

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ENCAPSULAÇÃO DE CARVACROL EM NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT
VISANDO À INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS**

MICHELLE DALMÁS

PORTO ALEGRE

2018

MICHELLE DALMÁS

**ENCAPSULAÇÃO DE CARVACROL EM NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT
VISANDO À INIBIÇÃO DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA EM ALIMENTOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção de título de Engenheiro de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Malheiros

Porto Alegre

2018

Trabalho de Conclusão de Curso

**ENCAPSULAÇÃO DE CARVACROL EM NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT
VISANDO À INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS**

MICHELLE DALMÁS

Aprovada em: ___ / ___ / ___

COMISSÃO EXAMINADORA

Patrícia da Silva Malheiros (Orientadora)
Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
ICTA / UFRGS

Adriano Brandelli
Doutor em Ciências Biológicas
ICTA/UFRGS

Karla Joseane Perez
Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia)
UFRGS

Daniela Laranja
Doutoranda em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
ICTA / UFRGS

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho primeiramente, aos meus pais, Nilce e Vilceo, que sempre me deram o maior apoio para conquistar os meus objetivos e muitas vezes deixaram de adquirir bens para me dar o suporte necessário. Mãe, levarei comigo a frase “depois da tempestade, sempre vem o sol” o meu singelo, muito obrigada.

Outra pessoa muito importante na minha vida é a minha irmã, Taíse, o que seria de mim sem seu apoio, seus conselhos e minha companheira de finais de semana de estudos, irmã também futura engenheira, obrigada. Agradeço também, ao meu namorado, Paulo, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldade.

Sou grata, à Prof. Dr^a e orientadora Patrícia, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Dedico este trabalho também a todos os professores do ICTA que contribuíram diariamente com o meu conhecimento e em especial ao Prof. Dr^o. Adriano e Prof. Dr^o Eduardo, por terem viabilizado que os experimentos dessa monografia fossem realizados. Dedico também, ao aluno de mestrado, Henrique pelos ensinamentos e em especial a mestranda Fabiola, pelo apoio e orientação.

Dedico este trabalho a minhas amigas Eduarda, Evelin, Patrícia, Tamara e minhas primas Emanuele, Franciele, Nathália, Patrícia e Tatiane que me deram força durante a faculdade e foram compreensivas com os meus momentos de ausência, estendo também essa gratidão aos meus tios, em especial Ronaldo e Pedro pelo tempo disponibilizado na reta final do curso onde estagiava e estudado em cidades diferentes. Agradeço as minhas colegas queridas, Caroline, Carolinne, Eliana, Raquel e Roberta que estiveram presente em todo o momento da minha formação. Dedico também a todos os colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial a Vera e a Daniela, que sempre disponibilizaram o seu tempo para me ouvir.

RESUMO

Uma das grandes preocupações das indústrias de alimentos e serviços de alimentação é a contaminação microbiológica. Segundo dados do Ministério da Saúde, entre 2000 e 2017, os principais causadores de surtos alimentares no Brasil foram *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Portanto, o controle desses patógenos é de fundamental importância para evitar doenças relacionadas por alimentos e perdas econômicas. Visando controlar a multiplicação de micro-organismos, utiliza-se a adição de conservantes em alimentos. Entretanto, devido a uma demanda crescente dos consumidores por alimentos mais saudáveis estão sendo estudados antimicrobianos naturais como o carvacrol, componente do óleo essencial (OE) de tomilho e orégano. O objetivo deste trabalho foi encapsular carvacrol em nanocápsulas de Eudragit® a fim de melhorar sua atividade antimicrobiana contra *S. Enteritidis* SE86 e *S. aureus* S6. Nanocápsulas de Eudragit® RS 100 carregadas com carvacrol foram preparadas através da técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, apresentando tamanho médio de $146,3 \pm 7,7$ nm, polidispersidade de $0,18 \pm 0,04$, potencial zeta de $+ 23,4 \pm 1,7$ mV e estabilidade a 5 °C, por um período de pelo menos 45 dias. A esterilização das nanocápsulas utilizando filtros de 0,22 µm não alterou essas características físico-químicas. A eficiência de encapsulação foi de $97,1 \pm 0,2\%$. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada utilizando placas de microdiluição, sendo que as nanocápsulas foram mantidas a 5 °C por 24 h para ocasionar a liberação do composto. Os resultados da CBM das nanocápsulas contendo carvacrol bem como do composto livre contra *S. Enteritidis* e *S. aureus* foram de 0,331 mg/mL. Portanto, o carvacrol foi adequadamente encapsulado em nanocápsulas de Eudragit® sendo capaz de inativar *S. Enteritidis* e *S. aureus*, demonstrando potencial para uso em áreas do ramo alimentício.

Palavras-chaves: Nanocápsulas, Eudragit®, carvacrol, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Microbiological contamination is one of the major concerns of the food industries and food services. According to data from the Ministry of Health, between 2000 and 2017, the main causes of foodborne outbreaks in Brazil were *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Therefore, the control of these pathogens is of fundamental importance in order to avoid diseases in the population and economic losses. Aiming to control the multiplication of microorganisms, the addition of preservatives in foods is used. However, due to increasing consumer demand for healthier foods, natural antimicrobials such as carvacrol, essential oil (OE) component of thyme and oregano are being studied. The objective of this work was to encapsulate carvacrol in Eudragit® nanocapsules in order to improve its antimicrobial activity against *S. Enteritidis* SE86 and *S. aureus* S6. Eudragit® RS 100 nanocapsules loaded with carvacrol were prepared by the interfacial deposition technique of the preformed polymer, having a mean size of 146.3 ± 7.7 nm, polydispersity of 0.181 ± 0.04 , zeta potential of $+ 23.4 \pm 1.7$ mV and stability at 5 °C for a period of at least 45 days. The encapsulation efficiency was $97.11 \pm 0.20\%$. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was determined using microdilution plates according to the Clinical and Laboratory Standards Institute. The nanocapsule was kept in a refrigerator at 5 °C for 24 hours to allow compound release. The results of CBM against *S. Enteritidis* SE86 and *S. aureus* S6 were 0.331 mg / mL. Therefore, carvacrol was adequately encapsulated in Eudragit® nanocapsules being able to inactivate *S. Enteritidis* SE86 and *S. aureus*, demonstrating potential for use in several areas of the food industry.

Key-words: Nanocapsules, Eudragit®, carvacrol, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular do Eudragit® RS 100	16
Figura 2 - Estrutura molecular do carcavrol	19
Figura 3: Preparação das nanocápsulas utilizando a técnica da deposição interfacial do polímero pré-formado:.....	23
Figura 4A - Sem formação de halo/cepa <i>Salmonella enteritidis</i> SE86.....	34
Figura 4B - Halo de inibição/cepa <i>Salmonella enteritidis</i> SE86 no 1° dia de avaliação.....	34
Figura 4C - Halo de inibição/cepa <i>Salmonella enteritidis</i> SE86 no 26° dia de avaliação.....	34
Figura 4D - Halo de inibição/cepa <i>Salmonella enteritidis</i> SE86 no 45° dia de avaliação.....	34
Figura 5A - Sem formação de halo/cepa <i>Staphylococcus aureus</i> S6.....	35
Figura 5B - Halo de inibição/cepa <i>Staphylococcus aureus</i> S6 no 1° dia de avaliação.....	35
Figura 5C - Halo de inibição/cepa <i>Staphylococcus aureus</i> S6 no 26° dia de avaliação.....	35
Figura 5D - Halo de inibição/cepa <i>Staphylococcus aureus</i> S6 no 45° dia de avaliação.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Acompanhamento da estabilidade nas nanocápsulas contendo carvacrol, durante 45 dias.....	29
Tabela 2 - Estabilidade das nanocápsulas de Eudragit contendo carvacrol, antes e após filtração (0.22 µm), mantidas a 5 °C durante 45 dias.....	31
Tabela 3 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) do carvacrol e as nanocápsulas de eudragit contendo carvacrol para os micro-organismos <i>Staphylococcus aureus</i> S6 e <i>Salmonella</i> Enteritidis SE86.....	36

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Cálculo de eficiência de encapsulação	24
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. Encapsulação em nanopartículas	14
3.2. Nanocapsulas de eudragit.....	16
3.3. Antimicrobianos naturais	17
3.3.1. Carvacrol	18
3.4. Encapsulação de antimicrobianos naturais	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Culturas Bacterianas	22
4.2. Reagentes	22
4.3. Desenvolvimento de nanocápsulas de Eudragit contendo carvacrol.....	22
4.4. Caracterização físico-química das nanocápsulas contendo carvacrol.....	23
4.5. Eficiência de encapsulação.....	24
4.6. Determinação da estabilidade das nanocápsulas contendo carvacrol.....	24
4.7. Determinação da atividade antimicrobiana do carvacrol encapsulado.....	25
4.7.1. Metodologia 1 para análise qualitativa.....	25
4.7.2. Metodologia 2 para análise qualitativa	25
4.8. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	26
4.9. Análises estatísticas.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas contendo carvacrol.....	27
5.2 Determinação da eficiência de encapsulação	29
5.3 Avaliação da estabilidade nas nanocápsulas contendo carvacrol.....	30
5.4 Determinação qualitativa da atividade antimicrobiana do carvacrol encapsulado.....	31
5.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do carvacrol livre e encapsulado em nanocápsulas de eudragit.....	35
6. CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um ramo científico multidisciplinar que evolui rapidamente, trazendo inovações para as mais variadas áreas, desde a energia e eletrônica até indústria farmacêutica e alimentícia (ROSSI-BERGMANN, 2008; SIRELKHATIM *et al.*, 2015). Na área farmacêutica e de alimentos são consideradas nanopartículas os materiais que apresentam ao menos uma dimensão com tamanho até 1000 nm, desde que apresentem propriedades físicas e químicas diferentes das propriedades do mesmo material em escala macro (LEE, B.; YUN; PARK, K., 2015).

