



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE NANOLIPOSSOMAS CONTENDO NISINA E EXTRATO DE
ALHO (*Allium sativum* L.)**

CRISTIAN MAURICIO BARRETO PINILLA

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE NANOLIPOSSOMAS CONTENDO NISINA E EXTRATO DE
ALHO (*Allium Sativum* L.)**

CRISTIAN MAURICIO BARRETO PINILLA
Engenheiro de Alimentos - UNAD

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio
Ambiente como requisito parcial para a obtenção
do grau de Grau de Mestre em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Adriano Bradelli

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março, 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Barreto Pinilla, Cristian Mauricio
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOLIPOSSOMAS CONTENDO
NISINA E EXTRATO DE ALHO (*Allium sativum* L.) /
Cristian Mauricio Barreto Pinilla. -- 2016.
103 f.

Orientador: Adriano Brandelli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Nanotecnologia. 2. lipossomas. 3. Nisina. 4.
Alho. I. Brandelli, Adriano, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação minha
mãe, que é minha inspiração e
sempre esteve ao meu lado, me
apoiando em todas as minhas
decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio e compreensão, porque mesmo com a distância me brindaram seu apoio incondicional.

Ao Dr. Prof. Adriano Brandelli, por ter acreditado em mim para fazer parte de seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos e as orientações.

Aos colegas do laboratório 218 do ICTA, pelo acolhimento, paciência e incentivo desde o momento que cheguei ao laboratório.

Quero agradecer a todos aqueles que fizeram parte da realização deste trabalho, que direta ou indiretamente me ajudaram ou incentivaram, ao longo desta etapa de crescimento profissional e pessoal.

Por último, agradeço ao apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

“Y uno aprende a construir todos sus caminos
en el hoy, porque el terreno de mañana es
demasiado inseguro para planes... y los
futuros tienen una forma de caerse en la
mitad...

Y uno aprende que realmente puede
aguantar, que uno realmente es fuerte, que
uno realmente vale, y uno aprende y
aprende... y con cada día uno aprende...”

Jorge Luís Borges

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOLIPOSSOMAS CONTENDO NISINA E EXTRATO DE ALHO (*Allium Sativum* L.)

Autor: Cristian Mauricio Barreto¹

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

RESUMO

A segurança dos alimentos é uma questão importante para a indústria e os consumidores de alimentos. Neste contexto, a indústria de alimentos tem um desafio tecnológico devido ao aumento da preocupação sobre a utilização de conservantes químicos e ao aumento da demanda por alimentos mais naturais e minimamente processados.

Este trabalho teve como objetivos a incorporação de extrato de alho em nano estruturas de fosfatidilcolina e avaliação da sua atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*; avaliou-se, a produção de nanolipossomas com a combinação de nisina e extrato de alho, e avaliar a sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Como resultado, foram obtidos nanolipossomas contendo extrato de alho com 174,6 nm de diâmetro hidrodinâmico, polidispersividade de 0,26; potencial zeta de -16,2 mV e eficiência de encapsulação de 47,46%. Estes nanolipossomas reduziram em 4 ciclos logarítmicos a contagem de células viáveis em quatro das cinco cepas de *Listeria* spp testados, depois de 10 horas de incubação a 37°C em leite integral. No segundo momento, foram desenvolvidos nanolipossomas contendo a mistura nisina/extrato de alho, os quais apresentaram um diâmetro hidrodinâmico de 179 nm, potencial zeta de -27,7 mV e uma eficiência de encapsulação de 82% e 90%, para nisina e extrato de alho respectivamente. Estes nanolipossomas reduziram em 5-6 ciclos logarítmicos a contagem de células viáveis de bactérias gram-positivas em 3-4 ciclos logarítmicos a contagem de bactérias gram-negativas, comparados com o controle, quando incubadas em leite integral a 37°C. Os produtos livres e encapsulados (extrato de alho e nisina/extrato de alho) apresentaram idênticos resultados de atividade antimicrobiana. Sendo assim, é possível afirmar que o processo de encapsulação manteve as propriedades antimicrobianas dos compostos analisados. Os resultados deste estudo indicam que nanolipossomas que contêm a combinação de nisina e extrato de alho têm um alto potencial como antimicrobiano para uso em alimentos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (101p.) Março, 2016.

DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY EVALUATION OF NANOLIPOSOMES CONTAINING NISIN AND GARLIC EXTRACT (*Allium Sativum* L.)

Author: Cristian Mauricio Barreto¹
Supervisor: Adriano Brandelli

ABSTRACT

Food safety is an important issue for the industry and food consumers. In this context, food industry has a technological challenge due to increase of the concern about the use of chemical preservatives and the rising demand for more natural and minimally processed foods. This study aimed to the incorporation of garlic extract into nano estruturas of phosphatidilcholine and evaluation of its antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*; also, to produce nano liposomes with the combination of nisin and garlic extract and the evaluation of its antimicrobial activity against gram-negative and gram-positive bacteria. As results, were obtained nano liposomes containing garlic extract with 174.6 ± 17.3 nm of hidrodinamic diameter, polidispersivity index of 0.26, zeta potencial of -16,2 mV and with an entrapment efficiency of 47.46%. These nano liposomes decreased in 4 log cycles in viable cell counts in four of the five strains of *Listeria spp.* tested, later of 10 hours of incubation at 37°C in whole milk. In a second moment, were development nano liposomes containing the combination of nisin/garlic extract, which had a hidrodinamic diameter of 179 nm, zeta potencial of -27.7 mV and an entrapment efficiency of 82% and 90% for nisin and garlic extract, respectively. These nanoliposomes decreased in 5-6 log cycles the viable gram-positive bacteria counts and 3-4 log cycles the viable gram-negative bacteria counts, comparated with the control, when incubated in whole milk at 37°C. The free and encapsulated products (garlic extrac and nisin/garlic extract) showed identical results of antimicrobial activity. Therefore, it can say that the encapsulation process kept the antimicrobial properties of the compounds analyzed. The results of this study indicate that nanoliposomes containing the combination of nisin and garlic extract has a hight potencial as antimicrobial for food use.

¹Master of Science dissertation in Agricultural Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (101p.) March, 2016.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	IX
RELAÇÃO DE FIGURAS	X
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS.....	3
1.1.1. Objetivo Geral.....	3
1.1.2. Objetivos Específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Alho (<i>Allium sativum</i> L).....	5
2.1.1. Composição Química.....	7
2.1.2. Aplicações fitoterapêuticas.....	11
2.2. Nisina.....	13
2.3. Nanotecnologia na indústria de alimentos.....	17
2.4. Liposomas.....	20
2.4.1. Metodologias de preparação.....	22
2.4.2. Propriedades dos lipossomas.....	24
2.4.3. Aplicações.....	26
2.5. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs).....	28
2.6. <i>Listeria monocytogenes</i>	29
3. ARTIGO 1: Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing garlic extract with antilisterial activity	33
4. ARTIGO 2: Antimicrobial activity of nanovesicles co-encapsulating nisin and garlic extract against gram-positive and gram-negative bacteria in milk	54
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
6. PERSPECTIVAS	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição química dos bulbos de alho7

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing GE. .41

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Entrapment efficiency (EE) and physical characteristics of liposomes encapsulating nisin, allicin, and nisin-GE64

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** (*Allium sativum* L)..... 6
- Figura 2.** Estrutura química e quantidade de alguns compostos organulfurados presentes no alho..... 9
- Figura 3.** Estrutura química da Nisina 12
- Figura 4.** Diversos tipos de lipossomas que podem ser formados a partir de bicamadas fosfolipídicas, incluindo vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas multilamelares (MLV) e vesículas multivesiculares (MVV)..... 21
- Figura 5.** Cabeças hidrofílicas de fosfolipídios encontrados em membranas celulares com cargas diversas. As percentagens representam a abundância relativa em membranas de eritrócitos. 25
- Figura 6.** Vários tipos de compostos bioativos hidrofílicos que podem ser incorporados no interior hidrofílico (W2) de lipossomas..... 27

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Transmission electron microscopy images of liposomes encapsulating garlic extract (C,D) and control liposomes (A,B). Bar = 200 nm (A,C) and 500 nm (B,D)..... 41
- Figura 2.** Histograms of size distribution obtained by laser diffraction of GE liposomes (A), control liposomes (B)..... 42
- Figura 3.** Graphic representation showing the fluctuation in the intensity of scattered light as a function of time. Correlograms of GE liposomes (A) and control liposomes (B). 43
- Figura 4.** Growth of *Listeria* spp. strains at 37°C in whole milk, containing free or encapsulated GE. Viable counts were monitored in samples containing GE encapsulated in PC/GE nanovesicles (triangle), free GE (circle) and control with phosphate buffer liposomes (square). The initial population *Listeria* spp. was 4.0 log CFU/mL..... 45

CAPÍTULO 4

- Figura 1.** Structural morphology of liposomes by transmission electron microscopy. (A, C) Control liposomes with phosphate buffer and (B, D) nisin-GE loaded liposomes. (A,B) bar = 200 nm; (C,D) bar = 500 nm. 65
- Figura 2.** Growth of *S. aureus* 1901 (A), *E. coli* 8739 (B), *S. enteritidis* SE86 (C) and *L. monocytogenes* ATCC 7644 (D) in milk at 37°C containing free or encapsulated nisin-GE. Viable counts were monitored of free nisin-GE (◆), phosphatidylcholine encapsulated nisin-GE (◇), free nisin (●) free GE (▲). Control (■). 66

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem
°C: Graus Celsius
™: Trade Mark
µg: microgramas
µL: microlitros
ANAPA: Associação Nacional de Produtores de Alho
ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
aw: Atividade de agua
BAL: Bactéria ácido láctica
CDC: Center for Diases Control and Prevention
DAS: Dialil sulfito
DADS: Dialil disulfito
DATS: Dialil trisulfito
DETEN/MS: Departamento Técnico-Normativo da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde
DTA: Doença transmitida por alimentos
EUA: Estados Unidos de America
FAO: Food and Agriculture Organization
FDA: Food and Drug Administration
g: grama
GRAS: Generally Recognized as Safe
h: hora
HPMC: Hidroxipropil-metilcelulose
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kcal: Kilocaloría
Kg: Kilograma
LUV: Large unilamellar vesicles
mg: miligrama
min: minuto
mL: mililitro
MVV: Multi- vesicular vesicles
nm: nanômetro
NNI: National Nanotechnology Initiative
OMS: Organização Mundial da Saúde
PA: Ácido fosfatídico
PC: Fosfatidilcolina
PE: Fosfatidiletanolamina
pH: Potencial de Hidrogênio Iônico

R: Radio
SAC: S-allil cisteina
SC: Caseinato de sódio
SE: Fosfatidilserina
SUV: Small unilamellar vesicles
UI/g: Unidades internacionais por grama
UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas
UFC: Unidade Formadora de Colônia
US\$: United States Dollar
WHO: World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

A *Listeria monocytogenes* é o agente causador da listeriose, uma doença de origem alimentar que afeta os idosos, mulheres grávidas, fetos, recém-nascidos e pessoas com o sistema imunológico enfraquecido (Allerberger e Wagner, 2010). *L. monocytogenes* é uma séria preocupação para a indústria de alimentos, pois este agente patogênico pode se multiplicar em temperaturas de refrigeração comumente utilizadas para controlar desenvolvimento microbiano nos alimentos (4°C a 10°C) e também tolera altas concentrações de sal e pH baixo (Ferreira et al., 2014). Muitas categorias de alimentos têm sido relacionadas com surtos de listeriose: leite, queijos macios e outros produtos lácteos, salsichas, peixe defumado, saladas e charcutaria (Garrido et al., 2010). Embora *L. monocytogenes* seja inativada por tratamentos térmicos utilizados em alimentos processados, pode ocorrer contaminação cruzada no pós-processamento do alimento através de equipamentos e do meio ambiente, devido à persistência deste patógeno nas áreas de processamento (Ferreira et al, 2014.; Meloni et al, 2014.; Ortiz et al., 2014).

O alho (*Allium sativum* L.) é uma planta amplamente distribuída em todas as partes do mundo, utilizada não somente como condimento, mas também como um remédio popular para diversas situações, tais como feridas, infecções, gripe e úlcera. Com o uso popular do alho, reconhecido como fitoterapêutico pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pela resolução número 10 de 09 de março de 2010, e a grande procura pela descoberta de novos produtos naturais com

atividade antimicrobiana, é de grande importância à realização de estudos que forneçam parâmetros mais precisos quanto ao seu real potencial antimicrobiano. Neste contexto a alicina, principal componente responsável pela atividade antimicrobiana, é um potencial conservante para ser utilizado na indústria de alimentos. No entanto, a alicina é volátil, e sua estabilidade e solubilidade são baixas. Além disso, pode facilmente causar irritação da mucosa gástrica humana e é susceptível à oxidação por luz e calor (Cai et al., 2007; Curtis, et al., 2004; Harris et al., 2001).

A nisina é uma bacteriocina de amplo espectro bem conhecida, ativa contra bactérias Gram-positivas e patógenos associados com os alimentos. Seu uso como um bioconservante de alimentos é limitado pela falta de efeito contra as bactérias Gram-negativas; além disso, o desenvolvimento de resistência à nisina tem sido relatado em alguns patógenos Gram-positivos (Ming & Daeschel, 1993). A combinação de bacteriocinas com outros mecanismos de conservação tem sido relatada como alternativa para reduzir a resistência a bacteriocinas em bactérias e também como meio para ampliar sua atividade inibitória para espécies Gram-negativas (Stevens et al., 1991).

Os lipossomas são vesículas esféricas, formados por membranas anfipáticas de bicamadas fosfolipídicas com núcleo aquoso. Lipossomas têm sido amplamente investigados nos últimos anos, como carreadores coloidais, já que possuem múltiplas vantagens, como a biodegradabilidade, biocompatibilidade e capacidade de liberação controlada de compostos (Kima & Baianua, 1991; Neethirajan & Jays, 2011). Os lipossomas podem ser utilizados numa vasta gama de aplicações, devido às suas características físicas e químicas, e sua capacidade de incorporar compostos lipofílicos, anfifílicos e/ou hidrofílicos (Khosravi et al., 2007).

Na indústria alimentar, lipossomas são frequentemente utilizados para encapsular nutracêuticos, saborizantes de alimentos, corantes e antimicrobianos (Keller, 2001; Taylor et al., 2005).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados de fosfolipídios, com incorporação de extrato de alho em combinação com nisina, como potencial agente antibacteriano contra *L. monocytogenes*. No presente documento serão apresentados dois artigos científicos relatados no capítulo 3 e 4, onde são descritas as metodologias e os resultados relacionados aos objetivos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar nanovesículas de fosfatidilcolina que contêm a combinação de nisina e extrato de alho e avaliar sua atividade antimicrobiana.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver nanovesículas de fosfatidilcolina que contêm extrato de alho pelo método de hidratação de filme.
- Caracterizar fisicoquimicamente os lipossomas de extrato de alho (morfologia, tamanho, potencial zeta e polidispersividade).
- Avaliar sua atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* em meio complexo (leite) de lipossomas que contêm extrato de alho, mediante curvas de crescimento microbiano.

- Desenvolver nanovesículas de fosfatidilcolina contendo a mistura de nisina e extrato de alho pelo método de hidratação de filme.
- Caracterizar fisicoquimicamente os lipossomas da mistura de nisina e extrato de alho (morfologia, tamanho, potencial zeta e polidispersividade).
- Avaliar sua atividade antimicrobiana meio complexo (leite) de lipossomas contendo a mistura de nisina e extrato de alho mediante ensaios de atividade em placa e curvas de crescimento microbiano.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Alho (*Allium sativum* L)

Historicamente o alho tem sido ressaltado como parte de uma dieta saudável. Em textos médicos antigos do Egito, Grécia, Roma, China e Índia o alho é prescrito para uma série de aplicações, incluindo a melhoria do desempenho físico, reduzindo infecções, e protegendo contra toxinas (Rivlin, 2006). Estas propriedades medicinais, juntamente com suas características de sabor, fizeram do alho um verdadeiro ícone cultural em muitas partes do mundo. Assim, o alho é utilizado tradicionalmente como um intensificador de sabor e tem sido reconhecido não somente como um condimento alimentar, mas também um potente agente terapêutico (Yun et al., 2014).

O alho é originário de zonas temperadas da Ásia Central onde é conhecido popularmente como alho comum. É uma planta herbácea da família *Alliaceae*, de porte baixo, que atinge 0,40-0,70 m de altura. Tem folhas lanceoladas, as quais formam o pseudocaule implantando-se em um caule pequeno e achatado e as gemas do caule formam os bulbilhos (dentes), que em conjunto formam o bulbo (Figura 1). Os bulbilhos têm morfologia ovóide-arqueada e às vezes levemente periforme, que encontram-se envolvidos por uma ou mais folhas protetoras de coloração branca arroxeada. O bulbo é arredondado, periforme e constituído por aproximadamente 5 a 20 bulbilhos (Harvey, 1995).



