw material in contact with milk: virulence factors involved. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2005. v. 33, n. 3, p. 291–296.

Disponível em: <www.ufrgs.br/favet/revista>.

FRAISE, A. P.; MAILLARD, J.; SATTAR, S. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization**. 5. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ateneu, 2008.

FRANK, J. F.; CHMIELEWSKI, R. A. N. Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food-preparation surfaces. **Journal of Food Protection**, 1997. v. 60, n. 1, p. 43–47.

FREIXO, L. **Micro e Nanoencapsulação como Estratégias de Estabilização de Entidades Bioativas: Proteínas, Enzimas e Bacteriófagos**. Porto: Universidade do Porto, 2013.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, 2007. v. 113, n. 1, p. 1–15.

GENDY, A. N. El *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt. **Industrial Crops and Products**, 2015. v. 67, p. 201. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.038>>.

GIAOURIS, E. *et al.* Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, 2015. v. 6, n. JUL, p. 1–26.

GOMES, G. S. *et al.* Optimization of Curcuma Oil / Quinine-Loaded Nanocapsules for Malaria Treatment. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, 2017. n. 8.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, 2009. v. 26, n. 2, p. 142–150. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2008.10.008>>.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, 1997. v. 37, p. 145–153.

HRUDEY, S. *et al.* Evaluating evidence for association of human bladder cancer with drinking-water chlorination disinfection by-products. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, 2015. v. 18, p. 213–241.

HUA, S.; WU, S. Y. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. **Frontiers in Pharmacology**, 2013. v. 4, p. 1–7.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, 2012. v. 3, n. JAN, p. 1–24.

JAGADISH, K. *et al.* Ecofriendly synthesis of metal/metal oxide nanoparticles and their application in food packaging and food preservation. **Impact of Nanoscience in the Food Industry**, 2018. p. 197–216.

JAMALI, H.; CHAI, L. C.; THONG, K. L. Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. **Food Control**, 2013. v. 32, n. 1, p. 19–24. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.033>>.

JESORKA, A.; ORWAR, O. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, 2008. v. 1, p. 801–32. Disponível em: <www.annualreviews.org>.

KASNOWSKI, M. *et al.* Biofilm formation in the food industry and surface validation methods. **Electronic Journal of Veterinary Medicine**, 2010. v. 15, p. 1–23.

KIM, K. S.; PARK, S. J. Characterization and release behaviors of porous PCL/Eudragit RS microcapsules containing tulobuterol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2010. v. 76, n. 2, p. 404–409.

KLANG, V. *et al.* Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, 2012. v. 43, n. 2–3, p. 85–103. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014>>.

KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2011. v. 21, n. 1, p. 55–76. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247\(11\)50006-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50006-1)>.

KOCOT, M.; OLSZEWSKA, A. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. **LWT - Food Science and Technology**, 2017. v. 84, p. 47–57. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.042>>.

KUMAR, A. *et al.* Development and characterization of liposomal drug delivery system for Nimesulide. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2010. v. 2, n. SUPPL. 4, p. 87–89.

LEE, B.; YUN, Y.; PARK, K. Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. **Chemical Engineering Science**, 2015. v. 125, p. 158–164. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2014.06.042>>.

LEE, J. *et al.* Improving the water solubility and antimicrobial activity of silymarin by nanoencapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2017. v. 154, p. 171–177.

LEE, M.; PARK, H. Preparation of halloysite nanotubes coated with Eudragit for a controlled release of thyme essential oil. **Journal of Applied Polymer Science**, 2015. v. 132, n. 46, p. 1–7.

LEO, E. *et al.* *In vitro* evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. **International Journal of Pharmaceutics**, 2004. v. 278, n. 1, p. 133–141.

LIMA, P.; CABRAL, J.; SILVA, T. Formação de biofilmes de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga sorotipos O153:H25, O113:H21 e O111:H8 em superfície de aço inoxidável e eficácia de sanitizante. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 2015. v. 74, p. 134–139.

LIRA, M. *et al.* Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of staphylococci isolated from goat dairy plants. **Journal of Infection in Developing Countries**, 2016. v. 10, p. 932–938.

LIU, C.; HOFSTRA, N.; FRANZ, E. Impacts of climate change on the microbial safety of pre-harvest leafy green vegetables as indicated by *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. **International Journal of Food Microbiology**, 2013. v. 163, n. 2–3, p. 119–128. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.026>>.

LOPES, N.; PINILLA, C.; BRANDELLI, A. Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior. **Food Hydrocolloids**, 2017. v. 70, p. 1–7. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.016>>.

MACÊDO, J. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria de farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**, 2006. v. 2, n. Nov/Dez, p. 19–24.

MACHADO, R.; DUTRA, A.; PINTO, M. **Boas Práticas de Fabricação (BPF)**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2015.