A nanoencapsulação é uma divisão na área de nanociência que pode ser utilizada nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, viabilizando a liberação controlada de compostos em locais e tempos específicos (JAFARI, 2017). Na indústria farmacêutica é amplamente utilizada a tecnologia de encapsulação para revestimento de fármacos e encapsulação de compostos bioativos. A encapsulação é um processo de empacotamento de agentes ativos dentro de um material transportador visando a liberação controlada destes compostos. O uso de nanopartículas para entrega de medicamentos apresenta biodisponibilidade melhorada e aumento da meia-vida quando comparados com os mesmos fármacos não encapsulados (BAMRUNGSAP *et al.*, 2012).

Na indústria alimentícia, as nanopartículas formadas por um revestimento polimérico em torno de um núcleo líquido, contendo compostos lipofílico ou hidrofílico podem ser utilizadas para melhorar a segurança e qualidade dos alimentos (DEVI *et al.*, 2017; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; PAN; ZHONG, 2016). A nanoencapsulação é uma estratégia eficiente para superar as limitações que a utilização direta de compostos hidrofóbicos com odor e sabor marcantes, características apresentadas pelos óleos essenciais e seus constituintes, acarretam nos alimentos. Essa técnica pode mascarar o sabor, elevar a solubilidade e estabilidade física além de diminuir a interação com os ingredientes alimentares, melhorando a biodisponibilidade dos compostos (WEISS *et al.*, 2009).

Um dos polímeros mais utilizados na indústria farmacêutica para revestimentos de comprimidos é o Eudragit® RS 100, bastante usado para fármacos

de liberação controlada e antibióticos (ARIMA *et al.*, 2004; PAYAB *et al.*, 2014). O carvacrol, antimicrobiano natural derivado do óleo essencial de tomilho e orégano, é bastante utilizado na indústria farmacêutica para produção de cosméticos. Já na indústria de alimentos esse composto está sendo aplicado em embalagens, devido sua ação bactericida contra diversos micro-organismos de importância em alimentos (CAN BASER, 2008; SOKMEN, A. *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de sistemas de encapsulação de antimicrobianos naturais visando transporte, proteção e liberação dos compostos em sítios específicos são um dos desafios atuais na engenharia de alimentos (COSTA, S. DA *et al.*, 2012). Neste contexto, a encapsulação de carvacrol em nanocápsulas de Eudragit® pode representar um avanço no desenvolvimento de um ingrediente ativo visando à inibição de bactérias importantes em alimentos, tais como *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Encapsular carvacrol em nanocápsulas de Eudragit® RS 100 visando à inibição dos micro-organismos *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Encapsular carvacrol em nanocápsulas de Eudragit® RS 100;
- Determinar as características físico-químicas das nanocápsulas através de análise de tamanho, polidispersidade e potencial zeta;
- Determinar a eficiência de encapsulação do carvacrol nas nanocápsulas desenvolvidas;
- Determinar a estabilidade das nanocápsulas contendo carvacrol por 45 dias;
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de carvacrol livre e encapsulado em Eudragit, frente à *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus*;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Encapsulação em nanopartículas

A encapsulação é uma técnica na qual ingredientes ativos são aprisionados dentro de matrizes, chamadas encapsulantes. As matrizes possuem características que as diferenciam, podem ser sólidas ou líquidas, microscópicas ou macroscópicas, homogêneas ou heterogêneas (MADENE *et al.*, 2006).

Dentre os tipos de matrizes que podem ser utilizadas para a encapsulação de agente ativos estão as nanopartículas poliméricas, as quais podem se apresentar sob duas formas: nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas possuem um núcleo oleoso que atua como reservatório de compostos lipofílicos e as nanoesferas são compostas de uma matriz polimérica onde o material encapsulado encontra-se dissolvido, não contendo óleo em sua formulação (SOUTO; SANTANA, 2012). A escolha do núcleo oleoso é importante para a estabilidade das partículas e o controle da liberação do fármaco, uma vez que alguns componentes do núcleo são capazes de dissolver a rede polimérica (CONTRI *et al.*, 2012).

Atualmente, muitas pesquisas estão sendo realizadas para utilização de nanopartículas (NPs) em diferentes setores industriais, tais como indústria farmacêutica (CHICKPETTY; BASWARAJ; KUMAR, 2011), têxtil, alimentícia, dentre outras. Na indústria de alimentos as nanopartículas são bastante utilizadas em embalagens e também para encapsulação de compostos bioativos tais como vitaminas, antioxidantes e aromatizantes. Além disso, muitos estudos estão sendo realizados para utilização de nanopartículas como agentes antimicrobianos na indústria de alimentos (PISOSCHI *et al.*, 2018).

As nanopartículas metálicas, por exemplo, estão se tornando cada vez mais populares, devido à sua boa biocompatibilidade, destacando-se as nanopartículas de prata (AgNPs), muito usadas devido suas propriedades físico-químicas e ampla atividade antimicrobiana, atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Dentre os diversos métodos para fabricação dessas nanopartículas o mais comum é a redução química na presença de um agente estabilizante, porém resíduos tóxicos

podem ser gerados durante o processo de síntese, provocando contaminação ambiental. Uma alternativa para minimizar este problema é a utilização de métodos de síntese de AgNP seguindo os princípios da "química verde", onde as principais modificações à técnica convencional são escolha de solvente não prejudicial, um agente redutor natural e um agente estabilizante não tóxico (SHAO *et al.*, 2018).

Dentre as nanopartículas produzidas com óxidos metálicos destacam-se as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), que possuem notável ação antimicrobiana e propriedades fotocatalíticas (VASILACHE *et al.*, 2011). Segundo BRADLEY (2011) estas nanopartículas têm sido utilizadas para purificação de água, como aditivos alimentares e materiais de embalagem. Quando determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM), pesquisas demonstraram a inibição da multiplicação de *E. coli* e *S. aureus* utilizando-se baixas concentrações de ZnO. As nanopartículas de ZnO podem ser consideradas seguras para seres humanos, sendo utilizadas em revestimento de embalagens para manter as cores dos alimentos, evitar a deterioração e melhorar as propriedades do material de embalagem, incluindo resistência mecânica, propriedades de barreira e estabilidade (SHI *et al.*, 2014; SIRELKHATIM *et al.*, 2015). As nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂NPs), quando aplicadas sob forma de filmes em uvas, diminuíram a contaminação microbiana da superfície e aumentaram a estabilidade e durabilidade dos frutos devido a seu efeito fotocatalítico promover a remoção de etileno do interior da embalagem (AZEREDO *et al.*, 2018; BODAGHI *et al.*, 2015).

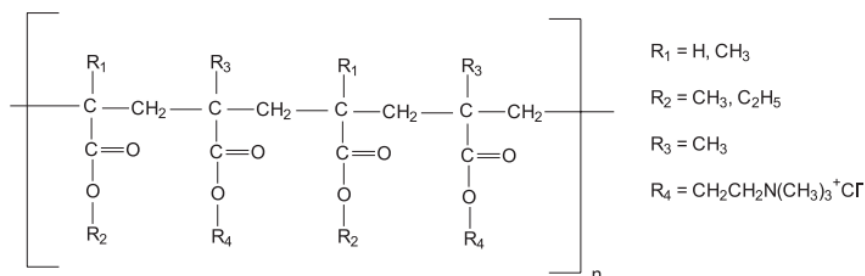
Ainda é uma tendência futura a utilização de nanopartículas em alimentos, porém, diversos estudos estão sendo realizados acerca de suas possibilidades de utilização nesta indústria, visto que esse tipo de material já é amplamente utilizado na área farmacêutica. Segundo Pan *et al.*, (2016) a aplicação de NPs na indústria alimentícia está diretamente relacionada com a melhoria das propriedades de qualidade dos produtos. O desenvolvimento da nanotecnologia aplicada a alimentos aliada à grande eficiência antibacteriana dos óleos essenciais e seus compostos torna cada vez maior o interesse da indústria alimentícia na utilização de nanopartículas contendo óleos essenciais visando garantir a segurança dos alimentos (PRAKASH *et al.*, 2018).

3.2 Nanocápsulas de Eudragit®

O Eudragit® é um polímero utilizado na indústria farmacêutica para revestimento de comprimidos desde a década de 50, devido sua estabilidade em ambientes aquosos e liberação controlada do material encapsulado. Existem diversos tipos de Eudragit® disponíveis, com características bem diversas entre si (PATRA *et al.*, 2017). Para este estudo foi selecionado o Eudragit® RS 100 devido a sua capacidade para liberação controlada do ingrediente ativo por intumescimento independente de pH e característica policatiônica (SIRELKHATIM *et al.*, 2015).

O Eudragit® RS 100, como ilustrado na Figura 1, é um copolímero composto por poli (acrilato de etil, metacrilato de metil, cloreto de metacrilato de trimetil amônioetil) (1: 2: 0,1) onde os grupos amônio estão presentes sob forma de sal, tornando o polímero bastante permeável (PHAECHAMUD; THUREIN; CHANTADEE, 2018).