Figura 1. (*Allium sativum* L), fonte : EMBRAPA, Hortaliças Folders 2013.

O alho apresenta grande importância sócio-econômica no Brasil, com uma produção de 116.764 toneladas em 2015 segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Também é importante ressaltar que o Brasil é o segundo consumidor de alho no mundo, alcançando 1,50 Kg de alho/habitante/ano, perdendo somente para a China. Mesmo assim a produção nacional abastece somente 40% do consumo da população e os outros 60% são importados, principalmente da China (40%) e da Argentina (20%), segundo a Associação Nacional de Produtores de Alho (ANAPA 2014). Atualmente o Brasil está entre os quinze maiores produtores de alho do mundo. Sua participação na produção mundial se mantém acima de 0,5%, tendo chegado a mais de 1% em 1990, um ano de baixa produção na China. Mesmo sendo um grande produtor, o Brasil também se encontra entre os dez maiores importadores de alho do mundo, que no ano de 2011 foram: Indonésia com um 30,74% do mercado, Brasil (12,00%), Vietnã (10,82%), Malásia (6,45%), Estados Unidos (5,31%), Rússia (4,28%), Paquistão (3,54%), Emirados Árabes (3,39%), Bangladesh (2,23%) e Arábia Saudita (3,23%) (ANAPA, 2014).

2.1.1 Composição química

Os principais constituintes químicos do alho estão apresentados na tabela 1, onde se ressalta a quantidade de carboidratos, (23,9 g/100g de matéria seca) e proteínas (7 g/100g de matéria seca). A maior concentração de fitoquímicos terapêuticos encontra-se nos bulbos. O óleo essencial adquirido a partir do bulbo contém mais de 53 constituintes, principalmente ajoeno, alicina e aliina e derivados orgânicos do enxofre, os quais conferem ao alho propriedades farmacológicas, dentre as quais se encontra a atividade antibacteriana (Lorenzi & Matos. 2002).

Tabela 1. Composição química dos bulbos de alho

Composição por 100g de matéria seca	
Energia (Kcal)	113
Umidade (%)	67,5
Carboidratos (g)	23,9
Fibra (g)	4,3
Proteínas (g)	7
Lipídeos (g)	0,2
Cinzas (g)	1,3
Cálcio (mg)	14
Magnésio (mg)	21
Fósforo (mg)	149
Potásio (mg)	535
Ferro (mg)	0,8

Tiamina (mg)	0,18
Piridoxina (mg)	0,44

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. UNICAMP (2011)

A maioria de suas propriedades medicinais e benéficas para a saúde são atribuídas aos compostos organosulfurados presentes nos bulbos do alho. Diversos estudos têm mostrado que estes compostos possuem propriedades benéficas contra doenças cardiovasculares, neurológicas, câncer, doenças do fígado, bem como efeitos na prevenção contra alergias e artrite (Amagase et al., 2001; Amagase, 2006).

A composição química dos extratos do alho depende das condições de extração: temperatura, tempo e polaridade do solvente e o teor de compostos organosulfurados nos bulbos de alho, que podem sofrer alterações durante o cultivo e armazenamento (Lawson et al., 1991). As atividades biológicas também dependem de muitos outros fatores como, o local de origem, os métodos de processamento do alho, as metodologias de purificação dos compostos organosulfurados e as perdas por decomposição destes compostos durante o processamento (Yun et al. 2014). Portanto, os métodos para purificação de compostos organosulfurados e a seleção do tipo de alho são fatores de grande importância para avaliar a atividade biológica dos produtos dessa planta.

Alguns dos mais importantes compostos funcionais do alho e suas concentrações estão apresentados na Figura 2; entre estes, a alicina é considerado o composto organosulfurado mais abundante no alho e o principal componente responsável pelo odor pungente e atividade biológica (Cho, Rhee, & Pyo, 2006). A alicina é um derivado do aminoácido cisteína. É gerado pela interação da enzima

alinase com o seu substrato aliina. Somente quando o dente de alho é esmagado, a alicina é formada pela ação da alinase sob a aliina, uma vez que a enzima e o substrato estão localizados em diferentes compartimentos do bulbo (Arzanlou & Bohlooli, 2010). Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas à alicina, incluindo atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, atividade antiparasitas e anticancerígenas em adição à capacidade para inibir a agregação plaquetária e diminuir os níveis de lipídeos séricos no sangue (Gonen et al., 2005; Haase et al, 2012; Mirona et al., 2008; Okada et al., 2006). Embora estes efeitos sejam bem conhecidos, os mecanismos exatos de ação ainda não foram estabelecidos.

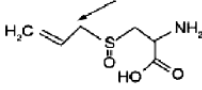
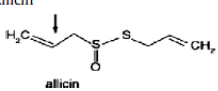
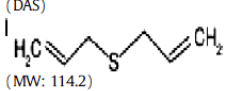
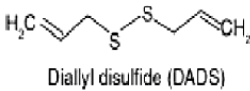
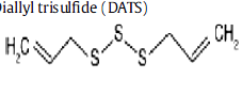
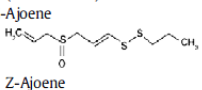
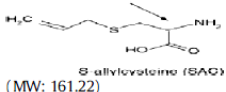
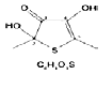
Sulfur components	Contents (mg/g)	Origin of garlic	Isolation solution	References
Alliin  (MW: 62.28)	25-30 6.7 16.7-21.4 5.3-9.4 22.1	Korean garlic cloves Korean garlic bulbs Germany dried garlic Germany fresh garlic Japanese garlic	Water Water Water Water Water	Yoo et al., 2010 Yoo et al., 2010 Bloem et al., 2011 Bloem et al., 2011 Shimpo et al., 2002
Allicin  (MW: 162.27)	2.3-4.6 7.7 6.1-7.7 2.4-3.5 5.1-6.6 5.0-5.3	Korean garlic Australian garlic USA garlic Switzerland garlic Chinese garlic Japanese garlic	Water Water Water Water Water Water	Yoo et al., 2010 Sterling & Eagling, 2001 Koch & Lawson, 1996 Ziegler & Sticher, 1989 Lawson et al., 1991 Ueda et al., 1991
Diallyl sulfide (DAS)  (MW: 114.2)	0.01-0.02 0.00-0.02 0.00-0.02 0.02-0.23	Greek garlic Greek garlic Greek garlic Korean garlic	Diethyl ether Ethyl acetate Hexane Dichloromethane	Kimbaris et al., 2006 Kimbaris et al., 2006 Kimbaris et al., 2006 Lee et al., 2003
Diallyl disulfide (DADS)  (MW: 146.28)	0.08-0.28 0.06-0.231 0.07-0.26 0.57-0.89	Greek garlic Greek garlic Greek garlic Korean garlic	Diethyl ether Ethyl acetate Hexane Dichloromethane	Kimbaris et al., 2006 Kimbaris et al., 2006 Kimbaris et al., 2006 Lee et al., 2003
Diallyl trisulfide (DATS)  (MW: 178.34)	0.00-0.20 0.01-0.22 0.01-0.18 0.11-0.39	Greek garlic Greek garlic Greek garlic Korean garlic	Diethyl ether Ethyl acetate Hexane Dichloromethane	Kimbaris et al., 2006 Kimbaris et al., 2006 Kimbaris et al., 2006 Lee et al., 2003
E-Ajoene  (MW: 234.4)	0.17 0.17 0.12 0.47	Japanese garlic Japanese garlic Japanese garlic Japanese garlic	Soybean oil Rice oil Soybean oil Rice oil	Naznin et al., 2008 Naznin et al., 2008 Naznin et al., 2008 Naznin et al., 2008
S-allyl cysteine (SAC)  (MW: 161.22)	0.45 0.36-0.60	USA garlic Korean garlic	Water Water	Amagase & Milner, 1993 Yoo et al., 2010
Thiacremonone  (MW: 160.19)	0.7 (µg/g)	Korean garlic	Ethyl acetate	Hwang et al., 2007

Figura 2. Estrutura química e quantidade de alguns compostos organulfurados presentes no alho (Fonte: Yung et al., 2014).

De acordo com Mirone et al., (2004) a aliina é convertida em ácido sulfênico pela enzima aliinase, a qual é liberada quando o bulbo é triturado. O ácido sulfênico, por sua vez, dimeriza-se formando a alicina, composto muito instável que se decompõe rapidamente, produzindo sulfitos voláteis, principalmente dissulfito de dialila, substância bastante estável, responsável pelo odor pungente e sabor característico do alho.

A alicina, quando produzida, tem propriedades antimicrobianas contra uma vasta gama de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus. Este composto exibe um largo espectro de atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, tais como *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Clostridium*, *Mycobacterium tuberculosis*, e *Helicobacter pylori* (Ankri & Mirelman, 1999; Bakri & Douglas, 2005; Bendahou et al., 2008; Miron et al., 2000; Mirona et al., 2008). Esta atividade é atribuída principalmente a seu poder antioxidante, que provoca uma reação instantânea com os grupos tiol livres da parede celular criando poros e penetrando facilmente nas células, desativando as suas enzimas (Miron et al., 2000).

Outros dois compostos importantes são o dialil sulfito (DAS) e o ajoeno. O DAS é um composto sulfurado presente no óleo de alho e que é produzido como um resultado da decomposição de alicina. DAS tem potencial para agir como um antioxidante biológico já que é captador de radicais livres e suprime a ação de substâncias reativas ao oxigênio, protegendo as biomoléculas contra danos oxidativos (Kalayarasan. 2008). Já o ajoeno (4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-trieno-9-

óxido) que também é produto da degradação da alicina, tem atividades biológicas anti-trombose, antimicrobianas e de redução do colesterol. O ajoeno também exerce efeito na ativação de plaquetas e ligação destas à parede danificada dos vasos sanguíneos (Castro et al., 1994).

2.1.2. Aplicações fitoterapêuticas

Ao longo dos últimos 30 anos, muitos relatos na literatura de estudos epidemiológicos, indicam que uma dieta rica em alho é capaz de diminuir o risco para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer, tais como gástrico, de estômago e de cólon (Yung et al., 2014).

Estudos pré-clínicos, forneceram fortes evidências de que vários compostos organosulfurados naturais são altamente eficazes na proteção contra o câncer induzido por diferentes agentes cancerígenos em análises *in vivo*. Em diferentes experimentos com animais o DAS, DADS, DATS, ajoeno, SAC (Tabela 2) e extratos de alho foram documentados como inibidores do desenvolvimento de tumores em pulmão, fígado, próstata e pele (Shankar et al., 2008; Chandra-Kuntal & Singh, 2010; Wu et al., 2011).

Tomados em conjunto, os compostos organosulfurados isolados de alho poderiam exercer grandes efeitos benéficos, devido à sua toxicidade relativamente baixa e boas atividades anticancerígenas já que possuem diversos mecanismos de ação (Yung et al., 2014). Assim, os compostos organosulfurados poderiam ser potencialmente úteis como agentes quimioterapêuticos para o tratamento do câncer.

Evidências experimentais indicam que a ingestão de alho reduz os níveis de colesterol no sangue e inibe a síntese de colesterol (Zeng et al., 2012). Extratos

de alho podem reduzir a síntese de colesterol em até 75%, sem evidência de toxicidade celular (Yeh e Liu, 2001). Estes resultados indicaram que os compostos contendo um alil-disulfeto ou grupo alilo-sulfidrilo são os responsáveis na inibição da síntese do colesterol feita pelo alho. Também tem sido demonstrado que os compostos mais solúveis em água, como o SAC, presentes no extrato de alho são menos citotóxicos e mais eficientes em inibir a biossíntese do colesterol do que os compostos organosulfurados lipossolúveis tais como o DAS (Yeh e Liu, 2001).

Alguns relatos demonstraram os efeitos do alho sobre a agregação plaquetária (Pierre et al., 2005). Acredita-se que o mecanismo de inibição dos constituintes do alho na agregação de plaquetas inclui a inibição da mobilização de cálcio (Qi et al., 2000). Em geral, há evidências suficientes em termos de redução do risco de doenças cardiovasculares, sugerindo assim que compostos organosulfurados poderiam se transformar em um potencial produto para a saúde do sistema cardiovascular.

Além disso, estudos recentes têm demonstrado efeitos benéficos do extrato do alho e um dos seus ingredientes ativos (SAC) em modelos de doença de Alzheimer (Chauhan, 2006; Ray et al., 2011). Outros estudos recentes em humanos sugerem que o alho oferece proteção contra o estresse oxidativo e atividade antioxidante em pacientes com doença hepática alcoólica, diminuindo o estresse oxidativo induzido pelo álcool (Zeng et al., 2008; Nencini et al., 2010).

Embora o alho tenha sido utilizado com segurança como um condimento ou um aditivo de aroma e tradicionalmente para fins medicinais, é também conhecido que o consumo excessivo de alho pode causar problemas. Os efeitos adversos que têm sido documentados em humanos incluem uma sensação de queimação na boca e trato gastrointestinal, náuseas, diarreia, vômitos e dor corporal

(Barnes et al., 2007). O potencial alergênico do alho é bem reconhecido, e os compostos alérgenos foram identificados: DADS, sulfeto de alilo e a propila alicina (Barnes et al., 2007). No entanto o *United States National Cancer Institute* testou a toxicidade de compostos típicos de alho e observaram que, em seres humanos, doses diárias de até 60 g de alho fresco e 120 mg de óleo essencial de alho, ao longo de um período de três meses, não resultou em nenhum distúrbio de saúde grave (Anonymous, 1997).

2.2. Nisina

A nisina é uma bacteriocina, obtida naturalmente de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, durante a fase exponencial de crescimento do microorganismo. A nisina é geralmente considerada como segura (GRAS) e foi autorizada pela FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos como conservante de alimentos desde 1980 (Dillon & Board, 1994). Em 1971, Gross e Morrell foram os primeiros a elucidar que a nisina é um peptídeo pequeno de 34 aminoácidos (Figura 3). A nisina é um peptídeo lantibiótico carregado positivamente e com um peso molecular de 3,4 kD com capacidade para se ligar a membranas citoplasmáticas carregadas negativamente (Liu & Hansen. 1990).

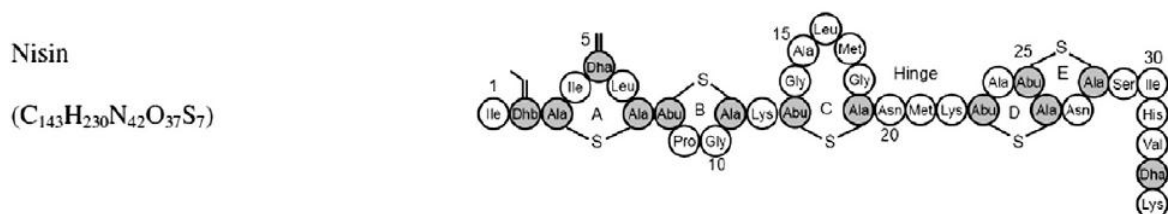


Figura 3. Estrutura química da Nisina. Fonte: (Hsu et al., 2004)

Compostos lantibióticos têm estruturas policíclicas, uma propriedade muito importante das bacteriocinas, que permite alterar a integridade da membrana celular. Acredita-se que a estrutura de anel mantém a rigidez do peptídeo e o protege de proteases e de degradação térmica (Kuipers et al., 1996). A nisina apresenta várias propriedades antimicrobianas: liga-se ao precursor de peptidoglicano e de lípidos II para inibir a biossíntese da parede celular, para depois formar poros dentro da membrana, que conduzem à liberação de íons essenciais e morte celular (Hsu et al., 2004). Geralmente, as bactérias Gram positivas são muito sensíveis à nisina, incluindo bactérias ácido lácticas (BAL), *Listeria*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus* spp. e também as bactérias formadoras de esporos, tais como *Bacillus* e *Clostridium* (Chen & Hoover, 2003). No seu mecanismo esporostático, nisina liga-se aos grupos sulfidrilo dos resíduos das proteínas.

Quando aplicada em combinação com o calor e baixo pH, a nisina aumenta sinergicamente a sua atividade contra esporos. Aouadhi et al. (2016) concluíram que os esporos de *Bacillus sporothermodurans* LTS27 submetidos a meio ácido sofrem alterações morfológicas. Estas alterações podem torná-los mais sensíveis à inativação por tratamento térmico em combinação com nisina o que torna este processo muito eficaz em produtos alimentares de baixa acidez e com tratamento térmico.