MALHEIROS, P. S. *et al.* Cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS : uma comparação com linhagens de outros sorovares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2007. v. 27, p. 751–755.

MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D.; *et al.* Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, 2010. v. 27, n. 1, p. 175–178.

MALHEIROS, P. S.; MICHELETTO, Y. M. S.; *et al.* Development and characterization of

- phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. **Food Research International**, 2010. v. 43, n. 4, p. 1198–1203.
- MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D.; BRANDELLI, A. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. **Trends in Food Science and Technology**, 2010. v. 21, n. 1, p. 284–292.
- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B.; AMODIO, M. L.; COLELLI, G. Carvacrol-loaded chitosan nanoparticles maintain quality of fresh-cut carrots. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2017. v. 41, p. 56–63.
- MCDONNELL, G.; RUSSELL, D. Antiseptics and Disinfectants : Activity , Action , and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 1999. v. 12, n. 1, p. 147–179.
- MENEGARO, A. *et al.* Sanitizers: Concentrations and applicability in the food industry. **SAP - Scientia Agraria Paranaensis**, 2016. v. 15, n. 2, p. 171–174.
- MIAO, J. *et al.* Formation and development of *Staphylococcus* biofilm: With focus on food safety. **Journal of Food Safety**, 2017. v. 37, n. 4, p. 1–11.
- MILADI, H. *et al.* Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against foodborne pathogens. **Microbial Pathogenesis**, 2016. v. 99, p. 95–100.
- MILAN, C.; TIMM, C. Fatores de virulência associados à formação de biofilme por *Salmonella enterica*: minirrevisão. **Science and Animal Health**, 2015. v. 3, p. 94–102.
- MILLEZI, F. *et al.* Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety**, 2012. v. 32, n. 3, p. 351–359.
- MOHAMMADI, G. *et al.* Preparation, physicochemical characterization and anti-fungal evaluation of the Nystatin-loaded Eudragit RS100/PLGA nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2017. v. 38, p. 90–96.
- MORONES, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, 2007. v. 16, n. 10, p. 2346–2353.
- MOZAFARI, M.; JOHNSON, C.; HATZIANTONIOU, S. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, 2008. v. 18, n. 1, p. 309–327.
- NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. **National Nanotechnology Initiative Strategic Plan. Executive Office of the President of the United States.**
- NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, 2012. v. 156, n. 1,

- p. 7–17. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>>.
- OLAIMAT, A. *et al.* Survival and inhibition of *Staphylococcus aureus* in commercial and hydrated tahini using acetic and citric acids. **Food Control**, 2017.
- OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polymers in obtaining drug delivery systems. **Electronic Pharmacy Magazine**, 2006. v. 3, n. 1, p. 29–35.
- PARDO, A. *et al.* Effect of Mo and Mn additions on the corrosion behaviour of AISI 304 and 316 stainless steels in H₂SO₄. **Corrosion Science**, 2008. v. 50, n. 3, p. 780–794.
- PARIZZI, S. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2004. v. 47, p. 77–83.
- PASQUA, R. DI *et al.* Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007. v. 55, n. 12, p. 4863–4870.
- PATRA, C. *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical sciences**, 2017. v. 3, n. 1, p. 33–45.
- PATRIGNANI, F. *et al.* Innovative strategies based on the use of essential oils and their components to improve safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, 2015.
- PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science & Engineering C**, 2017. v. 77, p. 1327–1340.
- PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, 2004. v. 17, n. 2, p. 268–280.
- PISOSCHI, A. M. *et al.* An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018. v. 143, p. 922–935. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>>.
- RAIMONDI, F. *et al.* Nanoparticles in energy technology: Examples from electrochemistry and catalysis. **Angewandte Chemie - International Edition**, 2005. v. 44, n. 15, p. 2190–2209.
- RAMASWAMY, V. *et al.* *Listeria* - review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2007. v. 40, p. 4–13.
- REIS, C. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2006. v. 2, n. 1, p. 8–21.