Figura 1: Estrutura molecular do Eudragit® RS 100



Fonte: (DOMINGUES; GUTERRES, S., 2008)

Algumas das utilizações de Eudragit na indústria farmacêutica são direcionadas para entrega de fármaco via oral como revestimento e matriz de comprimidos (CHICKPETTY; BASWARAJ; KUMAR, G. S., 2011). Segundo Friend (2005), nanocápsulas de Eudragit L100-55 são eficientes para transporte de drogas inflamatórias intestinais devido sua resistência ao pH do sistema digestivo. Outros estudos demonstram que nanocápsulas de Eudragit podem melhorar o efeito

terapêutico de fármacos utilizados para tratamento de infecção ocular (ZHANG, Yaqiong *et al.*, 2014).

Na indústria alimentícia a utilização de nanopartículas de Eudragit ainda está em fase inicial de estudos. Segundo Neo (2013), há uma tendência crescente de estudos visando incorporação de nanotecnologia na ciência dos alimentos, através da utilização de nanopartículas para aumento do prazo de validade de alimentos, incorporação de ingredientes bioativos ou agentes antimicrobianos.

3.3 Antimicrobianos naturais

Vários métodos e tecnologias de conservação de alimentos têm sido desenvolvidos para atender às exigências dos consumidores quanto à segurança microbiológica, valores nutricionais e propriedades sensoriais dos alimentos. Uma das tecnologias mais utilizadas na indústria de alimentos é a adição de conservantes sintéticos como nitratos, benzoatos, sulfitos e sorbatos. Entretanto, algumas dessas substâncias são conhecidas por causar danos à saúde (SULTANA *et al.*, 2014). Os antioxidantes fenólicos sintéticos, por exemplo, apresentam efeitos potencialmente carcinogênicos (SINGH, A.; SHARMA, P. K.; GARG, 2010).

A preocupação dos consumidores com o risco à saúde apresentado pelas substâncias acima citadas está levando ao desenvolvimento e aplicação em alimentos de antimicrobianos naturais (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Atualmente, há um aumento no interesse em definir novos métodos que utilizem conservantes naturais provenientes de frutas, vegetais, plantas, sementes, ervas e especiarias, pois além de potencialmente não tóxicas, apresentam atividade antimicrobiana contra amplo espectro de micro-organismos (PISOSCHI *et al.*, 2018).

A adição de antimicrobianos naturais em alimentos demonstra resultados promissores para controlar a multiplicação de micro-organismos patogênicos, retardar a deterioração do alimento (GYAWALI; IBRAHIM, 2014) e no desenvolvimento de embalagens inteligentes (MOUSAVI KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2015). Burt *et al.* (2004) afirmam que os óleos essenciais são amplamente utilizados em material de embalagem na indústria alimentícia em função da característica de hidrofobicidade, o que lhes permite interagir com os lipídios da membrana celular

microbiana e mitocôndrias, tornando as estruturas menos organizadas e, portanto, mais permeáveis.

Segundo Budka et al. (2010), os óleos essenciais de manjeriço, tomilho e orégano apresentam efeito bactericida contra *B. cereus* em alimentos à base de arroz. Alguns componentes desses óleos, como o carvacrol, inibem a formação de biofilmes formados por microrganismos patogênicos como *S. aureus* e *S. epidermidis* (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

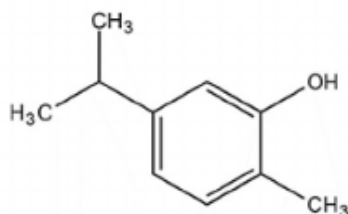
Os óleos essenciais atuam também impedindo a formação de biofilme por patógenos como *S. aureus* e *S. epidermidis*, devido à inibição de fatores de virulência relacionados à parede celular (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012). Dentre os óleos essenciais, os que apresentam as melhores propriedades antibacterianas são aqueles que incluem compostos fenólicos, como o eugenol, timol e carvacrol (HIRASA; TAKEMASA, 1998; ROTA *et al.*, 2004).

3.3.1 Carvacrol

O carvacrol é um composto fenólico presente nos óleos essenciais de orégano e tomilho que apresenta ação antimicrobiana contra um amplo espectro de micro-organismos (BURT, 2004) incluindo bactérias patogênicas, fungos filamentosos e leveduras (NOSTRO; PAPALIA, 2012; ULTEE *et al.*, 2000). Além disso, é certificado como seguro para uso em alimentos sendo classificado como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (FDA, 2016).

A estrutura molecular do carvacrol está representada na figura 2. É interessante destacar que o grupo OH (hidroxila) apresenta uma grande influência na eficácia antimicrobiana de diversos óleos essenciais. No carvacrol o grupo OH encontra-se na posição orto, conferindo ação bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DORMAN; DEANS, 2000).

Figura 2: Estrutura molecular do carvacrol.



Fonte: JEON, N. J. *et al.*, 2018.

O mecanismo de ação do carvacrol bem como de outros compostos fenólicos está relacionado à sua ação danosa sobre as propriedades bioquímicas e estruturais dos micro-organismos. Em geral, ocorre perturbação da membrana celular, conteúdo citoplasmático, enzimas e proteínas relacionadas ao funcionamento normal das células, ocasionando distúrbios do metabolismo microbiano e como consequência morte celular (CALO *et al.*, 2015; DONSI *et al.*, 2012; KUJUR *et al.*, 2017). Segundo Friedman *et al.*, (2004), o carvacrol é um composto de ação rápida, uma vez que inativou os micro-organismos *E. coli* e *Salmonella* em um tempo de exposição de 5 minutos.

O carvacrol mostrou ser eficiente para inibir diversos micro-organismos que podem estar presentes em superfícies que entram em contato com alimentos. Engel *et al.* (2017) mostraram que o carvacrol, com tempo de exposição de 1 minuto, inativou grande concentração bacteriana ($\pm 6 \log$ UFC/mL) de *S. aureus* e *Salmonella*, separadamente, aderidos em aço inoxidável. Também demonstra eficiência quando os micro-organismos estão organizados em biofilme, como demonstram Knowles *et al.* (2005) que verificaram que biofilmes formados por *S. aureus* e *S. Typhimurium* na presença de 1.0 mmol/h de carvacrol não atingiram o estágio de maturação, enquanto maiores concentrações de carvacrol (5.0 mmol/h) impediram a formação do biofilme.

O carvacrol também demonstra atividade anti-biofilme contra *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, *S. aureus* ATCC 43387, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Candida albicans* ATCC 14053 (CAMPANA; BAFFONE, 2018). A aplicação de carvacrol diretamente em alimentos

precisa ser cuidadosamente avaliada, pois seu potencial de ação antimicrobiana varia conforme a matriz alimentar, tendo ação reduzida em alimentos ricos em carboidratos e lipídios e ação aumentada em presença de ácidos ou proteínas (GUTIERREZ; BARRY-RYAN, Catherine; BOURKE, 2008).

Estudos realizados por Landry (2015) mostraram que as nanoemulsões de carvacrol inibiram efetivamente o crescimento de *S. Enteriditis* e *E. coli* O157: H7 em sementes de feijão mungo, alfafa, brócolis e rabanete contaminados. As propriedades antimicrobianas do carvacrol contra *Salmonella* spp. também foram demonstradas em vegetais verdes folhosos (MOORE-NEIBEL *et al.*, 2012), peru (OLADUNJOYE *et al.*, 2013) e em tratamentos de lavagem para tomates e ovos (MATTSON *et al.*, 2011; UPADHYAYA *et al.*, 2013). De acordo com os estudos mostrados, percebe-se a eficiência do carvacrol contra diversos micro-organismos.

3.4 Encapsulação de antimicrobianos naturais

Apesar da reconhecida ação antimicrobiana, o uso de óleos essenciais e seus componentes na indústria de alimentos é restrito devido à hidrofobicidade, volatilidade e forte odor que estas substâncias apresentam (GUTIERREZ; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, 2009). Visando minimizar esses problemas e promover uma liberação controlada dos compostos antimicrobianos novas ferramentas vêm sendo estudadas, sendo que a encapsulação tem mostrado resultados promissores.

Estudos realizados por Tampau *et al.*, (2018) mostraram que a encapsulação do carvacrol em policaprolactona foi bastante eficiente contra *E. coli* (Gram-negativa); porém, para obter o mesmo efeito contra *L. innocua* (Gram-positiva) foi necessária uma concentração maior de carvacrol. A nanocápsula de carvacrol em policaprolactona aplicada em filmes de amido de multicamadas é apresentada como uma alternativa bastante interessante para uso em embalagem ativa de alimentos. Segundo Shemesh (2016), a encapsulação do carvacrol em nanotubos de haloanisóis foi usada para produzir filmes de poliamida, que podem ser utilizados como embalagem antimicrobiana ativa. O estudo mostrou que esses filmes apresentaram propriedade antifúngica *in vitro* inibindo uma ampla variedade de fungos filamentosos, além de exibir efeito bactericida e/ou bacteriostático quando utilizado na

produção de embalagem inteligente para tomates ocasionando o aumento da vida útil do fruto.

Martínez-Hernández et al. (2017) realizaram estudo com cenoura minimamente processada, onde compararam a higienização tradicional com cloro e utilizando nanopartículas de quitosano-tripolifosfato carregada com carvacrol. As fatias de cenouras refrigeradas à 5 °C foram estudadas durante 13 dias e apresentaram resultados semelhantes quanto à qualidade sensorial e físico-química, porém quando analisada a contagem microbiana de mesófilo observou-se redução de aproximadamente 1 log UFC/g nas amostras higienizadas com cloro e 2 log UFC/g nas amostras higienizadas com a solução contendo nanopartículas de quitosano-tripolifosfato carregada com carvacrol. Engel et al. (2017) mostraram que carvacrol co-encapsulado com timol em lipossomas inibiu *S. aureus* e *Salmonella* aderidos em aço inoxidável após 10 minutos de contato.