A viabilidade do uso da nisina está baseada em que bactérias lácticas (BAL) e seus metabólitos têm sido processados e consumidos em todo o mundo, sem efeitos adversos. Alimentos contendo bacteriocinas, compostos purificados e extrato de cultura de BAL têm sido avaliados (Yang et al., 2012; Siroli et al., 2016). A nisina é amplamente utilizada em produtos alimentares, incluindo queijo, saladas, sopas enlatadas, gelo para armazenamento de peixe, alimentos para bebês,

milkshakes e produtos de panificação (Samelis et al., 2005; Dischinger et al., 2014), tendo características ideais para um aditivo alimentício, na medida em que não apresenta efeitos sobre a microbiota normal do intestino, é atóxica, não afeta a cor ou sabor dos alimentos e apresenta estabilidade térmica.

Atualmente a Comissão da FAO/WHO permite uma ingestão diária de até 33.000 unidades de nisina por 70 kg de peso corporal. O limite máximo diário de ingestão de nisina varia de país para país. Na Austrália, Grã-Bretanha e França a nisina é permitida sem limite máximo, enquanto que nos EUA, o limite máximo é de 10.000 UI/g; na Rússia, o limite máximo é de 8000 UI/g, enquanto que na Argentina, Itália e México, o limite é de 500 UI/g, para os queijos e alimentos processados (Chen & Hoover, 2003). No Brasil, a nisina tem o seu uso permitido pela Legislação Brasileira (DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996) com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/kg (500 UI/g).

A nisina tem variantes designadas como tipos de nisina A, Z, M, Q, que são derivados de *Lactococcus lactis*, enquanto os tipos U e U2 são obtidos a partir de *Streptococcus uberis*, e nisina P é produzida por *Streptococcus suis* e *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (Qi, et al., 2012; Wu et al, 2014). Nisina A e Z se diferenciam uma da outra pela posição do um único aminoácido His27Asn (Mulders et al., 1991). A nisina F é codificada por um plasmídeo de *L. lactis* F10, o qual foi isolado a partir de intestino do *peixe-gato* de água doce na África do Sul, e difere da nisina A em duas posições dos aminoácidos His27Asn e Ile30Val (De Kwaadsteniet, Dez Doeschate, & Dicks, 2008). A nisina Q, isolada a partir de *L. lactis* 61-14, foi encontrada no Japão e difere em quatro posições de aminoácidos a partir de nisina A, ou seja, His27Asn, Ile30Val, Ala15Val, e Met21Leu

(Zendo et al., 2003). Nisinas U e U2, produzidas por *S. uberis* foram isolados de casos de mastite bovina nos EUA e diferem em nove posições de aminoácidos (Wirawan, Klesse, Jack, & Tagg, 2006).

Recentemente, uma nova variante da nisina, produzida por *Streptococcus hyointestinalis*, foi isolada a partir do intestino de suíno e é chamada nisina H (O'Connor et al., 2015). Entre esses oito tipos, nisina A é o tipo mais ativo contra patógenos. Vários tipos de concentrados de nisina são comercialmente produzidos e rotineiramente adicionados a alimentos para controlar as bactérias patogênicas em produtos como leite, queijos pasteurizados, molhos e molhos para salada (Gálvez, Abriouel, López, & Omar, 2007). Entre estes o Nisaplin™, é o produto mais estabelecido no mercado, composto por 2,5% nisina A, 77,5% NaCl e leite desidratado isento de gordura (12% de proteína e 6% de carboidratos) e é normalmente utilizado na indústria alimentar para conservação (Guiga et al., 2010).

No entanto, quando a nisina é adicionada aos alimentos, ocorrem interações com os componentes da matriz alimentar, reduzindo a sua eficácia e, portanto, diminuindo a estabilidade dos alimentos (Aasen et al., 2003). A atividade biológica da nisina pode ser negativamente afetada por vários componentes alimentares, tais como proteínas e lípidos, glutatona, proteases, metabissulfito de sódio e dióxido de titânio, a inativação pela degradação enzimática, ou distribuição desigual de moléculas de nisina no interior da matriz alimentar (Aasen et al., 2003; Quintavalla & Vicini, 2002; Jung, Bodyfelt, & Daeschel, 1992). Mesmo com essas limitações, a eficácia da nisina pode ser melhorada se a sua transferência nos produtos alimentares for controlada, como demonstrado por Imram et al (2014) que

avaliaram diferentes compostos biodegradáveis nos quais foi incorporada nisina. Observaram um importante efeito antibacteriano de filmes de HPMC (Hidroxipropilmetilcelulose) e SC (caseinato de sódio) contendo nisina contra *L. monocytogenes* CIP 82110 e *S. aureus* CIP 4.83, devido a interações fortes entre o meio e o filme. Além disso, o uso de nisina incorporada em nanoestruturas como lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas foi testado com bons resultados (Malheiros et al., 2012; Donsi et al., 2012; Bernela et al., 2014).

2.3. Nanotecnologia na indústria de alimentos

Nanociência e nanotecnologia apresentam um grande potencial em várias áreas do conhecimento, incluindo química, física, ciências da vida, medicina, engenharia, ciências cognitivas, informação e ciências da comunicação. Representa, portanto, uma convergência real entre os diversos campos do conhecimento (Rossi et al., 2014; Khan et al., 2015). Diversos projetos de pesquisa e desenvolvimento extensivos estão em andamento com o objetivo de ganhar vantagem competitiva e participação de mercado. Para uma indústria onde a concorrência é intensa e inovação é vital, as nanotecnologias têm surgido como um auxílio potencial para avanços na produção de alimentos de melhor qualidade e com propriedades funcionais (Cushen et al., 2012).

As oportunidades e vantagens da nanotecnologia estão se expandindo rapidamente em todos os campos e muitos países estão investindo grandes quantidades de recursos em pesquisa como o governo dos EUA que, com o objetivo de ter uma grande participação nestas tecnologias vai fornecer em 2016 mais de US\$ 1,5 bilhões para a National Nanotechnology Initiative (NNI), um investimento

contínuo em apoio das prioridades do governo e sua estratégia de inovação. Os grandes investimentos dos países como EUA, estão ligados ao impacto da nanociência em campos ligados à saúde e bem-estar que são hoje muito fortes. Espera-se que as aplicações de nanotecnologias tragam grandes benefícios para o setor de alimentos e nutrição. Os fenômenos que ocorrem em escala nanométrica oferecem muitas oportunidades de inovação que têm o potencial de impactar substancialmente a indústria de alimentos em todo o mundo. As nanotecnologias podem ser aplicadas a toda a cadeia alimentar, desde a produção até o processamento, incluindo sistemas de liberação controlada de compostos, embalagens e produtos para segurança alimentar (Brandelli & Taylor, 2015; Cushem et al., 2012, Silvestre et al., 2011). A nanotecnologia pode fornecer novas formas e ferramentas para controlar as propriedades e estruturas dos alimentos, introduzindo novos recursos, que podem acrescentar valor aos produtos alimentícios.

Os nanomateriais são caracterizados por terem pelo menos, uma dimensão com comprimento entre 1 nm e 100 nm, embora o limite superior de 100 nm seja utilizado por consenso geral sem qualquer evidência científica, para apoiar um desaparecimento de nano-propriedades acima deste valor. Alguns autores sugeriram considerar produtos derivados da nanotecnologia como materiais exibindo propriedades ou fenômenos (incluindo efeitos biológicos) que são atribuíveis às suas dimensões, mesmo que esta esteja fora da faixa de nanoescala dos 100 nm (Tinkle et al., 2014).

No futuro próximo, a nanotecnologia irá desempenhar um papel fundamental em duas das principais áreas de processamento de alimentos, embalagens de alimentos e ingredientes alimentares/aditivos (Shukla, 2014). Para

este propósito, vários sistemas de liberação controlada, baseados em nanotecnologia têm sido desenvolvidos, incluindo nanolipossomas, nanoemulsões, nanopartículas e as nanofibras (Weiss et al., 2006). Atualmente, um dos principais focos das aplicações de nanotecnologia nos alimentos é o desenvolvimento de nanoestruturas (ou nanotexturas), ingredientes alimentares e sistemas de liberação controlada de nutrientes e suplementos. Diversos tipos de processos estão sendo utilizados para esses fins, incluindo nanoemulsões, micelas surfactantes, emulsões de dupla camada e micelas reversas (Morris, 2011). Destes, as nanomicelas transportadoras de nutracêuticos e suplementos nutricionais, já estão disponíveis comercialmente. Outra importante área de aplicações de nanotecnologia é a nanoencapsulação de ingredientes e aditivos para fornecer barreiras de proteção ou mascaramento do sabor, liberação controlada e melhoramento da capacidade de dispersão de ingredientes alimentares e aditivos insolúveis em água (Cushen et al., 2012). Neste contexto, nanomateriais orgânicos podem ser sintetizados para fins específicos, tais como o encapsulamento de nutrientes para aumentar biodisponibilidade, melhorar sabor, textura e a consistência dos alimentos ou mascarar um sabor indesejável ou odor (Rossi et al., 2014).

Um grande número de nutracêuticos e suplementos nutricionais que contêm nano-ingredientes e aditivos (por exemplo, vitaminas, antimicrobianos, antioxidantes) estão disponíveis no mercado. Estes produtos tipicamente oferecem maior absorção e biodisponibilidade dos ingredientes no corpo. Mesmo assim, as funcionalidades de tais nanomateriais, como o tamanho de partículas, distribuição do tamanho, índice de polidispersividade e carga elétrica da superfície, podem ser afetadas pela matriz biológica onde eles são colocados (Powers et al., 2006), como por exemplo a composição de um alimento.

Embora existam muitos benefícios dessas tecnologias há também preocupação com potenciais efeitos negativos. No caso das partículas de tamanho nanométrico que entram em contato com o corpo humano, por exemplo, a redução no tamanho de partícula associada com a nanotecnologia tem potencial de reduzir a eficácia das barreiras à penetração de matérias estranhas no corpo humano permitindo seu livre movimento dentro do corpo (Cushen et al., 2012), resultando na acumulação de contaminantes tóxicos e, por conseguinte, afetando de forma adversa a saúde humana (Chau et al., 2007).

2.4. Lipossomas

Os lipossomas são um dos sistemas de liberação controlada mais comumente estudados para a encapsulação, proteção e liberação de bioativos hidrófilicos, na medida em que eles podem ser fabricados a partir de componentes de grau alimentar usando métodos de laboratório relativamente simples (Mozafari et al., 2008; Singh et al., 2012). Lipossomas produzidos a partir de fosfolipídios são pequenas vesículas artificiais em forma de esfera. Os fosfolipídios utilizados para a formação das vesículas são os componentes responsáveis pela formação natural de membranas de bicamadas lipídicas (Beloglazova et al., 2015). De modo geral tais compostos são excelentes emulsionantes que podem atuar para estabilizar emulsões e aumentar a hidrofiliidade dos compostos hidrofóbicos (Li et al., 2015).

Os fosfolipídios se arranjam espontaneamente em bicamadas dentro de uma solução aquosa, de modo que as caudas não polares diminuem seu contato com a água devido ao efeito hidrofóbico (McClements., 2015). Os lipossomas

possuem uma variedade de estruturas (Fig. 4), dependendo da sua composição, método de preparação, e as condições ambientais (Torchilin et al., 2003). Lipossomas unilamelares têm uma estrutura em forma de balão que compreende uma única bicamada, enquanto lipossomas multilamelares têm uma estrutura de tipo cebola, consistindo em múltiplas bicamadas concêntricas (Taylor et al., 2005). Os lipossomas unilamelares podem ser ainda classificados como pequenas vesículas unilamelares (SUV) ($R < 100$ nm) ou grandes vesículas unilamelares (LUV) ($R > 100$ nm). Vesículas multi-vesiculares (MVV) consistem em numerosas vesículas menores presas dentro de uma vesícula maior (Fig. 4).

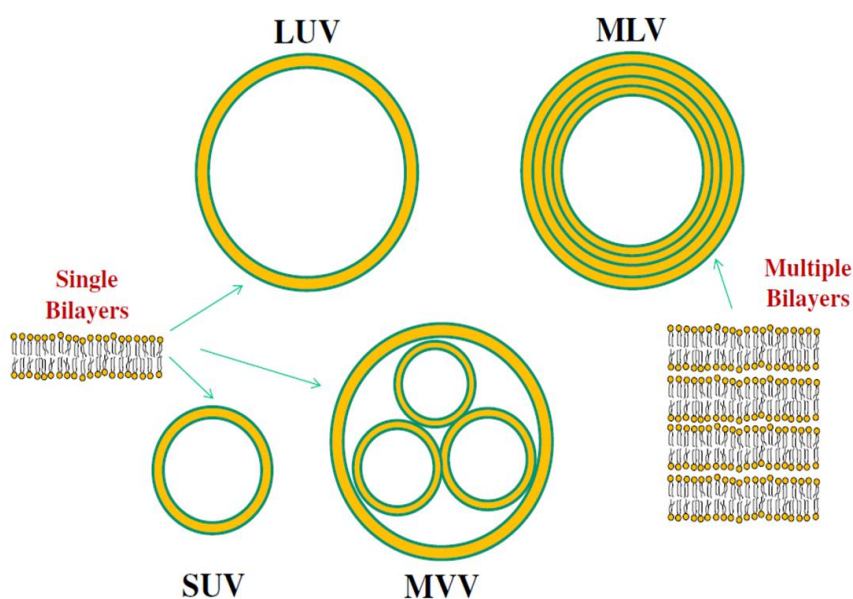


Figura 4. Diversos tipos de lipossomas que podem ser formados a partir de bicamadas fosfolipídicas, incluindo vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas multilamelares (MLV) e vesículas multivesiculares (MVV). Fonte: (McClements, 2014).

Os lipossomas podem ser fabricados a partir de fontes de lipídios naturais, tais como soja, leite e ovos (Thompson et al., 2007). Por conseguinte, os

lipossomas e as suas nanoestruturas têm o potencial de obter aprovação regulamentar para uso em alimentos. Além disso, a quantidade de compostos bioativos necessários para um efeito específico é reduzida quando encapsulados em lipossomas em comparação com compostos não encapsulados (Mozafari et al., 2008).

No entanto, existem inúmeros desafios que atualmente limitam a sua aplicação generalizada na indústria de alimentos. Primeiro, são de difícil fabricação em larga escala de forma viável e o processo tem um alto custo. Em segundo lugar, muitas vezes eles têm uma fraca estabilidade física nas condições de processamento e armazenamento de muitos produtos alimentares. Terceiro, eles tipicamente têm uma baixa eficiência de encapsulação para bioativos hidrofílicos porque uma fração apreciável permanece fora das partículas durante o processo de encapsulação (McClements, 2014). No entanto, os avanços na tecnologia de ingredientes, operações de processamento e mecanismos de estabilização, pode levar à utilização mais generalizada de lipossomas na indústria de alimentos no futuro.

2.4.1. Metodologias de preparação

Embora os fosfolipídios formem bicamadas espontaneamente quando adicionados a soluções aquosas, estes geralmente não podem formar lipossomas com boas propriedades estruturais. Em vez disso, processos de fabricação apropriados devem ser utilizados para preparar lipossomas de acordo com as características desejadas, por exemplo, morfologia, tamanho, capacidade de carregamento e eficiência de encapsulação (Torchilin, 2003; Maherani, 2011).

Alguns dos métodos de fabricação mais importantes para a preparação de sistemas de encapsulação baseados em lipossomas são os seguintes (McClements, 2014):

Hidratação de filme:

Os fosfolípidos são dissolvidos num solvente orgânico, e em seguida, colocados em um recipiente adequado (tal como um frasco de fundo redondo). O solvente é então removido por evaporação, deixando um filme fino de fosfolípidos ligados às superfícies internas do recipiente. Uma solução aquosa é então adicionada ao recipiente fazendo descolar as camadas de fosfolípidos, e assim espontaneamente, formam-se os lipossomas em água. Este método leva à formação tipicamente de grandes vesículas multilamelares, mas estas podem ser transformadas em pequenas vesículas unilamelares (SUV), por aplicação de energia mecânica, por exemplo, ultrassom, homogeneização de alta pressão, ou microfluidização.

Deslocamento de solvente:

Os fosfolípidos são dissolvidos em um solvente orgânico anfifílico (como o etanol) e em seguida, a mistura resultante é injetada numa solução aquosa. O solvente orgânico se move rapidamente até a solução aquosa circundante, o que faz com que os fosfolípidos se transformem em lipossomas.

Deslocamento tensoativo (surfactante).

Este método é baseado no mesmo princípio do método de deslocamento de solvente, porém, um agente tensoativo solúvel em água é usado no lugar de um solvente orgânico anfifílico. Os fosfolípidos são misturados com o agente tensoativo, e em seguida, esta mistura é injetada em uma solução aquosa, que faz com que o

agente tensoativo se movimenta para dentro da solução aquosa circundante e os fosfolípidos se transformem em lipossomas.