- ROCHA, C. Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como sanitizante natural para controle de bactérias sésseis em superfície utilizada para corte de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2014. v. 73, n. 4, p. 338–344.
- RODRIGUES, J. B. *et al.* Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. **Food Control**, 2017. v. 73, p. 1237–1246.
- SANT’ANNA, V.; MALHEIROS, P. S.; BRANDELLI, A. Liposome encapsulation protects bacteriocin-like substance P34 against inhibition by Maillard reaction products. **Food Research International**, 2011. v. 44, p. 326–330.
- SANTOS, S. S. *et al.* Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, 2013. v. 33, n. 3, p. 1389–1394. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.040>>.
- SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, 2011. v. 17, n. 1, p. 7–15.
- SCENIHR. Scientific Basis for the Definition of the Term “ Nanomaterial ”. **Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks**, 2010. n. July, p. 1–43.
- SCHAFFAZICK, S. *et al.* Characterization and physical-chemical stability of polymer nanoparticulate systems for drug administration. **New Chemistry**, 2003. v. 26, n. 5, p. 726–737.
- SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. **International Journal of Nanomedicine**, 2012. v. 7, p. 2767–2781.
- SERCOMBE, L. *et al.* Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. **Frontiers in Pharmacology**, 2015. v. 6, p. 1–13.
- SHAABAN, H. A.; EDRIS, A. E. Factors Affecting the Phase Behavior and Antimicrobial Activity of Carvacrol Microemulsions. **Journal of Oleo Science J. Oleo Sci**, 2015. v. 64, n. 4, p. 393–404.
- SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science and Technology**, 2009. v. 20, n. 9, p. 407–413. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.054>>.
- SHINOHARA, N. *et al.* *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, 2008. v. 13, p. 1675–1683.
- SILVA, G.; DUTRA, P.; CADIMA, I. **Higiene na Indústria de Alimentos**. 1. ed. Recife: EDUFRPE, 2010.

- SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, 2000. v. 17, p. 439–447.
- SIVROPOULOU, A. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1996. v. 44, n. 5, p. 1202–1205. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf950540t>>.
- SLEATOR, R. D.; CLIFFORD, T.; HILL, C. Gut osmolarity: A key environmental cue initiating the gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection? **Medical Hypotheses**, 2007. v. 69, n. 5, p. 1090–1092.
- SOUZA, G. *et al.* Effects of the essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semihard cheese broth and slurry. **Journal of Food Protection**, 2016. v. 79, n. 2, p. 246–252. Disponível em: <<http://jfoodprotection.org/doi/10.4315/0362-028X.JFP-15-172>>.
- SREY, S.; JAHID, I.; HA, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, 2013. v. 31, n. 2, p. 572–585.
- SRIVIDYA, N.; GHOORA, M. D.; PADMANABH, P. R. **Antimicrobial nanotechnology: research implications and prospects in food safety**. Anantapur: Elsevier Inc., 2017.
- SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, 2013. v. 36, n. 1, p. 224–229. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.023>>.
- TANG, J. *et al.* Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment. **International Journal of Nanomedicine**, 2011. p. 2429–2435.
- TEIXEIRA, P.; RODRIGUES, D. Adhesion to food contact surfaces. **Biotechnology Bulletin**, 2015. v. Série 2, n. 6, p. 31–34. Disponível em: <<https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/35326>>.
- UCHIDA, N. S. *et al.* Effect of carvacrol on *Salmonella* Saintpaul biofilms on stainless Steel Surface. **Tropical Journal of Pharmaceutical**, 2015. v. 14, p. 1075–1079. Disponível em: <<http://www.tjpr.org>>.
- ULTEE, A.; KETS, E.; SMID, J. Mecanismos of action of carvacrol on the Food-Borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999. v. 65, n. 10, p. 4606–4610.
- VASUDEVAN, R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. **Journal of Microbiology & Experimentation**, 2014. v. 1, n. 3, p. 1–16. Disponível em:

<<http://medcraveonline.com/JMEN/JMEN-01-00014.php>>.

VERT, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)*. **Pure Appl. Chem**, 2012. v. 84, n. 2, p. 377–410. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>>.

WANG, H. *et al.* Biofilm formation of *Yersinia enterocolitica* and its persistence following treatment with different sanitation agents. **Food Control**, 2017. v. 73, p. 433–437. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.033>>.

WANG, Z.; PALMER, T. A.; BEESE, A. M. Effect of processing parameters on microstructure and tensile properties of austenitic stainless steel 304L made by directed energy deposition additive manufacturing. **Acta Materialia**, 2016. v. 110, p. 226–235. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actamat.2016.03.019>>.

WEISHEIMER, V. *et al.* Microparticles containing lemongrass volatile oil. **Pharmazie**, 2010.

YANG, Y. *et al.* Biofilm formation of *Salmonella Enteritidis* under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. **Food Microbiology**, 2016. v. 54, p. 98–105.

ZAND, A. *et al.* Comprehensive study of sporicidal and sporstatic effect of CuO and AgO metal nanoparticles upon spore of *Clostridium botulinum* type E. **African Journal of Microbiology Research**, 2012. v. 6, n. 7, p. 1417–1422. Disponível em: <[http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract_2012/23Feb/Zand et al.htm](http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract_2012/23Feb/Zand_et_al.htm)>.

ZORZI, G. *et al.* On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2015. v. 25, p. 426–436.

ZOTTOLA, E.; SASAHARA, K. Microbial biofilms in the food processing industry-Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, 1994. v. 23, p. 125–148.