Neste contexto, a encapsulação do carvacrol em nanopartículas desenvolvidas com material atóxico amplamente utilizado na indústria farmacêutica pode gerar resultados promissores na inibição de bactérias patogênicas vinculadas aos alimentos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Culturas bacterianas

Utilizou-se *Salmonella* Enteritidis SE86 e *Staphylococcus aureus* S6 pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS). Ambas as cepas foram cultivadas, separadamente, em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia) a 37 °C por 18-24 horas. Cada bactéria foi ajustada uma concentração de aproximadamente 10⁸ UFC/mL diluindo a suspensão com caldo BHI para obter uma absorbância (DO630nm) de aproximadamente 0,5 (escala de MacFarland), usando espectrofotômetro Ultrospec™ 3100 pro (Amersham Biosciences, UK).

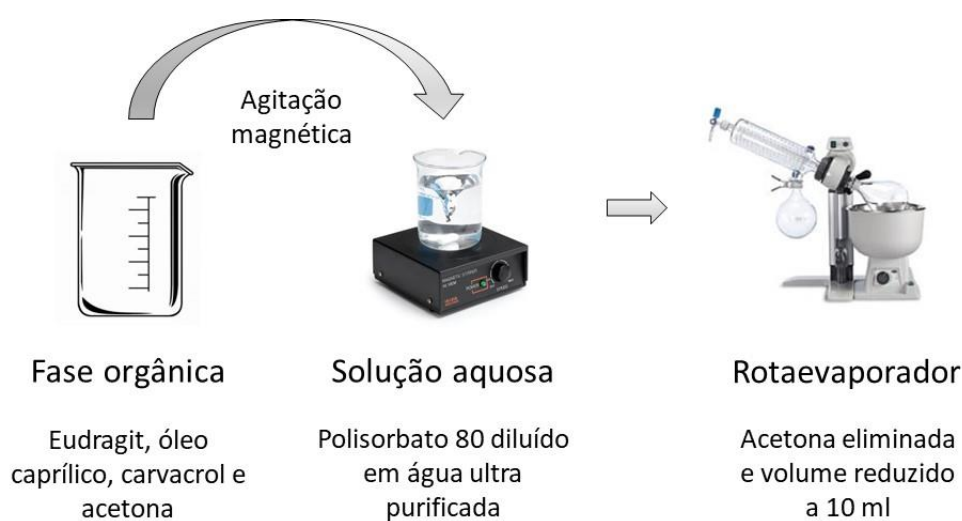
4.2 Reagentes

Carvacrol (98% de pureza) foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) e Eudragit® RS 100 foi adquirido da FDC Ltd. (Mumbai, India). Além desses compostos utilizou-se ácido caprílico (Delaware), acetona (Neon comercial) e Tween 80 (Labsynth).

4.3 Desenvolvimento de nanocápsulas de Eudragit contendo carvacrol

Preparou-se as nanocápsulas de carvacrol através da técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI; GUTERRES, S.; BARRAT, 1995) conforme mostrado na figura 3. Para controle, foi preparada uma solução “branco” utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente, porém sem a encapsulação do agente antimicrobiano carvacrol.

Figura 3: Preparação das nanocápsulas utilizando a técnica da deposição interfacial do polímero pré-formado: A técnica consistiu na preparação de uma solução contendo 0,100 g de Eudragit RL 100, 330 μ L de óleo 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 (água mili-Q). Por fim, a acetona foi eliminada e o volume reduzido a 10 mL em rotaevaporador (Fisatom, modelo 802). O desenvolvimento da nanocápsula de Eudragit contendo carvacrol foi realizado a uma temperatura de 40 °C durante um período aproximado de 3 h.



4.4 Caracterização físico-química das nanocápsulas contendo carvacrol

O diâmetro médio e polidispersidade (PDI) das nanocápsulas foram determinados em equipamento Brookhaven Instruments (modelo EMI9863). O potencial zeta também foi determinado em equipamento da Brookhaven Instruments ZetaPALS (modelo 31450). Para a caracterização, diluiu-se a solução contendo as nanocápsulas em água ultrapura (obtida em equipamento Milli-Q) e filtrou-se em filtro PES estéril com malha 0,22 μ m. Para o controle, foi preparada uma solução “branco” utilizando a mesma metodologia descrita acima, porém sem a encapsulação do agente antimicrobiano carvacrol.

4.5 Eficiência de encapsulação

Para determinação da eficiência de encapsulação utilizou-se uma adaptação do método utilizado por Shao (2018). Primeiramente, foi realizada uma leitura de varredura entre 190 e 900 em espectrofotômetro UV- vis (Amersham Biosciences, Ultrospec 3100 pro) para determinar o comprimento de onda de absorbância máxima de carvacrol, determinando-se comprimento de onda de 297 nm. Após, foi traçada a curva de calibração de carvacrol através da leitura de soluções com concentrações diversas em 297 nm. A seguir as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g a 4 °C por 20 min, após uma alíquota da amostra (0,1 mL) foi diluída em 4,9 mL de etanol 95% e a mistura foi analisada no comprimento de onda de 297 nm, determinando-se a absorbância do sobrenadante. Calculou-se a concentração das amostras através da equação da reta determinada anteriormente, $y = 0,3431x + 0,1305$, onde y representa absorbância (nm) e x representa a concentração da amostra (mg/mL). Para o cálculo da eficiência de encapsulação utilizou-se a equação 1 descrita abaixo.

Equação 1: Cálculo de eficiência de encapsulação.

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

4.6 Determinação da estabilidade das nanocápsulas contendo carvacrol

Durante 45 dias acompanhou-se as características físico-químicas das nanocápsulas de Eudragit contendo carvacrol. Mediu-se o diâmetro médio, polidispersidade e o potencial zeta das nanocápsulas no 1°, 7°, 15°, 26° e 45° dia, seguindo a metodologia descrita acima.

Além disso, a manutenção da atividade antimicrobiana do carvacrol livre e encapsulado em nanopartículas de Eudragit foi determinada no 1°, 26° e no 45° dia seguindo a metodologia descrita nos itens 7.6.1 e 7.6.2.

4.7 Determinação da atividade antimicrobiana do carvacrol encapsulado

Foram realizadas duas metodologias para avaliar se o carvacrol encapsulado em Eudragit apresenta ação antimicrobiana bem como comprovar que as nanocápsulas sem antimicrobiano não inibem as cepas avaliadas.

4.7.1 Metodologia 1 para análise qualitativa

Realizou-se o método de difusão em ágar através da imersão de um swab estéril em tubo contendo *Salmonella* Enteritidis SE86 ($\pm 8 \log$ UFC/mL) seguido de espalhamento em meio de cultura seletivo Xylose Lysine Deoxycholate Ágar (XLD Agar) (Neogen, Lansing, Michigan 48912). Após, pipetou-se 20 μ L da solução de nanocápsulas contendo carvacrol no centro dessa placa. A placa foi levada à geladeira a 5 °C durante 24 h e após levou-se à estufa a 37 °C durante 24 h. Após esse período, foi observado se houve a formação ou não de halo de inibição. Para o microorganismo *Staphylococcus aureus* S6 seguiu-se a mesma metodologia descrita acima, porém utilizou-se o meio de cultura seletivo Baird-Parker Agar (BP Agar) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Como controle repetiu-se o experimento descrito acima, porém utilizando nanocápsulas vazias.

4.7.2 Metodologia 2 para análise qualitativa

Preparou-se diluições decimais seriadas a partir de 1 mL de caldo BHI contendo a cepa de *Salmonella* Enteritidis SE86, correspondendo a proporção de 1:10 (10^{-1}) até diluição 10^{-5} . Após foram retiradas 3 alíquotas de 1 mL da diluição 10^{-5} e transferidas para um eppendorf contendo nanocápsulas com carvacrol ou branco (nanocápsulas vazias) nos volumes 100 μ L, 300 μ L e 500 μ L. Em seguida, 20 μ L de cada eppendorf foi transferido para uma placa com meio seletivo ágar XLD. A placa foi colocada em geladeira a 5 °C durante 24 h e após levada a estufa a 37 °C durante 24 h. Após esse período, foi observado o crescimento de colônias formadas na mesma.

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado para a cepa *Staphylococcus aureus* S6, porém utilizou-se o meio de cultura seletivo BP Agar.

4.8 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM foi determinada através do método de micro diluição em caldo usando microplacas de 96 poços (CLSI, 2002) seguido de plaqueamento em agar seletivo para cada micro-organismo teste. Primeiramente 0,106g do carvacrol foi diluído em uma solução de 10 ml de DMSO 10% (v/v). Em seguida, foram adicionados 100 µL de caldo BHI em cada poço. Após, 100 µL da solução contendo carvacrol 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 bactéria foi adicionada em cada poço, sendo que no último poço não foi adicionada bactéria, servindo assim de controle negativo. Essa técnica foi repetida para os 2 micro-organismos diferentes. Solução de DMSO 10% (v/v) sem o antimicrobiano foi utilizada como controle. A placa de microdiluição foi colocada em geladeira a 5 °C por um período de 24 h e em seguida incubada a 37 °C por 18-24 h. Um volume de 20 µL de cada poço foi inoculado em uma placa contendo o meio seletivo desejado (Agar XLD para *Samonella* Enteritidis SE86 e Agar BP para *S. aureus* S6), incubada a 37 °C durante 18-24 h. Após esse período foi verificado o crescimento ou não de colônias. A CBM foi considerada a menor diluição em que não se observou crescimento bacteriano na placa contendo o ágar seletivo para cada micro-organismo.