Homogeneização:

Os fosfolípidos são dispersos em uma solução aquosa para formar uma suspensão de duas fases, e em seguida esta suspensão é homogeneizada utilizando ultrassom de alta potência, válvulas de alta pressão, microfluidização ou homogeneização por membrana. Estes métodos geralmente resultam na formação de pequenas vesículas unilamelares (SUV).

2.4.2. Propriedades dos lipossomas

Suspensões contendo lipossomas pequenos aparecem opticamente transparentes porque não dispersam a luz fortemente, ao passo que as suspensões que contêm lipossomas maiores podem apresentar turbidez. A aparência de suspensões de lipossomas também depende da sua estrutura (Fig. 4), que determina o seu comportamento de dispersão de luz (Khlebtsov, 2001).

As características elétricas dos lipossomas dependem do tipo e da concentração de fosfolípidos dentro da formulação (Singh et al., 2012). Dentre os fosfolípidos empregados na fabricação de lipossomas o ácido fosfatídico (PA) tem apenas grupos aniônicos ligados à sua cabeça hidrofílica, enquanto que fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilserina (SE) têm grupos, catiônicos e aniônicos ligados na sua cabeça hidrofílica (Figura 5). O grau de ionização dos grupos de cabeça varia de acordo com o pH: PA vai desde altamente negativo em alto pH neutro para pH baixo; PE, PC e SE pode ir de negativo em valores altos de pH a positivo a pH baixo (McClements, 2015). O fato de que os

grupos de cabeça de fosfolipídios são eléctricamente carregados significa que os sistemas de lipossomas que os contêm são geralmente sensíveis a alterações de pH e força iônica.

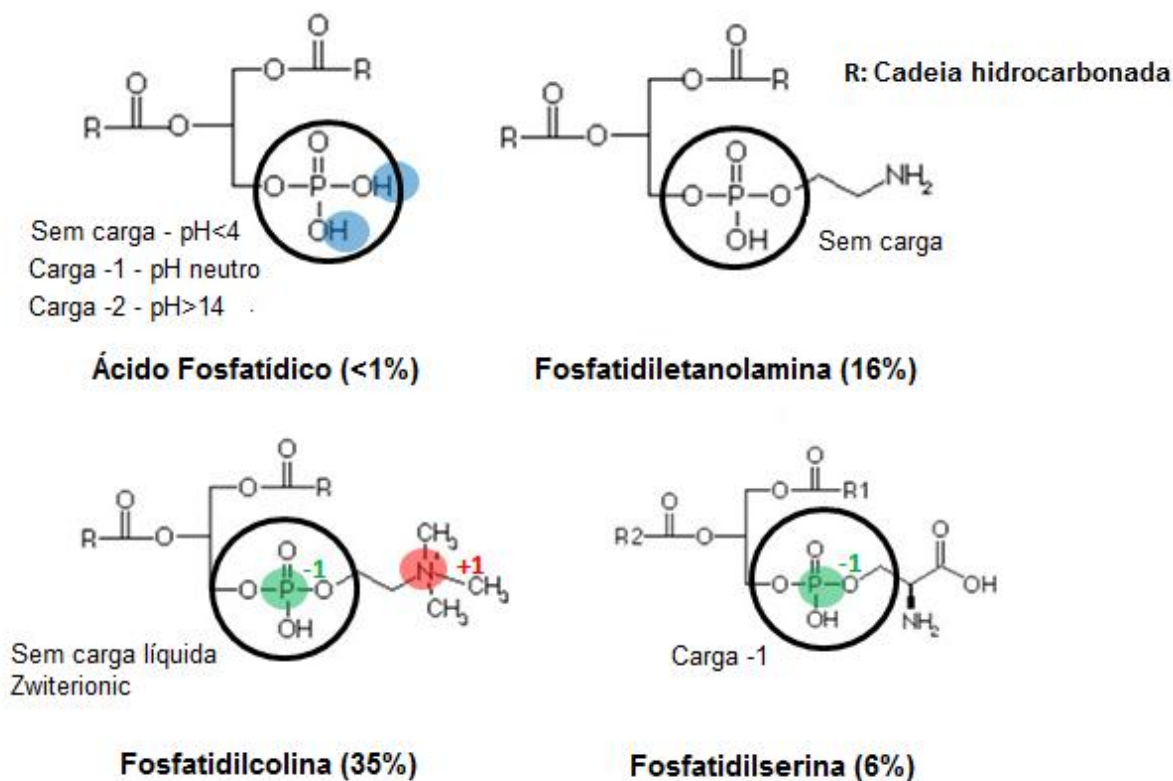


Figura 5: Cabeças hidrofílicas de fosfolipídios encontrados em membranas celulares com cargas diversas. As percentagens representam a abundância relativa em membranas de eritrócitos. Fonte: Faller, R. "Introduction to Membrane and Lipid Fundamentals." Lecture. Davis, CA. April 3, 2014.

Um dos maiores desafios que limita a utilização de lipossomas em produtos alimentares e bebidas comerciais é a sua fraca estabilidade fisicoquímica (Mozafari et al., 2008; Singh et al., 2012). A formação de camadas duplas de lípidos em soluções aquosas é termodinamicamente favorável, mas a manutenção de uma estrutura de lipossoma particular não é (Maherani et al., 2012). Consequentemente, as propriedades dos lipossomas podem mudar durante o armazenamento,

transporte e utilização, o que pode afetar a sua estabilidade e desempenho funcional.

Lipossomas têm tipicamente uma carga negativa que lhes confere estabilidade parcial contra agregação através repulsão eletrostática (McClements, 2015). Assim, qualquer fator que reduz as interações eletrostáticas pode promover a agregação dos lipossomas, fatores tais como alteração do pH para um valor onde os lipossomas perdem a carga ou a presença de sais que aumentam a força iônica na solução. A estabilidade física dos lipossomas para este tipo de agregação pode, às vezes, ser melhorada com revestimentos de biopolímeros que aumentem a repulsão eletrostática, por exemplo, quitosana catiônica (Laye et al., 2008).

Outro fator importante que impacta a adequação de um sistema de liberação controlada baseado em lipossomas para uma aplicação particular, é sua capacidade de reter um bioativo no interior aquoso da cápsula. Alguns bioativos têm solubilidades relativamente altas em óleo ou água, por conseguinte, difundem-se rapidamente para fora do lipossoma, atravessando a membrana lipídica para formar parte da fase aquosa externa (McClements, 2015). Este processo pode ser retardado controlando a permeabilidade da membrana lipídica, por exemplo, por alteração da composição da bicamada. Os fosfolipídios de caudas não polares mais longas e mais saturadas são muitas vezes mais rígidos e impermeáveis do que aqueles com caudas mais curtas e insaturadas. A presença de colesterol ou esteróis de plantas dentro das bicamadas lipídicas também os torna mais rígidos e impermeáveis, sendo uma alternativa para melhorar a sua capacidade de reter componentes bioativos (Singh et al., 2012).

2.4.3. Aplicações

Numerosos tipos de bioativos hidrofílicos podem ser potencialmente incorporados na fase interna aquosa de lipossomas, incluindo pequenas moléculas e íons (tais como sais, açúcares, peptídios), biopolímeros (proteínas e polissacarídios), e partículas (gotículas lipídicas, nanopartículas, e probióticos) (Fig. 6). Uma variedade de moléculas bioativas hidrofóbicas (como, vitaminas A, D, E, carotenóides, e coenzima Q10) e hidrofílicos (por exemplo, vitamina C, ferro, cálcio) foram anteriormente incorporados em sistemas de liberação controlada baseados em lipossomas (Singh et al., 2012; Xia et al., 2006, Tan et al., 2013). Diversos estudos mostraram que os lipossomas podem melhorar a funcionalidade enzimática na maturação de queijos e remoção de lactose de produtos lácteos (Singh et al., 2012; Xia et al., 2006, Kim et al 1999).

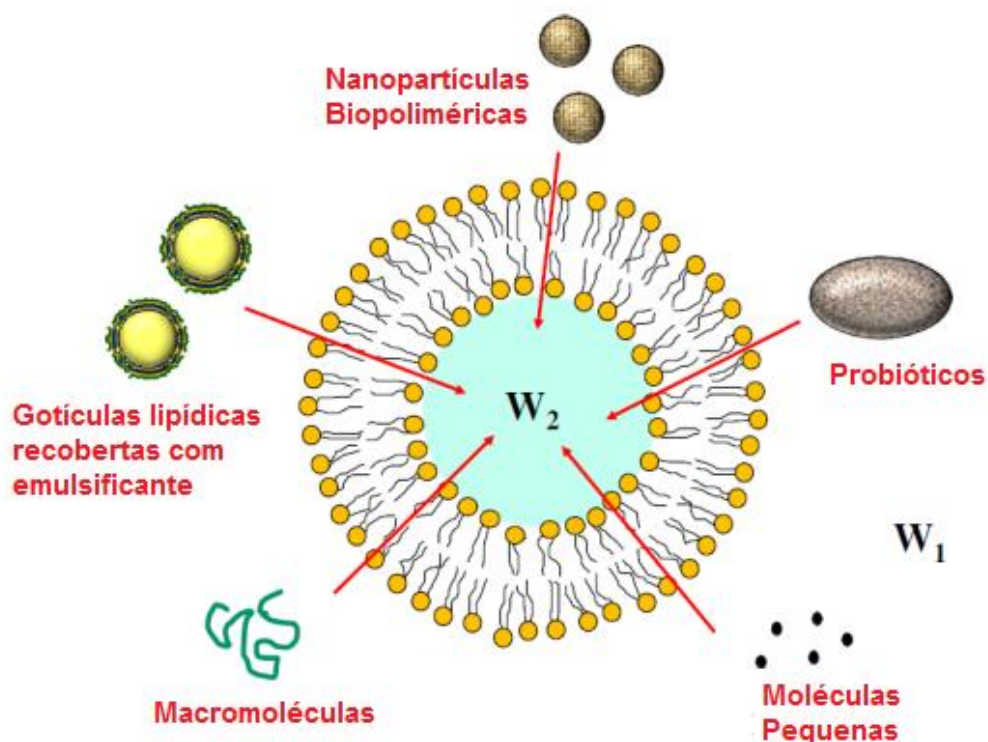


Figura 6. Vários tipos de compostos bioativos hidrofílicos que podem ser incorporados no interior hidrofílico (W_2) de lipossomas. Fonte; McClements (2014).

Encapsulação e liberação controlada de bacteriocinas e outros agentes bioativos estão entre as principais aplicações dentro do campo emergente da nanobiotecnologia, já que a encapsulação de substâncias antimicrobianas em lipossomas pode oferecer uma solução para proteger os compostos antimicrobianos, aumentar a sua eficácia e estabilidade na aplicação em alimentos (Laridi et al., 2003; Taylor et al., 2008; Teixeira et al., 2008; Were et al., 2003).

2.5. Doenças transmitidas por alimentos (DTA).

O consumo de alimentos contaminados pode causar doenças graves. Nos EUA estima-se que organismos patogênicos conhecidos causam 9,4 milhões de infecções por ano, incluindo os vírus (59%), bactérias (39%) e parasitas (3%) (Scallan et al., 2011). Assim, controlar agentes patogênicos em produtos alimentícios é de grande importância para a saúde pública.

De acordo com o CDC (Center for Diseases Control and Prevention), nos EUA, no ano de 2014, foram reportados 19.542 casos, 4.445 hospitalizações e 71 óbitos por casos confirmados de doenças transmitidas por alimentos, incluindo infecções bacterianas e por parasitas; sendo a *Salmonella* sp o agente de maior incidência (15,45 casos por cada 100.000 habitantes), *Campylobacter* em segundo lugar com uma incidência de 13,45 casos por cada 100.000 habitantes. É importante ressaltar que *Listeria* foi o agente patogênico com maior porcentagem de hospitalizações (92%), das quais 18 foram a óbito, o que representa 15,3 % destas, sendo assim um grande percentual de mortes por hospitalização, quando comparado com *Salmonella* (0,4%) e *Campylobacter* (0,2%).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, entre o ano 2000 até outubro de 2015 houveram 10.666 surtos notificados, com 209.204 hospitalizações, 2.107.229 pessoas expostas e 155 óbitos. Destes casos, 14,4% foram causados por *Salmonella* sp, 7,7% por *S. aureus* e 6,5% por *E. coli*; no entanto, em 58,5% dos surtos, não houve identificação do agente etiológico causador de DTA.

2.6. *Listeria monocytogenes*.

As bactérias do gênero *Listeria* são Gram-positivas, não formadoras de esporos e anaeróbias facultativas. O gênero é composto por dezessete espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L.booriae*, and *L. newyorkensis* (Weller et al., 2015)

L. monocytogenes é um bastonete Gram-positivo pequeno com extremidades arredondadas e não produz esporos ou cápsulas. É móvel quando cultivada entre 20 e 25 °C, porém é imóvel ou apresenta fraca motilidade a 37 °C. (Rocourt; Buchrieser, 2007). O solo e vegetais em decomposição são os principais reservatórios da *L. monocytogenes*, que tem sido isolada de hortaliças, água doce, esgoto e do material fecal de várias espécies de mamíferos, aves e peixes, em geral portadores assintomáticos, que liberam a bactéria nas fezes (Ryser; Donnelly, 2001). Isso explica o fato dessa bactéria ser facilmente encontrada em alimentos de origem animal ou vegetal, “*in natura*” ou processados. Devido à sua distribuição ubíqua no meio ambiente, juntamente com a capacidade para tolerar uma variedade de condições adversas, tais como dessecação, baixas temperatura, pH baixo e alta

osmolaridade, *L. monocytogenes* é um contaminante frequente no ambiente de processamento e embalagem de alimentos (Chaturongakul et al., 2008; Donnelly, 2001), reconhecido também como um patógeno oportunista, de origem alimentar de humanos e animais. A listeriose humana é uma doença zoonótica relativamente rara, porém grave, que pode ser fatal para populações vulneráveis, especialmente mulheres grávidas, idosos e indivíduos imunocomprometidos, considerados como grupos de alto risco para listeriose (Norton & Braden, 2007). A alta prevalência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, produtos lácteos não pasteurizados, salsichas, e saladas, bem como a alta taxa de mortalidade associadas à sua infecção, tornaram a listeriose um problema de saúde pública (Farber e Peterkin, 1991, Jamali, Chai, & Thong, 2013, Rahimi, Ameri, & Momtaz, 2010, Allerberger & Wagner, 2010), e também, os membros dos grupos de risco são os principais consumidores destes produtos. *L. monocytogenes* contém 13 sorotipos (1/2-A, 1/2-B, 1 / 2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4AB, 4c, 4d, 4e, e 7). A maioria (95%) das cepas de *L. monocytogenes* associadas à listeriose humana em amostras de alimentos, pertence ao serotipo 1 / 2a, 1 / 2b e 4b (Kathariou, 2002). Sorotipo 1/2a tem sido frequentemente detectado em diferentes matrizes alimentares (Martins et al., 2011).

Segundo o CDC, entre 2014 e 2015, ocorreram seis grandes surtos de listeriose nos Estados Unidos, cinco deles envolvendo produtos lácteos. Já no Brasil, a listeriose humana é subdiagnosticada e subnotificada (Silva et al., 2007), não havendo registros de casos transmitidos por alimentos, embora *L. monocytogenes* esteja comprovadamente presente em diversos produtos, sobretudo em derivados lácteos e presunto (Carvalho et al., 2007; Brito et al., 2008; Martins et al., 2011). É provável que a maioria dos casos esporádicos dessa doença em humanos tenha o

alimento como veículo de transmissão da *L. monocytogenes* (Hofer et al., 2006) o que reforça a necessidade de identificar as fontes de infecção e os possíveis alimentos envolvidos assim como mecanismos de detecção e controle deste microrganismo.

Por ser uma bactéria psicrófila, *L. monocytogenes* é capaz de multiplicar-se sob temperatura de refrigeração, o que torna um desafio o seu controle na cadeia de produção de alimentos. A perda da cadeia de frio na estocagem de alimentos, na indústria, no comércio e nas residências, o consumo de alimentos minimamente processados ou refrigerados, representam nichos que favorecem o desenvolvimento de *L. monocytogenes* (Kozak et al., 1996). Este agente patogênico geralmente mostra susceptibilidade a uma variedade de agentes antimicrobianos e à pasteurização, embora, algumas cepas de *L. monocytogenes* multi-resistentes já foram isoladas a partir de alimentos e casos de listeriose (Marian et al, 2012; Safdar & Armstrong, 2003).