4.9 Análises estatísticas

Utilizou-se a análise de variância (ANOVA), considerando o nível de significância de 0,05, para análise estatística dos experimentos. A comparação entre as amostras foi feita através do teste de significância de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software SAS Studio online.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas contendo carvacrol

As nanocápsulas contendo carvacrol apresentaram aproximadamente 146 nm, polidispersidade de 0,181 e potencial zeta de + 23,4 mV. Após filtração em poros de 0,22 μm esses parâmetros físico-químicos não foram significativamente ($p > 0,05$) alterados conforme mostrado na tabela 1. É importante destacar que essa etapa de filtração é importante, pois garante a retenção dos micro-organismos que possam estar presentes, tornando a solução apropriada para avaliação da atividade antimicrobiana (RIBEIRO, B. D. *et al.*, 2018).

As nanocápsulas controle, sem carvacrol, apresentaram tamanho médio de 123 nm, polidispersidade de 0,137 e potencial zeta + 17,7 mV. Após filtração (poros de 0,22 μm) as nanocápsulas controle também mantiveram as mesmas características físico-químicas ($p > 0,05$) (tabela 1). Percebe-se que após a encapsulação o polímero manteve sua carga superficial positiva e quando compara-se as nanocápsulas carregadas com o carvacrol com as nanocápsulas controle verifica-se que não apresentam variação significativa ($p > 0,05$) de tamanho, porém em relação ao potencial zeta as nanocápsulas controle e nanocápsulas contendo carvacrol apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si. Isso demonstra que apesar do polímero manter sua carga superficial positiva, o carregamento com carvacrol aumenta o valor da carga das nanocápsulas. O potencial zeta é a diferença de carga elétrica entre a camada densa de íons ao redor das partículas e a carga do volume do fluido suspenso ao redor desta partícula (Lu et al., 2005). A estabilidade das soluções contendo nanocápsulas pode ser determinada através do potencial zeta, pois quanto maior o potencial zeta, tanto positivo quanto negativo, maiores são as interações repulsivas, diminuindo assim a frequência das colisões e possibilidade de precipitação (MALHEIROS; DAROIT, D.; BRANDELLI, 2010).

Neste trabalho, todas as nanocápsulas desenvolvidas (vazias e carregadas com carvacrol) mostraram tamanho médio das partículas em suspensão variando de 120 a 150 nm (tabela 1). Esses tamanhos são considerados adequados quando se trabalha com nanopartículas, pois consideram-se nanocápsulas quando os sistemas

encapsulados apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm (ARAUJO *et al.*, 1999; HOFFMANN *et al.*, 1997; MULLER *et al.*, 2000). Porém, alguns estudos da área farmacêutica determinam que o tamanho limite para considerar um determinado sistema encapsulado como nanocápsula é de 1000 nm, (FDA, 2010; LEE, M. H.; PARK, H. J., 2015; SCHAFFAZICK, S. R. *et al.*, 2002).

Também estão demonstrados na tabela 1 o índice de polidispersidade. Todos os valores estão próximos a 0,2, indicando uniformidade entre os tamanhos das partículas e, portanto, provável estabilidade das soluções (HOELLER; SPERGER; VALENTA, 2009; KLANG *et al.*, 2012). Katara *et al.*, (2013) ao analisarem nanocápsulas de Eudragit RL 100 contendo aceclofenaco, um composto anti-inflamatório, determinaram índice de polidispersão de 0,186.

Comparando os parâmetros físico-químicos obtidos neste trabalho (tabela 1) com outras pesquisas reportadas na literatura observa-se semelhança nos resultados obtidos. Santos *et al.*, (2013), por exemplo, desenvolveram nanocápsulas de Eudragit RS 100 carregadas com clotrimazol, composto usado para tratamentos vulvovaginais e encontraram o índice de polidispersidade menor que 0,18, tamanho de 144 nm e potencial zeta de + 12 mV. Melo *et al.*, (2010) estudaram as nanocápsulas de poly (L-lactide) contendo benzocaína e encontraram polidispersidade menor de 0,16, tamanho médio em 205,6 nm e potencial zeta de $-33,5 \pm 0,8$ mV. Entretanto, outros trabalhos reportam uma variação de tamanho médio maior para as nanocápsulas. Sharma *et al.*, (2016), por exemplo, estudaram nanocápsula de Eudragit S 100 contendo protamina de insulina, usada para tratamento de diabetes e encontraram um tamanho médio das partículas de 583,2 nm e potencial zeta de $+28,3 \pm 3,7$ mV. Damgé *et al.*, (2010) estudaram nanopartículas de Eudragit® RS carregadas de insulina, para uso oral, e ao analisarem o tamanho médio das nanocápsulas elas apresentaram polidispersidade menor que 0,37, tamanho de 700 nm e um potencial zeta de $+ 40,5 \pm 0,7$.

Tabela 1: Diâmetro médio, polidispersidade (PDI) e potencial zeta das nanocápsulas de Eudragit contendo carvacrol e nanocapsulas de Eudragit vazias (controle) antes e após filtração em poros de 0,22 μm .

Características físico-químicas	Nanocápsulas contendo carvacrol		Nanocápsulas vazias	
	Não filtrado	Filtrado	Não filtrado	Filtrado
Diâmetro (nm)	146,31 ^a \pm 7,7	140 ^a \pm 9,1	123,5 ^a \pm 31,5	120,4 ^a \pm 37,9
PDI	0,181 ^a \pm 0,04	0,204 ^a \pm 0,04	0,137 ^a \pm 0,02	0,168 ^a \pm 0,02
Potencial zeta (mV)	+23,4 ^a \pm 1,7	+ 22,2 ^a \pm 1,3	+17,7 ^b \pm 1,5	+15,2 ^b \pm 1,13

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

5.2 Determinação da eficiência de encapsulação

As nanocápsulas contendo carvacrol desenvolvidas neste trabalho apresentaram eficiência de encapsulação de $97,1 \pm 0,2\%$. Do mesmo modo, Santos et al., (2013) pesquisaram nanocápsulas de Eudragit RS 100 carregadas com clotrimazol e constataram uma eficiência de encapsulação de aproximadamente 99,9%. Outro trabalho utilizando nanocápsulas de Eudragit RS 100 carregadas com um medicamento chamado carvedilol, substância indicada para insuficiência cardíaca e hipertensão, apresentaram uma eficiência de encapsulação de aproximadamente 87% (CHAVES *et al.*, 2017). Polímeros semelhantes ao Eudragit RS 100 foram utilizados por diferentes pesquisadores para encapsulação de medicamentos. Yin et al., (2016) estudaram nanocápsulas de Eudragit S 100 carregadas de psoralidina e encontraram um resultado de 98,1% de eficiência de encapsulação. Katara et al., (2013) estudaram nanocápsulas de Eudragit RL 100 contendo aceclofenaco e obtiveram nanocápsulas com eficiência de encapsulação de 95,7%. Logo, as nanocápsulas de Eudragit RS 100 contendo carvacrol desenvolvidas no presente estudo apresentaram eficiência de encapsulação semelhante aos estudos citados na literatura conforme demonstrado acima. Entretanto, outros trabalhos relacionados a encapsulação de nanopartículas desenvolvidas com diferentes polímeros reportam menor eficiência de encapsulação. Silva de Melo et al., (2012), por exemplo, quando determinaram a eficiência de encapsulação da benzocaína, um anestésico local, das diferentes nanocápsulas poliméricas preparadas com os polímeros poli (d , l -lactídeo-

co-glicolídeo), poli (l-lactídeo) e poli (ϵ -caprolactona), encontraram uma eficiência de encapsulação de 70%.

5.3 Avaliação da estabilidade das nanocápsulas contendo carvacrol

Os resultados da análise de estabilidade das formulações desenvolvidas neste estudo estão demonstrados na tabela 2. Durante os 45 dias de estudo as nanocápsulas não demonstraram diferença significativa em nenhum dos parâmetros físico-químicos analisados, ou seja, tamanho, PDI e potencial zeta.

Das, S. et al., (2010) desenvolveram nanopartículas de Eudragit RL 100 carregadas de anfotericina B. Ao avaliarem o acompanhamento da estabilidade da formulação durante 2 meses mantidos em temperatura entre 2 °C e 6 °C, determinaram que o tamanho das nanocápsulas manteve-se entre 130 a 300 nm. Segundo o estudo de Granata et al., (2018) as nanocápsulas poliméricas de poli (ϵ -caprolactona) carregadas com óleo (mistura de carvacrol com eugenol), apresentaram diâmetro médio de 175 nm, durante um período de pelo menos 30 dias quando mantidas de 4 à 40 °C. Santos et al., (2013) desenvolveram nanocápsulas de Eudragit RS 100 carregadas com clotrimazol, acompanhando suas características por um período de 60 dias e as nanocápsulas mantiveram um tamanho médio de 144 nm.

Portanto, diversos estudos citados acima demonstram que as nanopartículas não apresentam variação em seu tamanho médio quando acompanhadas durante um determinado período, corroborando os resultados encontrados neste estudo. As soluções mantiveram sua estabilidade, pois o PDI manteve-se abaixo de 0.2 e o potencial zeta manteve-se positivo e com valores maiores do que + 20 mV.

Tabela 2: Estabilidade das nanocápsulas de Eudragit RS 100 contendo carvacrol, antes e após filtração (0.22 μm), mantidas a 5 °C durante 45 dias.