O uso de conservantes químicos, tratamento térmico e/ou de refrigeração têm sido as principais tecnologias utilizadas pela indústria de alimentos para obter alimentos microbiologicamente seguros, mesmo assim os produtos naturais como óleos essenciais, contêm compostos com uma forte atividade antimicrobiana e podem ser uma nova alternativa junto com as bacteriocinas como a nisina (Lambert et al., 2001; Malheiros et al., 2010). Neste contexto, uma grande ênfase tem sido colocada na investigação de fontes naturais de agentes antimicrobianos que potencialmente poderiam substituir conservantes químicos e ingredientes antimicrobianos sintéticos, como um meio para combater a *L. monocytogenes* em diferentes categorias de alimentos. Vários compostos derivados de frutas, especiarias, sementes oleaginosas e vegetais têm sido estudados para provar

efeitos bactericidas ou bacteriostáticos sobre *L. monocytogenes* e outros agentes patogênicos de origem alimentar. No entanto, as propriedades antilisteriais de compostos antimicrobianos naturais, utilizados na carne, produtos avícolas e alimentos prontos para o consumo, são susceptíveis de variações de acordo com as características do produto, tais como teor de gordura, teor de proteína, pH, aw e outros ingredientes adicionados (Larson et al., 1996).

3. ARTIGO No.1

Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing garlic extract with antilisterial activity

Este artigo descreve a preparação e caracterização de nanovesículas de fosfatidilcolina contendo extrato aquoso de alho, a fim de avaliar a capacidade de retenção dos compostos voláteis do alho com atividade antimicrobiana, principalmente a alicina. Dentro deste estudo são apresentados dados de eficiência de encapsulação, avaliação morfológica, determinação dos valores de tamanho, polidispersividade e potencial zeta. A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato livre e encapsulado, foi feita através de determinação de inibição da curva de crescimento microbiano de cinco diferentes cepas de *Listeria* spp, incubadas em leite a 37°C.

Artigo a ser submetido para publicação na revista "*Food Chemistry*", na versão em inglês, e formatado de acordo com as normas da mesma.

Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing garlic extract with antilisterial activity

Abstract

In this study, phospholipid vesicles were developed to improve the stability of garlic (*Allium sativum* L) extract. Using film layer method, purified soybean phosphatidylcholine (Phospholipon 90G) was used to prepare the nanovesicles. Liposomes were characterized and compared for their size, polydispersity index, zeta potential, entrapment efficiency and morphology. The antimicrobial activity of free and encapsulated garlic extract was evaluated against different strains of *Listeria* spp. in milk at 37°C for 24 h. It was found that liposomes exhibited nanometric and spherical shaped vesicles with mean particle size of 174.6 ± 17.3 nm and polydispersity index 0.26 ± 0.02 . The experimental entrapment efficiency was 47.46 ± 7.27 and the nanoliposomes gave a zeta potential of 16.2 ± 5.5 mV. In addition, they also maintained the antilisterial activity with a decrease of 4 log cycles in viable cell counts at 10 h against four of five strains of *Listeria* spp. tested, for free and encapsulated garlic extract at 5% concentration. The results indicate that the liposomes constitute a suitable system for encapsulation of volatile unstable garlic active compounds and the encapsulation of garlic extract proves to be a promising technology for multiple applications including antimicrobial agent.

Key words: nanoparticle; *Listeria*; garlic extract; allicin

1. Introduction

Currently, garlic (*Allium sativum* L.) is the second biggest crop after onion among allium species grown all over the world. Asia is the main cultivation area, where China is the biggest producer, reaching at least 75% of the total production in the world (Wang et al., 2014). Garlic has been used for centuries as a food flavoring agent, and it is also a medicinal panacea bringing a lot of benefits throughout human history for treating various ailments such as diarrhea, flatulence, edema, arthritis, worm infestation and pulmonary complaints (Busquet, Calsamiglia, Ferret, Carro, & Kamel, 2005; Lu, Ross, Powers, Aston, & Rasco, 2011; Rivlin, 2001). Allicin has been described as the most important bioactive compound in garlic, which had been used to combat several in human, animal and plant diseases (Tucak et al. 2009).

Allicin (diallyl thiosulfinate), the active compound present in freshly crushed garlic, is the most abundant thiosulfinate in garlic (Hirsch et al., 2000). Allicin has been described to possess various biological activities, including antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitic and anticancer activities in addition to the capacity to inhibit platelet aggregation and decrease serum lipid levels (Gonen et al., 2005; Haase et al., 2012; Mirona et al., 2008; Okada, Tanaka, Sato, & Okajima, 2006). Allicin was considered as the main component responsible for the pungent smell and biological activity of garlic (Cho, Rhee, & Pyo, 2006). It is generated by the interaction of the enzyme alliinase with its substrate alliin. Only when the garlic clove is crushed, allicin is formed, since the enzyme and substrate are located in different compartments of the clove (Arzanlou & Bohlooli, 2010).

As a promising food preservative, allicin has received considerable attention due to its natural broad-spectrum antimicrobial activity (Ankri & Mirelman, 1999). However, allicin is sensitive to heat and alkaline conditions and has a special strong odor, which reduces its stability and restricts its application (Li, Xu, & Sun, 2007). Up to now, few technological

approaches have been reported to overcome such limitation (Wang, Shao, Wang, & Lu, 2012).

Liposomes are spherical bilayer vesicles formed by amphipathic phospholipid membranes with aqueous core inside and hydrophobic layer on its surface. As a kind of colloidal carriers, liposomes have been extensively investigated for the typical advantages including biodegradable, biocompatible, and sustained-releasing capability (Kima & Baianua, 1991; Neethirajan & Jayas, 2011). In addition, they can be utilized in the entrapment, delivery, and release of water-soluble, lipid-soluble, and amphiphilic materials (Mozafari, Johnson, Hatziantoniou, & Demetzos, 2008). Liposome-based nanovesicles may represent an interesting way to delivery bioactive components to the foods, since they meet the challenges in developing healthy foods, reducing the risks of target diseases in a population (Sanguansri & Augustin, 2006).

In this paper, we focus on determining the characteristics of liposomes after encapsulating garlic extract (GE), prepared by the film hydration method. Phospholipon 90G® soybean phospholipid was used as encapsulating material. The effects of GE components on morphology and physicochemical properties of liposomes (mean size, polydispersity and zeta-potential) were investigated. Encapsulation efficiencies of allicin were calculated after HPLC analysis. Finally, the effects of liposomal encapsulation on the growth curve of different strains of *Listeria* spp. were investigated.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of garlic extract

Garlic shoots were acquired from a local market in Porto Alegre, Brazil. The sample was prepared according the method of Kim, Choi, & Kang, (2007) with some modifications. The samples of garlic shoot were washed under running water followed by rinsing in distilled

water. For sample preparation, garlic shoots were mixed with distilled water at the ratio of 1:1 (w/v) and processed to obtain a garlic extract (GE) 50% (w/v). Thereafter this product was sonicated in bath-type ultrasound at 40 kHz for 15 min and centrifuged at 10000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was collected and passed through 0.22 µm (Millipore, Billerica, MA, USA) membranes and stored at 4°C until further use.

2.2. Liposome production by film hydration

Liposomes were prepared with Phospholipon 90G®, a purified soybean phosphatidylcholine (PC, ≥ 94%), provided by Lipoid (Germany). Encapsulation of GE liposomes was carried out by the thin-film hydration method (Malheiros, Micheletto, Silveira, & Brandelli, 2010). Summarizing, PC was dissolved in chloroform and the solvent was removed by a rotary evaporator until a thin film was formed on the flask walls. The dried lipid film was dispersed by the addition of 5 ml of GE, then agitated at 55°C and sonicated in bath-type ultrasound (40 kHz, Unique USC 700). In addition, empty liposomes prepared with 10 mM phosphate buffer pH 7.0 were used as control.

2.3. Determination of allicin content and entrapment efficiency

Encapsulation efficiency (EE) of liposomes was determined using freshly prepared samples. Liposomes vesicles were separated from the solution by ultrafiltration (Ultracel YM-10 Membrane, Millipore). Total concentration of allicin in the filtrate was determined using HPLC analysis. The EE for encapsulated GE (allicin) was calculated according to the following equation:

$$EE = \frac{\text{Allicin (used in preparation - in the filtrate)}}{\text{Allicin used in preparation}} \times 100$$

The EE of GE in the liposomes was determined using HPLC method for allicin (Liang et al. 2013). The analysis was performed on XBridge® C18 (150 mm 4.6 mm, 5 mm) column (Waters, Milford, MA, USA). Mobile phase consisted of methanol:water (65:35 v/v) containing formic acid (0.04%, v/v). The detector wavelength was 242 nm, the injection volume was 10 µL with a flow rate of 0.5 mL/min and the column temperature was adjusted to 20°C. Ethylparaben was used as substitute reference standard for allicin (Liang, et al., 2013). Mobile phases were filtered through 0.45 µm nylon filters and degassed by sonication prior to use. HPLC analysis and data acquisition were operated on the Empower® 2 software (Waters, Milford, MA, USA).

2.4. Transmission electron microscopy

The morphology was made for observation by transmission electron microscopy (TEM) where the sample was dropped onto a Formvar-coated 300 mesh copper grids and leaved for 1 min, then stained in 2.5% uranyl acetate for 30 seconds and dried. Prepared sample was visualized by JEM-1200 Transmission Electron Microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) operated at 100 KV.

2.5. Light scattering analysis

The particle size and polydispersity index (PDI) of GE liposomes were measured as described by Teixeira, Santos, Silveira, & Brandelli (2008) by means of dynamic light scattering using a Brookhaven equipment, with default settings (BI-200 M goniometer, BI-9000AT digital correlator) and a He-Ne laser of 35 mV at λ of 632.8 nm as the light source, measurements were carried out at 25°C with a fixed scattering angle of 90°.

2.6. Zeta potential

The zeta (ζ) potential analyses of GE liposomes were carried out after dilution of the formulations in 1 mM phosphate buffer pH 7.0 using a Zetasizer nano-ZS ZEN 3600 equipment (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany).

2.7. Antimicrobial effect of free and encapsulated garlic extract in milk

To simulate the effect of GE liposomes in a food model system, whole milk was used for testing their efficacy against different strains of *Listeria*. The strains tested included *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* 6a, *Listeria* sp. str1, *L. monocytogenes* 4b isolated from bovine carcass, and *Listeria* sp. str2 isolated from cheese. The cultures (9 log CFU/ml) were diluted in saline solution (8.5 g/l NaCl) to reach approximately 6 log CFU/ml, and 100 μ l of this suspension was added to 10 ml of whole milk. Then, controls were inoculated with *Listeria* spp. and 500 μ l of liposome suspensions. The tubes were incubated for 2, 4, 6, 8, 10 and 24 h at 37°C. The quantification of *Listeria* spp. was performed by the drop culture method (Malheiros, Brandelli, Noreña, & Tondo, 2009). The colonies were counted in BHI agar plates after incubation at 37°C for 24 h.

2.8. Data analysis

All experimental treatments were performed in duplicate and repeated at least two times. Averages were calculated for treatments at each time point. Obtained counts were compared using *test-t* of Tukey. Data analyses were performed using the SPSS software (SPSS Inc. Chicago, IL, USA), and differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Liposomes characterization

GE was encapsulated into PC liposomes and samples of the nanovesicles were analyzed by TEM. The structure of liposomes incorporating GE can be observed in Fig. 1C and 1D. These have spherical and amorphous structures, which have been typically observed for PC liposomes (Colas et al. 2007; Malheiros et al. 2011). The control liposomes showed similar morphology to that observed for liposomes encapsulating GE (Fig. 1A and 1B). However, it appears that the GE liposomes showed a tendency to aggregate, since some clusters could be observed by TEM (Fig. 1D).

The properties of the nanovesicles are summarized in Table 1. The liposomes encapsulating GE had an average particle size of 174.6 nm with a PDI of 0.26, showing larger mean diameter and broader size distribution in comparison to control liposomes. The size distribution histograms of GE and control liposomes are shown in Fig. 2. The formulations of control liposomes showed a monomodal size distribution profile and 90% of the nanovesicles ($D_{0.9}$) had diameters smaller than 200 nm. In contrast, the GE liposomes showed a broader monomodal curve as result of variability in the size distribution profile and 70% of the nanovesicles ($D_{0.9}$) had diameters smaller than 200 nm (Fig. 2). The mean diameter measured by dynamic light scattering is the hydrodynamic diameter and an increased tendency to aggregate, as suggested by electron microscopy, may result a non-homogeneous particle size distribution. Furthermore, the polydispersity index was under 0.3 for the two formulations tested (Table 1), indicating a narrow size distribution. As a carrier system, the size of liposomes has significant influence on the efficacy in vivo. Small particle sizes (<200 nm) can ensure to increase vascular permeability, lower level of reticuloendothelial system uptake, and improve utilization ratio of entrapped compound (Wang et al., 2010). Liposome size may influence the delivery of substances, as it has been reported that smaller liposomes (120 nm in diameter) can penetrate the skin easier as compared to larger ones (Verma et al., 2003).

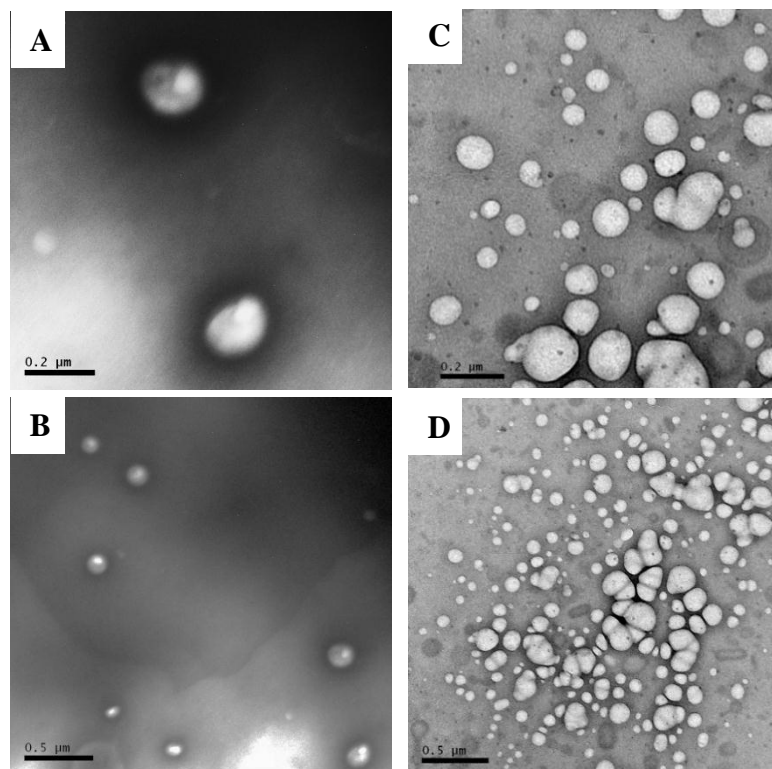


Fig. 1. Transmission electron microscopy images of liposomes encapsulating garlic extract (C,D) and control liposomes (A,B). Bar = 200 nm (A,C) and 500 nm (B,D).

Table 1. Characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing GE.

	Particle size (nm)	PDI	ζ potential (mV)	EE (%)
GE liposomes	174.6 ± 17.3 ^a	0.26 ± 0.02 ^a	-16.2 ± 5.5 ^a	47.5 ± 7.3
Control liposomes	134.5 ± 20.4 ^b	0.21 ± 0.03 ^a	-24.3 ± 11.8 ^a	-

Different superscript letters (a,b) indicate significant differences within the same row ($P < 0.05$). Values are the means ± SEM of three independent experiments.

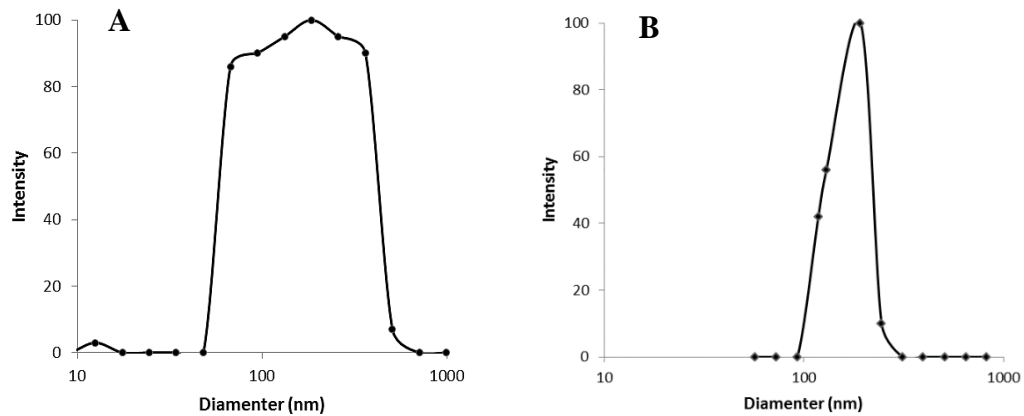


Fig. 2. Histograms of size distribution obtained by laser diffraction of GE liposomes (A), control liposomes (B).