Dias	Tamanho (nm)		PDI		Potencial zeta (mV)	
	NCF	NCNF	NCF	NCNF	NCF	NCNF
1	130,7 ^a \pm 2,8	141,65 ^a \pm 6,0	0,19 ^a \pm 0,01	0,21 ^a \pm 0,1	+21,60 ^a \pm 1,55	+25,10 ^a \pm 1,7
7	132,0 ^a \pm 5,8	144,58 ^a \pm 6,7	0,20 ^a \pm 0,08	0,16 ^a \pm 0,02	+21,48 ^a \pm 0,82	+21,74 ^a \pm 1,5
15	146,4 ^a \pm 4,8	147,6 ^a \pm 9,1	0,22 ^a \pm 0,02	0,15 ^a \pm 0,005	+20,63 ^a \pm 1,14	+22,28 ^a \pm 1,8
26	146,7 ^a \pm 6,3	145,05 ^a \pm 0,6	0,20 ^a \pm 0,04	0,18 ^a \pm 0,006	+24,08 ^a \pm 0,96	+23,35 ^a \pm 2,2
45	144,5 ^a \pm 10,1	152,65 ^a \pm 0,7	0,19 ^a \pm 0,05	0,20 ^a \pm 0,04	+23,35 ^a \pm 2,02	+22,74 ^a \pm 1,1

Os dados apresentados são uma média \pm desvio padrão de três diferentes experimentos.

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

*Polidispersidade avalia a variação de tamanho entre as nanocápsulas

NCF: Solução de nanocápsulas de carvacrol filtrada

NCNF: Solução de nanocápsulas de carvacrol não-filtrada

5.4 Determinação qualitativa da atividade antimicrobiana do carvacrol encapsulado

Para comprovar a ação antimicrobiana do carvacrol encapsulado e que as nanocápsulas vazias não apresentam ação antimicrobiana foram utilizados dois testes qualitativos. Utilizando a metodologia 1 (descrita em materiais e métodos) verificou-se formação de halo, portanto, a solução de carvacrol encapsulado demonstrou atividade antibacteriana durante os 45 dias de acompanhamento, para *S. Enteritidis* SE86 (Figura 4B, Figura 4C, Figura 4D) bem como para *S. aureus* S6 (Figura 5B, Figura 5C, Figura 5D) enquanto que ao usar nanocápsulas vazias o crescimento

bacteriano ocorreu em toda a placa (Figura 4A e 5A). As nanocápsulas foram mantidas em geladeira a 5 °C durante 24 horas para que transcorresse o tempo necessário para o carvacrol ser liberado do interior das nanocápsulas, entrando em contato com os micro-organismos.

No estudo de Ibric et al., (2002) foi utilizado nanocápsulas de Eudragit RS como matriz de comprimidos de aspirina para liberação prolongada. As nanocápsulas são formadas por um invólucro polimérico arranjado ao redor de um núcleo contendo o composto ativo protegendo o composto contra a luz, à água e oxigênio (ASSIS, L. M. *et al.*, 2012). Malheiros et al., (2010) também mostraram liberação controlada do composto ativo mas para lipossomas. Esses lipossomas formam uma vesícula única que se engloba na fase aquosa dentro da membrana de fosfolipídios, uma parte dessas vesículas se fecham na membrana lipídica, assim tornando uma partícula de liberação controlada.

Utilizando a metodologia 2 (descrita em materiais e métodos) a solução contendo carvacrol inibiu a multiplicação microbiana nas três concentrações testadas para *S. Enteritidis* SE86 e para *S. aureus* S6. Porém, utilizando as nanocápsulas vazias (sem carvacrol) houve crescimento bacteriano nas três concentrações testadas tanto para a *S. Enteritidis* SE86 como para *S. aureus* S6, comprovando que o agente antimicrobiano é o carvacrol e que o Eudragit é um bom veículo para transporte de antimicrobianos derivados de óleos essenciais (SILVEIRA, 2015). Esses resultados corroboram com outros trabalhos citados na revisão bibliográfica onde o carvacrol apresenta excelente ação antimicrobiana. Por exemplo, estudos realizados por Tampau et al., (2018) mostraram que a encapsulação do carvacrol em policaprolactona foi bastante eficiente contra *E. coli* (Gram-negativa). Martínez-Hernández et al. (2017) realizaram estudo com cenoura minimamente processada, onde compararam a higienização tradicional, realizada com cloro, e utilizando nanopartículas de quitosano-tripolifosfato carregada com carvacrol. O melhor resultado obtido para redução microbiana ocorreu quando foram utilizadas as nanopartículas de quitosano-tripolifosfato carregada com carvacrol (redução de 2 log UFC/g) enquanto a higienização tradicional com cloro reduziu somente 1 log UFC/g. Friedman et al., (2004), mostraram que o carvacrol é um composto de ação rápida, uma vez que inativou os micro-organismos *E. coli* e *Salmonella* em um tempo de exposição de 5 minutos. Logo, diversos estudos

mostraram a eficiência do carvacrol para inibição de micro-organismos, corroborando os resultados encontrados no presente estudo.

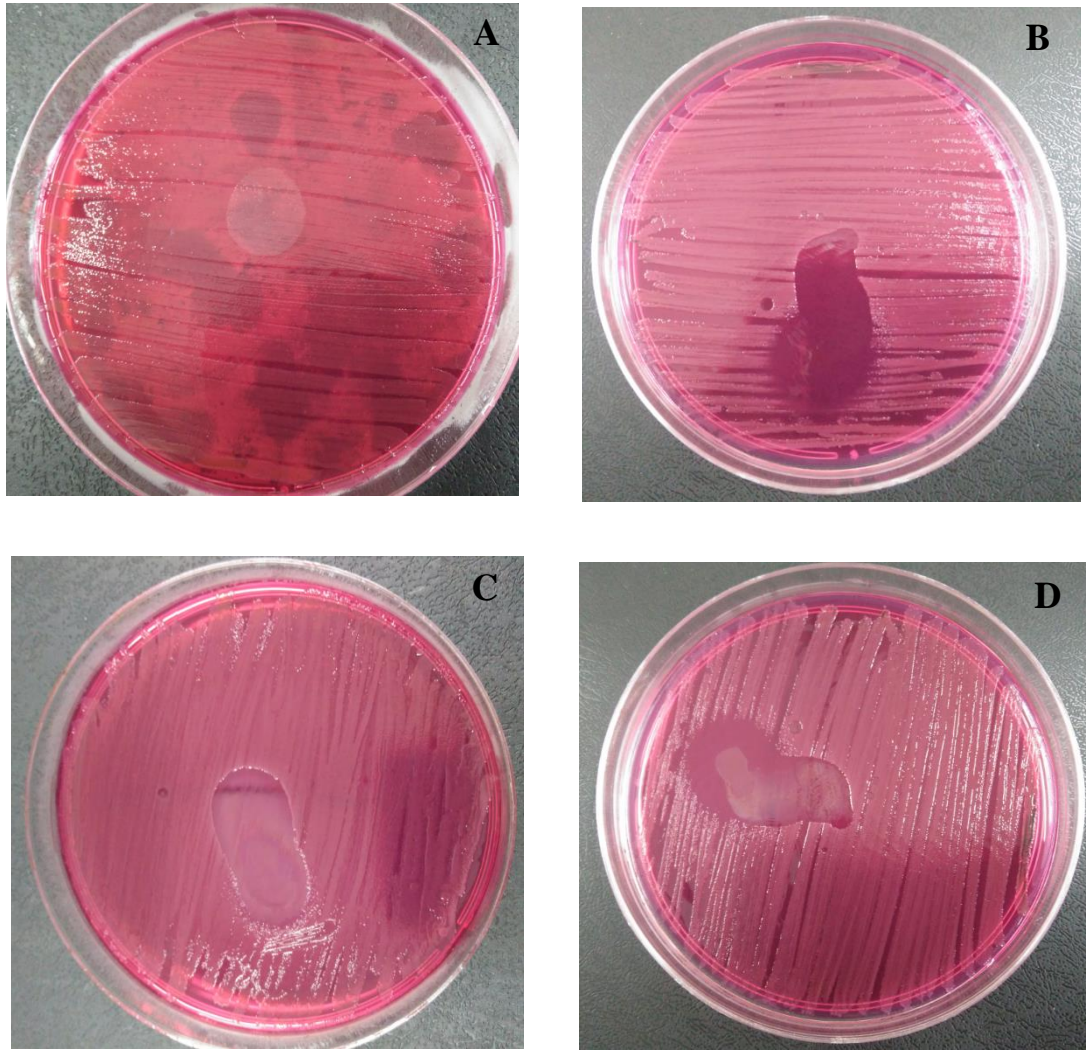


Figura 4: Halo de inibição das nanocápsulas de Eudragit contendo carvacrol sob *Salmonella* Enteritidis SE86. Controle feito com as nanocápsulas vazias mostrando que não ocorreu a inibição do micro-organismo (A); Halo observado no 1º dia de avaliação (B). Halo observado no 26º dia de avaliação (C). Halo observado no 45º dia de avaliação (D).

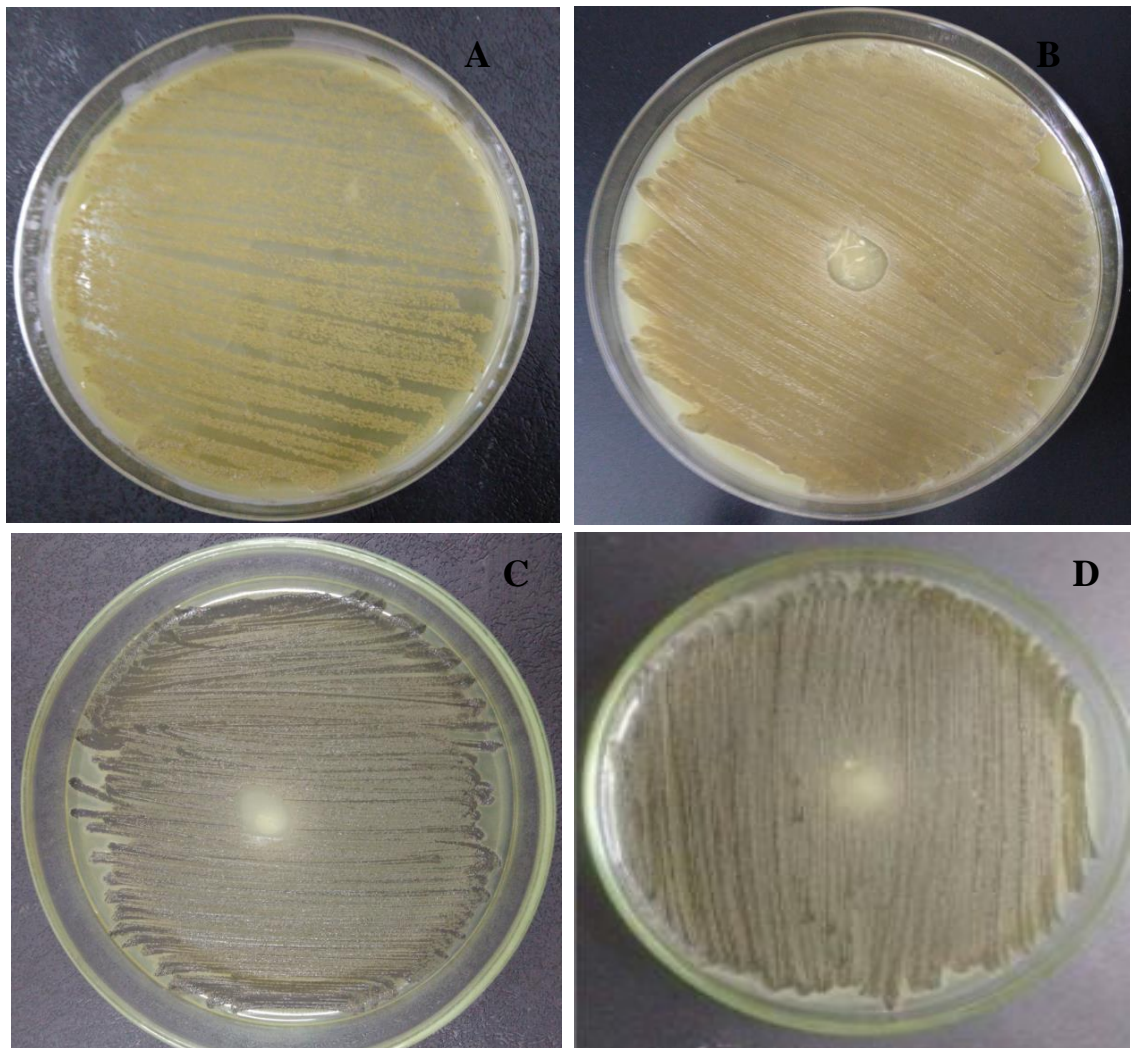


Figura 5: Halo de inibição das nanocápsulas de Eudragit contendo carvacrol sob *Staphylococcus aureus* S6. Controle feito com as nanocápsulas vazias mostrando que não ocorreu a inibição do micro-organismo (A); Halo observado no 1º dia de avaliação (B). Halo observado no 26º dia de avaliação (C). Halo observado no 45º dia de avaliação (D).

5.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do carvacrol livre e encapsulado em nanocápsulas de Eudragit

Os valores de CBM para o carvacrol e as nanocápsulas de Eudragit contendo carvacrol frente às duas diferentes bactérias podem ser observados na Tabela 3. O controle negativo confirmou que o efeito antimicrobiano ocorreu somente quando o carvacrol estava presente na nanocápsula.

Tabela 3: Concentração Bactericida Mínima (CBM) do carvacrol e das nanocápsulas de Eudragit contendo carvacrol para os micro-organismos *Staphylococcus aureus* S6 e *Salmonella* Enteritidis SE86.

Micro-organismo	Composto	CBM (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Carvacrol	0,331
	Nanocápsula de carvacrol e eudragit	0,331
<i>Salmonella</i>	Carvacrol	0,331
	Nanocápsula de carvacrol e eudragit	0,331

Os valores da CBM dos agentes antimicrobianos para os dois micro-organismos testados foram iguais tanto para a solução contendo carvacrol encapsulado como para a solução contendo composto livre, conforme demonstrado na Tabela 3. Da mesma forma Donsi et al (2011), trabalhando com uma mistura de terpenos extraídos de *Melaleuca* alternifolia encontraram valores de CBM para o composto em solução livre iguais ou menores do que CBM para os compostos encapsulados em nanoemulsões contendo esse óleo essencial.

A nanoencapsulação de substâncias bioativas caracteriza uma abordagem viável e eficaz para a manutenção da estabilidade e bioatividade desses compostos, bem como para protegê-los das interações com os ingredientes alimentares (WEISS *et al.*, 2009). O estudo de Hu et. al. (2018) mostram que quando o óleo essencial (canela, tomilho ou gengibre) era encapsulado em nanocápsulas de quitosana o mesmo apresentava uma liberação mais lenta, mostrando uma atividade antibacteriana duradoura contra *Escherichia coli*, uma bactéria gram-negativa associada a contaminação de origem fecal de alimentos. Keawchaon, L., & Yoksan, R. (2011) estudaram nanocápsula de quitosana carregada com carvacrol e obtiveram um valor de CBM contra *S. aureus* de 4,113 mg/mL. Quando comparado com o trabalho em questão, percebe-se que obtivemos resultado atraente para a CBM das nanocápsulas de Eudragit carregadas com carvacrol. A explicação da atividade antimicrobiana do carvacrol pode ter sido pela mudança da estrutura da membrana, uma vez que foi causada pela interação do carvacrol lipofílico com os componentes da membrana fosfolipídica dos micro-organismos. A deformação da estrutura provocaria expansão,

desestabilização da membrana e aumento da fluidez da membrana, o que acabaria por aumentar a permeabilidade passiva (CRISTANI *et al.*, 2007; ULTEE *et al.*, 2000). Estudos relatam que partículas menores, como nanopartículas, podem penetrar em bactérias e, assim, destruir a membrana celular com mais eficiência do que partículas maiores (ELSABEE; ABDU, 2013; SEIL; WEBSTER, 2012).

6. CONCLUSÃO

Nanocápsulas de Eudragit® RS 100 carregadas com carvacrol foram eficientemente preparadas através da técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado. Essas nanocápsulas apresentaram tamanho adequado e uniforme, potencial zeta positivo e alta eficiência de encapsulação. Além disso, foram estáveis por um período de pelo menos 45 dias quando armazenadas a 5 °C. Essas nanocápsulas contendo carvacrol mantiveram a atividade antibacteriana contra os micro-organismos *S. Enteritidis* SE86 e *S. aureus* S6 durante o armazenamento. A CBM foi de 0,331 mg/mL para ambos os micro-organismos, tanto para a solução contendo carvacrol livre quanto para as nanocápsulas de Eudragit carregadas com carvacrol.

Assim, as nanocápsulas de Eudragit RS 100 contendo carvacrol representam uma tecnologia promissora para o controle de *Salmonella* e *S. aureus*. Mais estudos são necessários para aplicação dessas nanocápsulas como um sistema de proteção e liberação controlada para aplicação na área de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, L. *et al.* Uptake of PMMA nanoparticles from the gastrointestinal tract after oral administration to rats: Modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and in oil vehicles. **International Journal of Pharmaceutics**, 1999. v. 176, n. 2, p. 209–224.

ARIMA, H. *et al.* Contribution of cholesterol and phospholipids to inhibitory effect of dimethyl- β -cyclodextrin on efflux function of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 in vinblastine-resistant Caco-2 cell monolayers. **Pharmaceutical Research**, 2004. v. 21, n. 4, p. 625–634.

ASSIS, L. M. *et al.* Revisão : Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos Review : Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2012. v. 15, n. 2, p. 99–109.

AZEREDO, H. M. C. De *et al.* Nanoparticles and Antimicrobial Food Packaging. **Reference Module in Food Science**, 2018. p. 1–13. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978008100596521874X>>.

BAMRUNGSAP, S. *et al.* Nanotechnology in therapeutics: A focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, 2012. v. 7, n. 8, p. 1253–1271.

BODAGHI, H. *et al.* Synthesis of clay-TiO₂nanocomposite thin films with barrier and photocatalytic properties for food packaging application. **Journal of Applied Polymer Science**, 2015. v. 132, n. 14, p. 4–11.

BRADLEY, E. L.; CASTLE, L.; CHAUDHRY, Q. Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. **Trends in Food Science and Technology**, 2011. v. 22, n. 11, p. 604–610. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.002>>.

BUDKA, D.; KHAN, N. A. The effect of *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* essential oils on *Bacillus cereus* in rice-based foods. **European Journal of Biochemistry**, 2010. v. 2, n. 1, p. 17–20.

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

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>>.

CAN BASER, K. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. **Current Pharmaceutical Design**, 2008. v. 14, n. 29, p. 3106–3119. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=14&issue=29&spage=3106>>.

CHAVES, P. Dos S. *et al.* Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2017. v. 114, p. 88–95. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.007>>.

CHICKPETTY, S. M.; BASWARAJ, R.; KUMAR, G. S. Development of novel combined time and pH-dependent based drug delivery systems for targeting 5-fluorouracil to the colon. **Current drug delivery**, 2011. v. 8, n. 5, p. 566–574.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard edition**. Wayne: CLSI, 2008. V. 28.

CONTRI, R. V. *et al.* Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, 2012. v. 8, n. May, p. 1–12.

COSTA, S. DA *et al.* Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. **Journal of Food Engineering**, 2012. v. 110, n. 2, p. 190–199.