The correlogram is a useful tool to analyze different aspects of nanostructures such as the size and PDI. The time at which the correlation starts to significantly decay is an indication of the mean size of the sample. The steeper the line, the more monodisperse the sample is. Conversely, the more extended the decay becomes, the greater the sample polydispersity (Washington, 1992). The correlogram of GE liposomes (Fig. 3) was typical from a sample containing large particles in which the correlation of the signal takes a long time to decay, as found for polydisperse samples. By contrast, the correlogram of control liposomes indicated large but more monodisperse particles because the correlation of the signal decays more rapidly. This could be explained because the phase addition from the moving particles is constantly evolving and forming new patterns. The rate at which these intensity fluctuations occur will depend on the size of the particles (Pecora and Berne 2000).

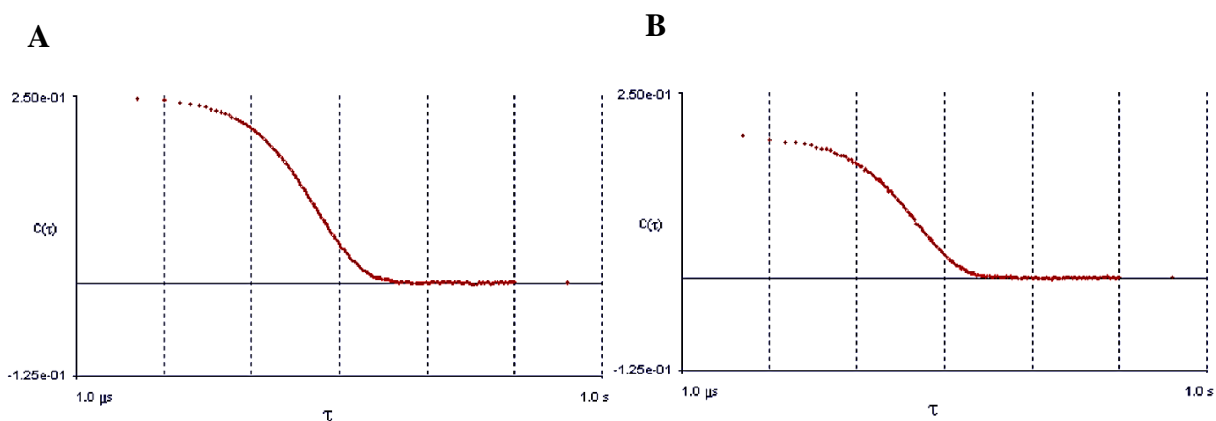


Fig. 3. Graphic representation showing the fluctuation in the intensity of scattered light as a function of time. Correlograms of GE liposomes (A) and control liposomes (B).

The surface charge of liposomes can give rise to electrostatic repulsion among liposome particles, improving the stability of liposome system. The zeta potential of liposome dispersions is one of the main forces that mediate interparticle interactions. The suspension of GE liposomes had a zeta potential value estimated as -16.2 ± 5.5 mV (Table 1). From these results, it can be suggested that the GE liposomes with larger particle size and lower zeta potential are a more unstable dispersion than control liposomes. However, the zeta potential of GE liposomes was higher than that obtained for nisin encapsulated into liposomes produced from purified PC, which were effective against bacterial pathogens (Taylor et al., 2007). As particles with the same charge can repel each other, for liposomes that are small enough and of low density in suspension, a high zeta potential will confer stability because the dispersion will resist aggregation (Sou, 2011).

The encapsulation efficiency (EE) of GE into liposomes was 47.5%. This value could be associated with (a) losses of bioactive compounds during thermal process in the liposome fabrication and (b) the fact that many GE compounds may compete with allicin by the same binding sites in the liposome, and thus more allicin could be displaced. Some studies have been conducted for micro encapsulation of allicin in β -lactoglobulin (Wang et al., 2012),

where the EE was 90,1% . A previous study described that encapsulation of pure allicin by the reverse phase method reached a maximum entrapment efficiency of 75.2% using lecithin-cholesterol at 3.77:1 ratio (Lu et al., 2014). However, this is the first report describing the encapsulation of GE in PC liposomes.

3.2. Inhibitory effect of GE liposomes on the growth of *Listeria* strains

The antimicrobial activity of the liposomes was tested against five different strains of *Listeria* spp. in whole milk as a food model. The behavior of the control growth curves was very similar for all strains tested (Fig. 4). From the results presented in Fig 4, it can be observed that both free and encapsulated GE caused a similar effect, decreasing about 3.5 to 4 log CFU/ml the viable counts of *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Fig. 4E), *L. innocua* 6a (Fig. 4D), *Listeria* sp. Str1 (Fig. 4A) and *Listeria* sp. Str2 (Fig. 4B) at 10 h, as compared to the control. However, free GE and encapsulated GE were not effective to inhibit the growth of *L. monocytogenes* 4b isolated from bovine carcass (Fig. 4C). No significant differences between the antimicrobial activity of free and encapsulated GE were observed.

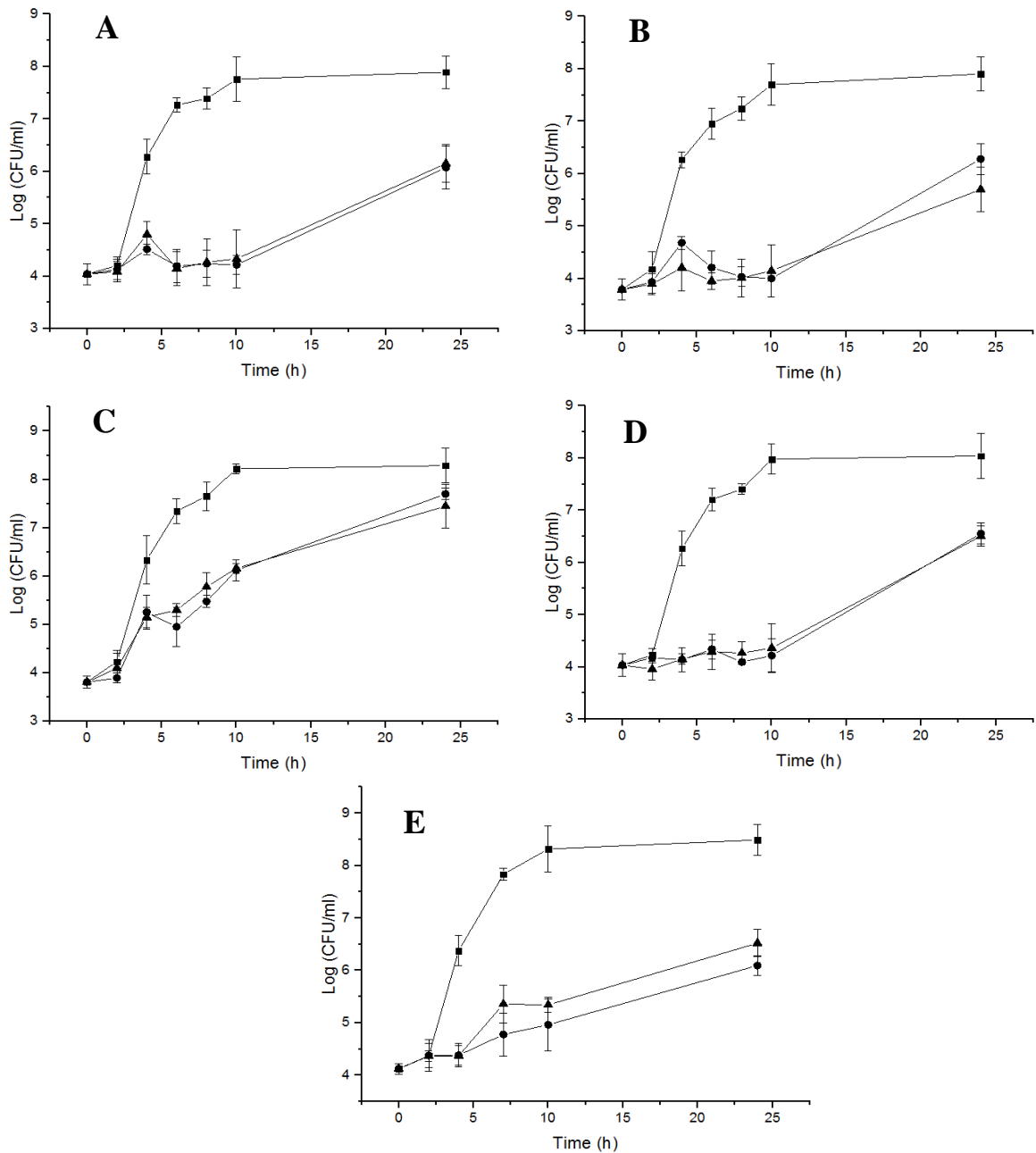


Fig. 4. Growth of *Listeria* spp. strains at 37°C in whole milk, containing free or encapsulated GE. Viable counts were monitored in samples containing GE encapsulated in PC/GE nanovesicles (triangle), free GE (circle) and control with phosphate buffer liposomes (square). The initial population *Listeria* spp. was 4.0 log CFU/mL. Each point represents the mean \pm SEM of three independent experiments.

Kim et al. (2007) observed a similar inhibition of 5% garlic shoot juice against different strains of *L. monocytogenes* tested in BHI broth. Furthermore, 10% garlic shoot juice was necessary to inhibit the growth of *L. monocytogenes* ATCC 19118 by about 4.0 log CFU/ml as compared to control after 14 days in whole, low-fat, and skim milk under refrigeration conditions (Kim et al., 2007). Hsieh et al (2011) observed that 6% garlic shoot juice has a bacteriostatic effect in the growth of a *L. monocytogenes* cocktail in soymilk samples at 4°C, for 12 days and reduced the cell population by about 3 - 5 log CFU/ml at day 14, as compared to the control. Regarding the antibacterial activity of garlic bulb juice, it has already been reported that foodborne bacteria such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* did not grow at the concentration of 0.5 or 1.5%. However, antibacterial effect of garlic bulb juice was not found up to the concentration of 2.5% against *L. monocytogenes* (Chung et al., 2003).

The major components of garlic shoot were found as di- and trisulfides, which are the major derivatives of allicin (Kim and Chung, 1997). Thus, the major inhibitory effect of the GE against *L. monocytogenes* is likely to be expected by allicin. In addition, several recent studies have shown that these organosulfur compounds from garlic have anti-cancer, anti-cardiovascular disease, anti-neurological disease, and anti-liver disease effects, as well as effects for prevention of allergy and arthritis (Amagase et al., 2001 and Amagase, 2006).

Liposome encapsulation technologies may allow for the maintenance of antimicrobial activity by protecting the antimicrobial against cross-reactions with food components (Taylor et al., 2008). The negative effect of fat on antimicrobial activity of the bacteriocin nisin, caused by the peptide adsorption onto fat globules has been extensively reported (Bhatti, Veeramachaneni, & Shelef, 2004; Chollet, Sebti, Martial-Gros, & Degraeve, 2008; Jung et al., 1992). In contrast, it was observed in this work that the milk fat content and the encapsulation in nanovesicles did not restrain the antimicrobial activity of GE. Despite the inhibition of

Listeria in milk by garlic extracts has been reported (Kim et al. 2008), the antilisterial effect of liposome encapsulated GE was not yet described, indicating its potential as a novel biopreservative for food use.

4. Conclusions

The promising findings of the present study further corroborate our approach whereby the antimicrobial effectiveness of aqueous garlic extract can be obtained by incorporation into liposomes. More detailed studies and optimization to elucidate the mechanism of action of GE, incorporation of molecules to improve the surface activity of the GE-loaded liposomes to enable active antilisterial targeting and further improvements to increase the stability of the formulation are needed to enable the development of an effective nature-derived antimicrobial formulation, that can provide an alternative to the currently available antimicrobial compounds. Therefore, the results above showed that garlic extract-loaded liposomes have strong inhibitory effect against *Listeria* spp. The results indicate that liposome encapsulation of GE prove to be a promising technology for multiple applications including the antilisterial activity in food preservation.

Acknowledgments

This research was supported by CNPq, Brazil.

References

- Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr*, 136(3 Suppl.), 716S–725S.
- Amagase, H., Petesch, B.L., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr*, 131(3s), 955S-962S.

- Ankri, S., & Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 16, 356–362.
- Arzanlou, M., & Bohlooli, S. (2010). Introducing of green garlic plant as a new source of allicin. *Food Chemistry*, 120(1), 179 - 183.
- Baghalian, K., Ziai, S., Naghavi, M., Badi, H., Khalichi, A. (2005). Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. *Sci Horti*, 103(2),155–166.
- Bhatti, M., Veeramachaneni, A., Shelef, L.A. (2004). Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 215–219.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Carro, M. D., & Kamel, C. (2005). Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 88(12), 4393 - 4404.
- Cho, S. J., Rhee, D. K., & Pyo, S. (2006). Allicin, a major component of garlic, inhibits apoptosis of macrophage in a depleted nutritional state. *Nutrition*, 22, 11 - 12.
- Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., Degraeve, P. (2008). 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* ,19, 982–989.
- Chung, K. S., Kim, J. Y., & Kim, Y. (2003). Comparison of antibacterial activities of garlic juice and heat-treated garlic juice. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 35(3), 540–543.
- Colas, J., Shi, W., Rao, V., Omri, A., Mozafari, M., Singh, H. (2007). Microscopical Investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38,841–847
- Deo, N., Somasundaran, P. (2003). Disintegration of liposomes by surfactants: mechanism of protein and cholesterol effects. *Langmuir* 19, 2007–2012.

- Gonen, A., Harats, D., Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., et al. (2005). The antiatherogenic effect of allicin: possible mode of action. *Pathobiology*, 72(6), 325 - 334.
- Jung, D., Bodyfelt, F.W., Daeschel, M.A., (1992). Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J. Dairy Sci.* 75, 387–393.
- Kim, J.E., Choi, N.H., & Kang, S.C. (2007). Anti-listerial properties of garlic shoot juice at growth and morphology of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 1198-1203.
- Kim, E.L., Choi, N.H., Bajpai, V.K., & Kang, S.C. (2008). Synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Chemistry*, 110, 375-382.
- Kim, M. Y. and S. K. Chung. (1997). “Analysis of Nutritional and Volatile Flavor Compounds of Garlic Shoot,” *Korean J. Postharvest Sci. Technol. Agric. Products*, 4, 61.
- Kima, H. H. Y., & Baianua, I. C. (1991). Novel liposome microencapsulation techniques for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 2, 55 - 61.
- Haase, H., Hieke, N., Plum, L. M., Gruhlke, M. C. H., Slusarenko, A. J., & Rink, L. (2012). Impact of allicin on macrophage activity. *Food Chemistry*, 134(1), 141-148.
- Hirsch, K., Danilenko, M., Giat, J., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M., et al. (2000). Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation. *Nutrition and Cancer*, 38(2), 245 - 254.
- Hsieh, Y., Yan, M., Liu, J., & Hwang, J. (2011). The synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria* spp. in soymilk. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 576-579.
- Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuillemand, J. C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13(4), 325 - 336.

- Li, Y., Xu, S. Y., & Sun, D. W. (2007). Preparation of garlic powder with high allicin content by using combined microwave-vacuum and vacuum drying as well as microencapsulation. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 76 - 83.
- Liang, Y., Zhang, J.J., Zhang, Q.B., Wang, Z.X., Yin, Z.N., Li, X.X., Chen, J., Ye, L.M. (2013). Release test of alliin/alliinase double-layer tablet by HPLC-allicin determination. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3, 187-192.
- Lu, Q., Lu, P.M., Piao, J.H., Xu, X.L., Chen, J., Zhu, L., & Jiang, J.G. (2014). Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. *LWT Food Science and Technology*, 57, 686-695.
- Lu, X. N., Ross, C. F., Powers, J. R., Aston, D. E., & Rasco, B. A. (2011). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of garlic (*Allium sativum*) and elephant garlic (*Allium ampeloprasum*) by attenuated total reflectance-fourier transformed infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5215-5221.
- Malheiros, P.S., Brandelli, A., Noreña, C.P.Z., & Tondo, E.C. (2009). Acid and thermal resistance of a *Salmonella enteritidis* strain involved in several foodborne outbreaks. *Journal of Food Safety*, 29, 302-317.
- Malheiros, P.S., Micheletto, Y.M.S., Silveira, N.P., & Brandelli, A. (2010). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43, 1198-1203.
- Malheiros, P.S., Sant'Anna, V., Micheletto, Y.M.S., Silveira, N.P., Brandelli, A., (2011). Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoparticle Research* 13, 3545–3552.