CRISTANI, M. *et al.* Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007. v. 55, n. 1, p. 6300–6308.

DAMGÉ, C. *et al.* Poly(ϵ -Caprolactone)/Eudragit Nanoparticles for Oral Delivery of Aspart-Insulin in the Treatment of Diabetes. **Pharmaceutical Nanotechnology**, 2010. v. 99, n. 2, p. 879–889.

DAS, S.; SURESH, P.; DESMUKH, R. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2010. v. 6, n. 2, p. 318–323. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2009.09.002>>.

DEVI, N. *et al.* Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2017. v. 239, p. 136–145. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>>.

DOMINGUES, G.; GUTERRES, S. Microparticulas nanorrevestidas. **In Vitro**, 2008. v. 31, n. 8, p. 1966–1972.

DONSÌ, F. *et al.* Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, 2012. v. 159, n. 4, p. 342–350. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.001>>.

DORMAN, H.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol**, 2000. v. 88, p. 308–316.

ELSABEE, M. Z.; ABDOU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C**, 2013. v. 33, n. 4, p. 1819–1841. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>>.

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.

FDA. **Reporting Format for Nanotechnology-Related Information in CMC Review**. Office of Pharmaceutical Science: Policies and Procedures (MAPP) 50159, 2010. Disponível em: <<https://www.technologylawsource.com/files/2010/06/Reporting-Format-for-Nanotechnology-Related-Inform.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2018.

FESSI, H.; GUTERRES, S.; BARRAT, G. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **Pharm. Res**, 1995.

FRIEDMAN, M. *et al.* Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2004. v. 52, n. 19, p. 6042–6048. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf0495340>>.

FRIEND, D. R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005. v. 57, n. 2 SPEC. ISS., p. 247–265.

GRANATA, G. *et al.* Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. **Food Chemistry**, 2018. v. 269, p. 286–292. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.140>>.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, 2008. v. 124, n. 1, p. 91–97. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160508001177>>.

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>>.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, 2014. v. 46, p. 412–429. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>>.

HIRASA, K.; TAKEMASA, M. **Spice Science and Technology**. Boca Raton: CRC Press, 1998.

HOELLER, S.; SPERGER, A.; VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, 2009. v. 370, n. 1–2, p. 181–186.

HOFFMANN, F. *et al.* Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal of Pharmaceutics**, 1997. v. 157, n. 2, p. 189–198.

HU, J. *et al.* Preparation and properties of cinnamon-thyme-ginger composite essential oil nanocapsules. **Industrial Crops and Products**, 2018. v. 122, n. May, p. 85–92. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.058>>.

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.

IBRIC, S. *et al.* The application of generalized regression neural network in the modeling and optimization of aspirin extended release tablets with Eudragit® RS PO as matrix substance. **Journal of Controlled Release**, 2002. v. 82, n. 2–3, p. 213–222.

JAFARI, S. M. **1 – An overview of nanoencapsulation techniques and their classification**. Gorgan: Elsevier Inc., 2017.

JEON, N. J. *et al.* Inhibitory effect of carvacrol on melanin synthesis via suppression of tyrosinase expression. **Journal of Functional Foods**, 2018. v. 45, n. April, p. 199–205. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.043>>.

KATARA, R.; MAJUMDAR, D. K. Eudragit RL 100-based nanoparticulate system of aceclofenac for ocular delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2013. v. 103, p. 455–462. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.056>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.031>>.

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>>.

KNOWLES, J. R. *et al.* Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by Staphylococcus aureus and Salmonella enterica Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005. v. 71, n. 2, p. 797–803.

KUJUR, A. *et al.* Microencapsulation of Gaultheria procumbens essential oil using chitosan-cinnamic acid microgel: Improvement of antimicrobial activity, stability and mode of action. **LWT - Food Science and Technology**, 2017. v. 86, p. 132–138. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.054>>.

LANDRY, K. S. *et al.* Effectiveness of a spontaneous carvacrol nanoemulsion against Salmonella enterica Enteritidis and Escherichia coli O157: H7 oncontaminated broccoli and radish seeds. **Food Microbiology**, 2015. v. 51, p. 10–17. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.006>>.

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, M. H.; PARK, H. J. 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.

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

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.; 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.

MATTSON, T. E. *et al.* Inactivation of Salmonella spp. on tomatoes by plant molecules. **International Journal of Food Microbiology**, 2011. v. 144, n. 3, p. 464–468. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.035>>.

MELO, N. F. S. DE *et al.* Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, 2010. v. 33, n. 1, p. 65–69.

MOORE-NEIBEL, K. *et al.* Antimicrobial activity of lemongrass oil against Salmonella enterica on organic leafy greens. **Journal of Applied Microbiology**, 2012. v. 112, n. 3, p. 485–492.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 2010. v. 385, n. 1–2, p. 113–142.

MOUSAVI KHANEGHAH, A.; HASHEMI, S. M. B.; LIMBO, S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. **Food and Bioprocess Technology**, 2018. v. 111, p. 1–19. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.001>>.

MULLER, C. R. *et al.* Preparation and Characterization of Spray-Dried Polymeric Nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2000. v. 26, n. 3, p. 343–347.

NEO, Y. P. *et al.* Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein-gallic acid system. **Food Chemistry**, 2013. v. 136, n. 2, p. 1013–1021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.010>>.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Perspectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, 2012. v. 7, n. 1, p. 28–35. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1574-891X&volume=7&issue=1&spage=28>>.

OLADUNJOYE, A. *et al.* Synergistic activity between lauric arginate and carvacrol in reducing salmonella in ground Turkey. **Poultry Science**, 2013. v. 92, n. 5, p. 1357–1365.

PAN, K.; ZHONG, Q. Organic Nanoparticles in Foods: Fabrication, Characterization, and Utilization. **Annual Review of Food Science and Technology**, 2016. v. 7, n. 1, p. 245–266. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-041715-033215>>.

PATRA, C. *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical sciences**, 2017.

- PAYAB, S. *et al.* Preparation and physicochemical characterization of the azithromycin-Eudragit RS 100 nanobeads and nanofibers using electrospinning method. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2014. v. 24, n. 6, p. 585–590. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50123-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50123-2)>.
- 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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.09.004>>.
- PISOSCHI, A. M. *et al.* An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018a. v. 143, p. 922–935. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>>.
- PRAKASH, B. *et al.* Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, 2018. v. 89, p. 1–11. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.018>>.
- RIBEIRO, B. D. *et al.* **Microbiologia Industrial: Alimentos, Vol. 2**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2018.
- ROSSI-BERGMANN, B. Bartira Rossi-Bergmann. **Ciência e Cultura**, 2008. v. 60, n. 2, p. 54–57.
- ROTA, C. *et al.* In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants against Selected Foodborne Pathogens. **Journal of Food Protection**, 2004. v. 67, n. 6, p. 1252–1256. Disponível em: <%5C%5CRobsrv-05%5Creference manager%5CArticles%5C9260.pdf>.
- SANTOS, C. L. *et al.* Nanomaterials with Antimicrobial Properties : Applications in Health Sciences. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, 2013. v. 1, p. 143–154.
- 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>>.
- SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 2002. v. 21, n. 2, p. 99–106.
- SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. **International Journal of Nanomedicine**, 2012. v. 7, p. 2767–2781.
- 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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.101>>.
- SHARMA, S. *et al.* **Protamine coated proliposomes of recombinant human insulin encased in Eudragit S100 coated capsule offered improved peptide delivery and permeation across Caco-2 cells**. Delhi: Elsevier B.V., 2016. V. 67.

- SHEMESH, R. *et al.* Active packaging containing encapsulated carvacrol for control of postharvest decay. **Postharvest Biology and Technology**, 2016. v. 118, p. 175–182. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.009>>.
- SHI, L. E. *et al.* Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: A review. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, 2014. v. 31, n. 2, p. 173–186. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2013.865147>>.
- SILVA DE MELO, N. F. *et al.* (2012). **Benzocaine-Loaded Polymeric Nanocapsules: Study of the Anesthetic Activities**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(3), 1157–1165. doi:10.1002/jps.22829
- SILVEIRA, E. **Desenvolvimento e avaliação farmacológica de nanocápsulas de cinamato de metila**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/13597>>.
- SINGH, A.; SHARMA, P. K.; GARG, G. Natural products as preservatives. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 2010. v. 1, n. 4.
- SIRELKHATIM, A. *et al.* Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Letters**, 2015. v. 7, n. 3, p. 219–242. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>>.
- SOKMEN, A. *et al.* The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, 2004. v. 15, n. 8, p. 627–634.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, 2012. v. 23, n. 2, p. 136–141.
- SOUTO, E.; SANTANA, M. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros -Parte I. **Polímeros**, 2012. p. 96–100.
- SULTANA, T. *et al.* Microbiological analysis of common preservatives used in food items and demonstration of their in vitro anti-bacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, 2014. v. 4, n. 6, p. 452–456.
- TAMPAU, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. Release kinetics and antimicrobial properties of carvacrol encapsulated in electrospun poly-(ϵ -caprolactone) nanofibres. Application in starch multilayer films. **Food Hydrocolloids**, 2018. v. 79, p. 158–169.
- ULTEE, A. *et al.* Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, 2000. v. 63, n. 5, p. 620–624.
- UPADHYAYA, I. *et al.* Rapid inactivation of *Salmonella enteritidis* on shell eggs by plant-derived antimicrobials. **Poultry Science**, 2013. v. 92, n. 12, p. 3228–3235.
- VASILACHE, V. *et al.* Nanoparticles applications for improving the food safety and food processing. **Bramat 2011**, 2011. n. February, p. 77–81.
- WEISS, J. *et al.* **Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials**.

New York: Academic Press, 2009.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.007>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.058>>.