- Mirona, T., Wilcheka, M., Sharpb, A., Nakagawa, Y., Naoi, M., Nozawa, Y., et al. (2008). Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HL60 and U937 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(8), 524 - 535.
- Mozafari, M.R. Johnson, C. Hatziantoniou, S. Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *J. Liposome Res.* 18, 309–327.
- Neethirajan, S., & Jayas, D. S. (2011). Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. *Food and Bioprocess Technology*, 4(1), 39 - 47.
- Okada, Y., Tanaka, K., Sato, E., & Okajima, H. (2006). Kinetic and mechanistic studies of allicin as an antioxidant. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4(22), 4113 - 4117.
- Papahadjopoulos, D., Cowden, M., & Kimelberg, H. (1973). Role of cholesterol in membranes. Effects on phospholipideprotein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) e Biomembranes*, 330(1), 8 - 26.
- Pecora, R., Berne, B.J. (2000). Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics. Dover Publications, New York.
- Rivlin, R. S. (2001). Historical perspective on the use of garlic. *Journal of Nutrition*, 31(3), 951S - 954S.
- Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development – A food industry perspective. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 547–556.
- Sou, K. (2011). Electrostatics of carboxylated anionic vesicles for improving entrapment capacity. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(3), 211 - 215.
- Taylor, T.M., Gaysinsky, S., Davidson, P.M., Bruce, B.D., Weiss, J., (2007). Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by z-potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. *Food Biophys.* 2, 1–9.

- Taylor, T.M., Bruce, B.D., Weiss, J., Davidson, P.M., (2008). *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition in vitro by liposome-encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid. *J. Food Saf.* 28, 183–197.
- Teixeira, M.L., Santos, J., Silveira, N.P., & Brandelli, A. (2008). Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 49-53.
- Tucak, M. Cupic, T. Popovic, S. Stjepanovic, M. Gantner, R. Meglic, V. (2009) Agronomic evaluation and utilization of red clover (*Trifolium pratense* L.) Germplasm. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37, 206 – 210.
- Verma, D.D., Verma, S., Blume, G., & Frahr, A. (2003). Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 258, 141-151.
- Washington, C. (1992) Particle Size Analysis In Pharmaceutics And Other Industries: Theory And Practice, Ellis Horwood, England.
- Wang, H. Li, X. Shen, D. Oiu, Y. Song, J (2014) Diversity evaluation of morphological traits and allicin content in garlic (*Allium sativum* L.) from China. *Euphytica*. 198:243–254.
- Wang, H. J., Zhao, P. Q., Liang, X. F., Gong, X. Q., Song, T., Niu, R. F., et al. (2010). Folate-PEG coated cationic modified chitosanecholesterol liposomes for tumortargeted drug delivery. *Biomaterials*, 31(14), 4129 - 4138.
- Wang, Y. F., Shao, J. J., Wang, Z. L., & Lu, Z. X. (2012). Study of allicin microcapsules in beta-cyclodextrin and porous starch mixture. *Food Research International*, 49(2), 641-647.
- Were LM, Bruce BD, Davidson PM, Weiss J. (2003) Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipids nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *J Agric Food Chem* 51:8073–8079.

Wanga, Y. F., Shaob, J. J., Wangc, Z. L., Lu, Z. X. (2012). Study of allicin microcapsules in β -cyclodextrin and porous starch mixture. *Food Research International*, 49(2) , 641-647.

4. ARTIGO No. 2

Antimicrobial activity of nanovesicles co-encapsulating nisin and garlic extract against gram-positive and gram-negative bacteria in milk

Este artigo descreve a preparação e a caracterização de nanovesículas de fosfatidilcolina contendo extrato de alho em combinação com nisina, como potencial agente antibacteriano contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. Dentro deste estudo são apresentados dados de eficiência de encapsulação de nisina e alicina, avaliação morfológica, determinação dos valores de tamanho, polidispersividade e potencial zeta. A avaliação da atividade antimicrobiana da mistura livre e da mistura encapsulada, foi realizada pela determinação de inibição de quatro microrganismos indicadores, em leite integral a 37°C.

Artigo submetido para publicação na revista "*Innovative Food Science and Emerging Technologies* " na versão em inglês, e formatado de acordo com as normas da mesma.

Antimicrobial activity of nanovesicles co-encapsulating nisin and garlic extract against gram-positive and gram-negative bacteria in milk

Abstract

Nisin and garlic extract (GE) were co-encapsulated into phosphatidylcholine nanovesicles. The mean diameter and zeta potential of the nanoparticles were 179 nm and -27.7 mV, respectively, with an entrapment efficiency of about 82% and 90% for nisin and GE, respectively. The efficiency of free and encapsulated nisin-GE to control the development of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Enteritidis SE86, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 1901 were assessed over time in whole milk at 37°C. At such abuse temperature conditions, free nisin-GE and liposomal nisin-GE showed higher antimicrobial activity against all strains tested, when compared with free nisin and GE separately. A decrease of 5-6 log cycles in viable counts of gram-positive strains and 3-4 log cycles for gram-negative bacteria, was observed for treatments with free and encapsulated nisin-GE when compared to the control. Liposome encapsulation of natural antimicrobials with synergistic effect may be important to overcome stability issues and undesirable interaction with food components. The results of this study indicate that nanovesicle-encapsulated nisin-GE has potential as an antimicrobial formulation for food use.

Industrial relevance

The use of natural antimicrobials agrees with the increasing claim for foods without chemical preservatives. Co-encapsulation of antimicrobials may extend the inhibitory spectrum and effectiveness in controlling food pathogens. The use of nanovesicles for delivery of natural antimicrobials in dairy products represent an interesting alternative for controlled release of biopreservatives and improvement of food quality safety and shelf life.

Key words: antimicrobial; bacteriocin; garlic extract; foodborne pathogen; nanoparticle

1. Introduction

The consumption of contaminated food can cause serious illness. Literature have reported that food contaminated with pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* represents a serious public health risk. In the United States it has been estimated that 76 million people, annually, are victims of food diseases. Known pathogenic organisms cause 9.4 million infections per year and the leading causes of death include foodborne bacteria like *Salmonella* spp. (28%) and *L. monocytogenes* (19%) (Scallan et al., 2011).

L. monocytogenes is a foodborne pathogen of concern to the dairy industry due to its capability to grow under refrigeration temperature (Gandhi, & Chikindas, 2007). This bacterium also grows at higher rates due to temperature abuses, which may be encountered during warehouse storage, transportation, retail display, consumer transportation and consumer storage at home. Salmonellosis is an important food-borne illness usually associated with the consumption of foods of animal origin. In many countries, the majority of the recorded food-borne outbreaks is attributed to salmonellosis (Rabsch et al., 2001). In addition, food is a main source of *E. coli* infections, which are estimated to account for over 2,000 hospitalizations in the United States each year (Scallan et al., 2011). *E. coli* live naturally in animal intestines and shiga toxin-producing strains are responsible for most food-related *E. coli* infections. *S. aureus* is mostly accountable for food poisoning, since it can multiply rapidly in food held at room temperature, producing a toxin that is very resistant to heat, refrigeration or freezing (Doyle, 2013). Thus, the control of these bacteria that cause decay and toxicity in food products is important to public health. Although different chemicals can inhibit foodborne pathogens in foods, the increasing demand of the consumers for more natural and safe foods directs to the use of natural antimicrobials.

Garlic (*Allium sativum*) is a widely distributed plant used in all parts of the world not only as a spice but also as a popular medicine for several diseases. A wide range of microorganisms including bacteria, fungi, protozoa and viruses have shown to be sensitive to garlic extracts (Goncagul, & Ayaz, 2010; Wallock-Richards, et al., 2014). Allicin is considered as the main responsible for the biological activities of garlic and is almost exclusively responsible for the antimicrobial activity of freshly crushed garlic (Borlinghaus, Albrecht, Gruhlke, Nwachukwu, & Slusarenko, 2014). Only when the garlic clove is crushed, allicin is formed from alliin by the action of the enzyme alliinase, since the enzyme and substrate are located in different compartments of the clove (Arzanlou, & Bohlooli, 2010). Therefore, the inhibitory effect of garlic extracts against *L. monocytogenes* is likely to be expected by allicin.

Nisin is a well-known bacteriocin active against a broad spectrum of Gram-positive foodborne pathogens, but its use as a food biopreservative is limited by the lack of effect against Gram-negative bacteria. Moreover, the development of nisin resistance by some pathogens has been described (Zhou, Fang, Tian, & Lu, 2014). Some studies indicate that reduction of bacteriocin resistance in target strains and extended spectrum of activity to Gram-negative bacteria may be achieved by combination with other antimicrobials or other preservation strategies (Branen, & Davidson, 2004; Sobrino-López, & Martín-Belloso, 2008). Some reports describe the synergistic antimicrobial effect of nisin and other agents, such as lysozyme (Chung, & Hancock, 2000), thymol (Ettayebi, Yamani, & Rossi-Hassani, 2000), carbon dioxide (Nilsson, Chen, Chikindas, Huss, Gram, & Montville, 2000), ethanol (Phongphakdee, & Nitisinprasert, 2015) and garlic extract (Kim, Choi, Bajpai, & Kang, 2008).

Bacteriocins or bacteriocin-like substances can lose their antimicrobial activity in food products for a variety of reasons. Interference and cross-reactions of the antimicrobial with

food constituents, such as protein and fat, are difficult to overcome and often require large amounts of antimicrobial in order to gain significant reductions in the pathogen load in a product (Sobrino-López, & Martín-Belloso, 2008). Liposomes are under investigation as micro and nanocarrier systems for the protection and delivery of bioactive agents and may represent an interesting alternative to meet the challenges in developing healthy foods, which are aimed to reduce the risks of target diseases in a population (Brandelli, & Taylor, 2015). In food industry, liposomes can be useful to encapsulate nutraceuticals, flavors, colorings, and antimicrobials (Keller, 2001; Taylor, Davidson, Bruce, & Weiss, 2005).

The aim of the present study was to assess the effect of liposome-encapsulated nisin in combination with garlic extract (GE) against different gram-positive and gram-negative foodborne pathogens in milk, as a nanostructure with potential use as biopreservative in the food industry.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and media

Listeria monocytogenes ATCC 7644, *Salmonella* Enteritidis SE86, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 1901 were used as the indicator organism for antimicrobial activity assays. The strain was maintained on BHI agar plates at 4°C, and subcultured periodically. Before each experiment, strains were grown in BHI medium at 37°C for 24 h in a rotary shaker (125 rpm).

2.2. Preparation of garlic extract (GE) and nisin

Garlic shoots were purchased from a local market in Porto Alegre, Brazil. The samples were prepared by the method of Kim, Choi, & Kang (2007), with some modifications. The collected samples of garlic shoot were washed in running water followed by rinsing in

distilled water. For sample preparation, the garlic shoot samples were mixed with distilled water at the ratio of 1:1 (w/w) and processed to obtain a garlic extract (GE). The product was sonicated for 15 min and centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The supernatant of GE was collected, passed through a 0.22 µm membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) and stored at 4°C until further analysis.

Commercial nisin (Nisaplin®) was purchased from Danisco (Vargem Grande, Brazil). Nisin solution was prepared with 0.01 M HCl to obtain a 12.5 mg/ml stock solution, filter sterilized through 0.22 µm membranes, and further diluted in 10 mM phosphate buffer pH 7.0 to reach working concentrations. Nisin is expressed as levels of pure nisin (µg/ml or µg/g). To convert these units to International Units (IU/ml or IU/g) or to equivalent Nisaplin® levels (mg/l, mg/kg), the levels of pure nisin should be multiplied by 40 (Thomas, Clarkson, & Delves-Broughton, 2000).

2.3. Antimicrobial activity assay

Antimicrobial activity was determined essentially as described elsewhere (Motta, & Brandelli, 2002). Nisin was diluted to reach (16, 8, 4 µg/ml) and tested alone and combined with GE (1:1 ratio). An aliquot of 10 µl each sample dilution was applied onto BHI agar plates inoculated with a swab submerged in every strain culture (approximately 7 log CFU/ml). Activity was defined as the reciprocal of the dilution after the last serial dilution giving a zone of inhibition and was expressed as activity unit per milliliter (AU/ml).

2.4. Liposome production by film hydration

Encapsulation of nisin and GE in phosphatidylcholine liposomes was carried out by the thin-film hydration method (Malheiros, Micheletto, Silveira, & Brandelli, 2010a). Briefly, 0.076 g of phosphatidylcholine was dissolved with 15 ml of chloroform in a round-bottom flask and

the organic solvent was removed by a rotary evaporator to 40°C until a thin film was formed on the flask walls. Flasks were stored for 24 h in a desiccator to remove traces of organic solvent. The resulting dried lipid film was dispersed by the addition of 5.0 ml nisin-GE mixture (2.5 ml GE plus 2.5 ml nisin at 8 µg/ml). Then, the system was mixed exceeding the phase transition temperature of lipids (55°C) before sonication at 40 kHz. Liposomes with 10 mM phosphate buffer pH 7.0 were prepared as control.

2.5. Characterization of liposomes

The size of nanovesicles was determined by dynamic light scattering as described elsewhere (Teixeira, Santos, Silveira, & Brandelli, 2008). The zeta (ζ) potential analyses of liposomes were carried out after dilution of the formulations in 1 mM phosphate buffer pH 7.0 using a Zetasizer nano-ZS ZEN 3600 equipment (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany). The liposomes morphology was observed by transmission electron microscopy (TEM). Samples were dropped onto a Formvar-coated 300 mesh copper grids and was leaved for 1 min, then stained in 25 g/l uranyl acetate for 30 seconds and dried. Prepared samples were visualized using a transmission electron microscope (JEM-1200, Jeol Ltd., Tokyo, Japan).

2.6. Entrapment efficiency

Encapsulation efficiency (EE) of liposomes was determined using freshly prepared samples. Liposome vesicles were separated from the solution by ultrafiltration (Ultracel YM-10 membrane, Millipore). Total concentrations of nisin and allicin (GE) in the filtrate were determined using HPLC analysis. The EE for nisin and GE (allicin) was calculated according to the following equation:

$$\%EE = \frac{\text{Nisin or Allicin (used in preparation - in filtrate)}}{\text{Nisin or Allicin used in preparation}} \times 100$$

The amount of GE was determined using a HPLC method for allicin (Liang et al., 2013). Analysis was performed using a XBridge® (150 x 4.6 mm, 5 µm) column (Waters, Milford, MA, USA). A 10 µL sample was injected onto the HPLC by an auto sampler at 20°C. The column was eluted with an isocratic mobile phase consisted of methanol:water (65:35 v/v) containing formic acid (0.04%, v/v) with a flow rate of 0.5 ml/min. The column temperature was adjusted to 20°C and the detector wavelength was set at 242 nm. Ethylparaben was used as substitute reference standard for allicin (Liang, et al., 2013).

The amount of nisin was determined by HPLC (Kopermsub, Mayen, & Warin, 2011). The sample was filtered through 0.22 µm nylon membrane before injection, and 100 µl of filtered sample were loaded onto the XBridge® C18 column. The column was eluted using a gradient program of mobile phases A (0.1% v/v TFA in water) and B (0.1% v/v TFA acid in acetonitrile) as follows: 100% A for 5 min, a linear gradient 0-50% B over 45 min, a linear gradient to 100% B over 5 min and 100% B for 7 min, at 1 ml/min flow rate. The column temperature was set at 35°C and the UV detector was operated at 215 nm. The amount of nisin was calculated by means of a calibration curve of nisin standard (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Mobile phases were filtered through 0.45 µm nylon filters and degassed by sonication prior to use. HPLC analysis and data acquisition were operated on the Empower® 2 software (Waters, Milford, MA, USA).

2.7. Inhibitory effect of free and encapsulated nisin-GE in milk

Bacterial cultures (9 log CFU/ml) were diluted in saline solution (8.5 g/l NaCl) to approximately 6 log CFU/ml, and 100 µl of this suspension was added to 10 ml of whole milk. Then, 500 µl of nanovesicles-encapsulated GE-nisin, 500 µl of free GE-nisin, 250 µl of free nisin or 250 µl of GE were added to different tubes. In the case of free nisin and GE the

volume was adjusted to 500 µl with phosphate buffer. Controls were inoculated with *L. monocytogenes* and 500 µl of phosphate buffer liposomes. Tubes were incubated for 2, 4, 6, 8, 10 and 24 h at 37°C. The quantification of *L. monocytogenes* was performed by the drop culture method (Malheiros, Brandelli, Noreña, & Tondo, 2009).

2.8. Data analysis

Each experiment was performed in duplicate and repeated at least twice, and averages were calculated for treatments at each time point. Values were compared using Tukey's *t* test. Data analyses were performed with the SPSS software (SPSS Inc. Chicago, IL, USA), and differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Activity of nisin and GE against gram-positive and gram-negative bacteria

In this study, the content of allicin in the GE was 1.04 mg/ml, corresponding to 2.08 mg/g garlic sprout (w.b.). The allicin content is difficult to compare among different garlic samples, since several authors agree that the allicin amount is extensively variable according to genetic variation (Mirzaei, Liaghati, & Damghani, 2007; González, Soto-Vargas, Sance, Camargo, & Galmarini, 2009; Wang, Li, Shen, Oiu, & Song, 2014).

The antimicrobial effect of three different concentrations of nisin with GE (1:1 ratio) was tested. For *L. monocytogenes* and *S. aureus*, nisin alone at 16 µg/ml resulted an antimicrobial activity of 800 AU/ml in the serial two-fold dilution assay, whereas in the case of 8 µg/ml and 4 µg/ml the activity decrease to 400 and 100 AU/ml, respectively. For *E. coli* and *S. Enteritidis*, nisin alone at 16 µg/ml resulted an antimicrobial activity of 200 AU/ml, while no activity was observed at 8 µg/ml and 4 µg/ml. Under the conditions of the analysis, GE had no antimicrobial activity against the strains tested. The combination of either 16

$\mu\text{g/ml}$ or 8 $\mu\text{g/ml}$ nisin with GE showed the highest antimicrobial activity (1600 AU/ml) against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Enteritidis* and *E.coli*. The effect of free nisin and garlic extract against *L. monocytogenes* was previously studied, but the actual mechanism of synergy between nisin and garlic is not clearly understood (Kim, et al., 2008, Rohani, Moradi, Mehdizadeh, Saei-Dehkordi, & Griffiths, 2011; Hsieh, Yan, Liu, & Hwang, 2011). GE might improve the action of nisin by increasing the number of pores created by nisin in cell membranes or by increasing the size of the pores formed; both will lead to a larger reduction of viable cells. However, the antimicrobial effect of the combination nisin-GE against *S. Enteritidis*, *S. aureus* and *E.coli* was not yet reported. This result is important because *Salmonella* spp. like other gram-negative bacteria are naturally resistant to the action of bacteriocins, such as nisin, because their outer membrane acts as a barrier that prevents the passage of bacteriocin molecules to their target site, acting as a mechanism of innate resistance (Alakomi et al., 2000; Kaur et al., 2011). The synergistic effect of the nisin with essential oils has been demonstrated and it has been noted that the activity of the essential oil constituents such as carvacrol and thymol is enhanced by the presence of nisin (Pol, & Smid, 1999; Ettayebi, et al., 2000).

3.2. Nisin and GE encapsulation

The results of particle size (nm), PDI, ζ -potential and EE are presented in Table 1. Nanovesicles co-encapsulating nisin and GE were obtained with mean diameter of 179.2 nm, PDI 0.15 and ζ -potential of -27.7 mV. The ζ potential is an indicator for accessible surface charges and values below -30 mV and above +30 mV are conventionally considered high ζ -potentials. Characterization of phosphatidylcholine liposomes containing nisin revealed values of -55.8 and -54.5 mV for unfiltered and filtered liposomes, respectively (Malheiros, et al., 2010a). Liposomes with high ζ -potential can be expected to be more stable because the

repulsive interactions increase, reducing the frequency of liposome collisions. Liposomes encapsulating allicin were prepared with a lecithin:cholesterol ratio of 3.77:1 (Lu, et al., 2014). Those liposomes showed a ζ -potential of -40.1 mV and EE of 75.2% (Table 1), suggesting that such nanostructures have stable properties and can protect allicin from unfavorable conditions, such as light, heat and alkaline conditions.

Table 1

Entrapment efficiency (EE) and physical characteristics of liposomes encapsulating nisin, allicin, and nisin-GE.

Liposome	EE (%)	Size (nm)	PDI	ζ potential (mV)	Reference
Control	-	149.0 \pm 16.7	0.255 \pm 0.05	-20.1 \pm 9.7	This work
Nisin/GE	82.3 \pm 6.3/ 90.2 \pm 4.9	179.2 \pm 11.9	0.15 \pm 0.08	-27.7 \pm 1.6	This work
Nisin	94.1	137.7 \pm 6.1	0.346 \pm 0.06	-55.8 \pm 3.1	Malheiros et al. (2010b)
Allicin	75.2	145.3 \pm 15.2	0.204 \pm 0.011	-40.1 \pm 0.96	Lu et al. (2014)

The nisin-GE liposomes developed in this work presented a higher size compared with liposomes encapsulating nisin or allicin alone (Malheiros, et al., 2010a, Lu, et al., 2014). This could be associated with the presence of proteins and carbohydrates in the GE, since the liposome size depends on the lipid composition and the encapsulated compound, and the presence of cholesterol generally increases the size of liposomes containing nisin (Were, Bruce, Davidson, & Weiss, 2003). Liposome size may influence the delivery of substances, as it has been reported that smaller liposomes (120 nm in diameter) can penetrate the skin easier as compared to larger ones (Verma, Verma, Blume, & Frahr, 2003). Therefore, it is acknowledged that both size and surface properties are key factors influencing the usefulness of liposomes as delivery systems. Moreover, the nisin-GE liposomes showed high EE (90.2%

and 82.3% for GE and nisin, respectively), which is an important factor to improve the antimicrobial activity.

Morphological evaluation of nisin-GE liposomes was carried out by TEM. Fig. 1 depicts the TEM micrograph of nisin-GE liposomes and control liposomes. The negatively stained liposomes appeared as gray and white spheres in contrast to the black background. The TEM image revealed that nisin-GE liposomes were dispersed as individual with a higher size around 150-200 nm in comparison with empty liposomes (100-150 nm).

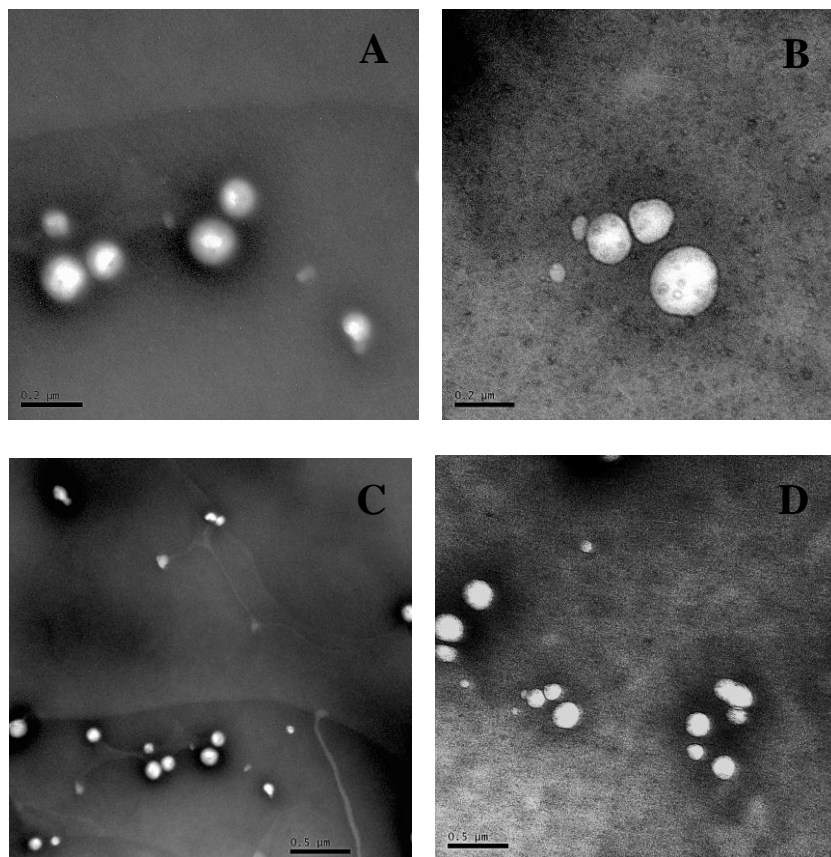


Fig 1. Structural morphology of liposomes by transmission electron microscopy. (A, C) Control liposomes with phosphate buffer and (B, D) nisin-GE loaded liposomes. (A,B) bar = 200 nm; (C,D) bar = 500 nm.

3.3. Inhibition of foodborne pathogens in milk

The antimicrobial activities of free nisin and GE and its encapsulated combination were evaluated in whole milk for 24 h at 37°C (Fig. 2). The combination of GE with nisin had a strong synergistic antimicrobial effect decreasing the bacterial counts for up to 5 log CFU/ml for *L. monocytogenes*, 4 log CFU/ml for *S. aureus*, and 3-4 log CFU/ml for *S. Enteritidis* and *E. coli* at 10 h incubation. No significant difference between the antimicrobial activity of free and encapsulated nisin-GE was observed. Free nisin was not effective to inhibit the growth of these bacteria and the GE showed bacteriostatic effect against *S. aureus*, *S. Enteritidis* e *E. coli* (Fig. 2).

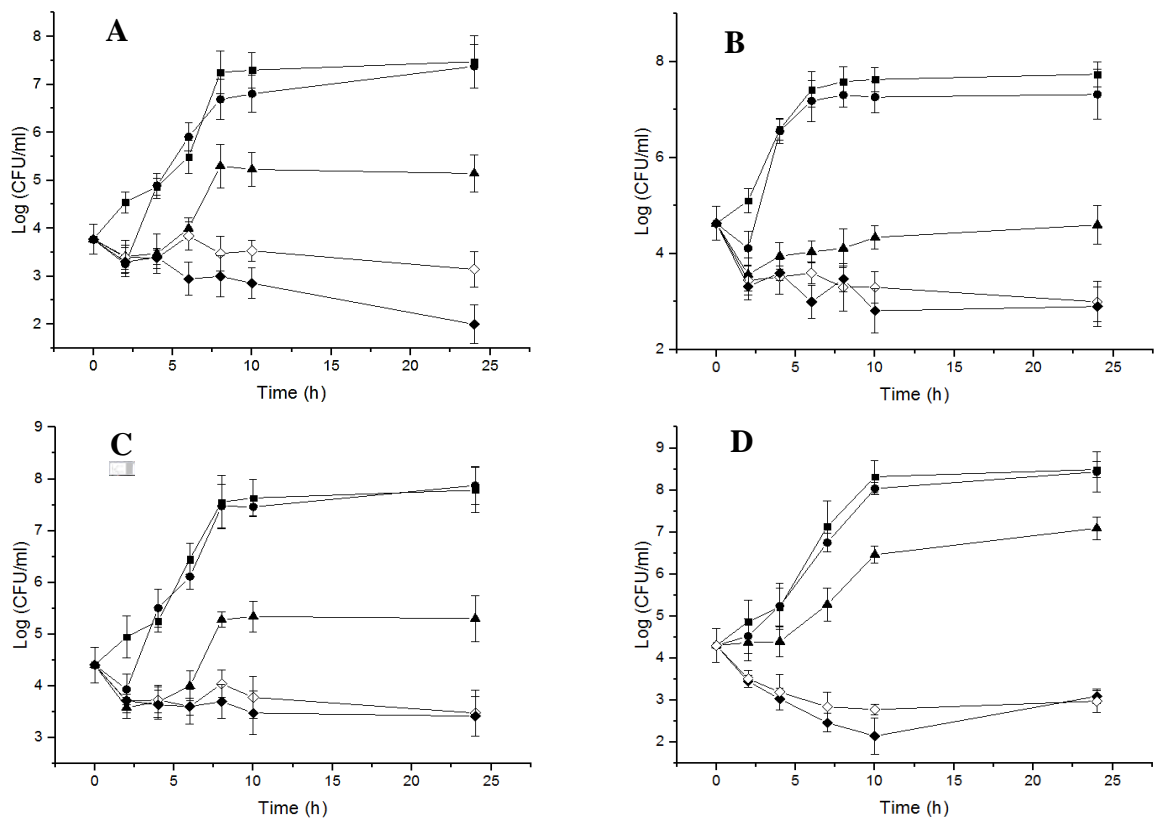


Fig 2. Growth of *S. aureus* 1901 (A), *E. coli* 8739 (B), *S. Enteritidis* SE86 (C) and *L. monocytogenes* ATCC 7644 (D) in milk at 37°C containing free or encapsulated nisin-GE. Viable counts were monitored of free nisin-GE (♦), phosphatidylcholine encapsulated nisin-

GE (◇), free nisin (●) free GE (▲). Control (■). Each point represents the mean ± s.e.m. of three independent experiments.

From these results, it can be deduced that nisin-GE liposome suspension was an effective delivery system for nisin and GE. In the case of nisin encapsulation, strong nisin-phosphatidylcholine interactions might reduce the rate of nisin release to a level inferior to that required for the control of *L. monocytogenes* growth. Alternatively, the highly negative ζ -potential of nisin-loaded liposomes may influence nisin interaction with bacteria. As the bacterial cell has a negative surface charge, the electrostatic repulsion between strongly negatively charged liposomes and the cell surface may prevent direct contact between liposomes and pathogens, and the subsequent release of antimicrobials (Were, Bruce, Davidson, & Weiss, 2004).

A previous study showed that only elevated concentrations (0.5 mg/ml) of both free and encapsulated nisin effectively reduced *L. monocytogenes* counts in whole milk under refrigeration at 7°C (Malheiros, Daroit, Silveira, & Brandelli, 2010b). In agreement, total inhibition of *Listeria* spp. in soy milk (1.8% fat) was achieved by 6% garlic shoot juice in combination with 225 IU/ml nisin at 4°C for 14 days (Hsieh, et al., 2011). Our results showed that the combination of nisin and GE present antimicrobial activity against *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *E. coli* and *S. aureus*, and this activity was maintained after encapsulation into nanovesicles, using whole milk as a food model. The result observed for free nisin was somewhat expected, since the negative effect of fat on nisin antimicrobial activity is extensively reported, caused by the adsorption of nisin onto fat globules (Bhatti, Veeramachaneni, & Shelef, 2004; Sobrino-López, & Martín-Belloso, 2008). On contrast, the milk fat had not a significant effect on the antibacterial activity of free and encapsulated antimicrobial peptide P34 (Malheiros, Sant'Anna, Utpott, & Brandelli, 2012).

Some studies describe the combined antibacterial effect of nisin and plant extracts, including garlic (Rohani, et al., 2011; Hsieh, et al., 2011), but the effect of encapsulated nisin-GE against *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *E. coli* and *S aureus* in milk has not been reported. Actually, the FAO/WHO Codex Committee on milk and milk products accepted nisin as a food additive for processed cheese at a concentration of 12.5 mg pure nisin/kg of product (Ross, Morgan, & Hill, 2002). The final concentration of nisin applied to milk in this work corresponded to 0.2 mg/kg. A bactericidal action caused by higher concentrations could impair the comparison between free and encapsulated GE along the time, but this low concentration also expands the possibilities of increasing concentrations of nisin and get full inhibition of *L. monocytogenes*, *S aureus* and improve their activity against gram-negative bacteria in dairy products. Despite it is away from the objectives of this study, liposome encapsulation can offer protection to the antioxidant activity of GE and weaken its undesirable odor.

4. Conclusion

The liposomes developed in this work showed high entrapment efficiency for nisin and GE, and presented antimicrobial activity against *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *E. coli* and *S. aureus* in milk during incubation at 37°C. In general, free and encapsulated nisin-GE appeared to be effective to control Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk, suggesting its potential use as biopreservative in food products. Therefore, the use of natural antimicrobials in combination with nanotechnology was useful to control important pathogens in the dairy industry. This research addresses the viability of the use of natural antimicrobials and nanoencapsulation to improve the quality and safety of food. Liposome encapsulation technologies may allow the maintenance of antimicrobial activity by protecting the antimicrobial against cross-reactions with food components.

Acknowledgments

This research was supported by CNPq and CAPES, Brazil.

References

- Alakomi, H.L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2001–2005.
- Arzanlou, M., & Bohlooli, S. (2010). Introducing of green garlic plant as a new source of allicin. *Food Chemistry*, 120, 179-183.
- Bhatti, M., Veeramachaneni, A., & Shelef, L.A. (2004). Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 215-219.
- Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M.C.H., Nwachukwu, I.D., & Slusarenko, A.J. (2014). Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules*, 19, 12591-12618.
- Brandelli, A., & Taylor, T.M. (2015). Nanostructured and nanoencapsulated natural antimicrobials for use in food products. In T.M. Taylor (Ed.), *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (pp. 229-257). Oxford: Elsevier.
- Branen, J.K., & Davidson, P.M. (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 63-74.
- Chung, W., & Hancock, R.E.W. (2000). Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 25-32.
- Doyle, M.P. (2013). Bacterial contamination. In: B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of human nutrition* (3rd ed.), Academic Press, Waltham, MA, pp. 322-330.

- Ettayebi, K., Yamani, J.E., & Rossi-Hassani, B. (2000). Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 183, 191-195.
- Gandhi, M., & Chikindas, M.L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1-15.
- Goncagul, G., & Ayaz, E. (2010). Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*) and traditional medicine. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9, 1-4.
- González, R.E., Soto-Vargas, N.C., Sance, M.A.M., Camargo, A.B., & Galmarini, C.R. (2009). Variability of solids, organosulfur compounds, pungency and health-enhancing traits in garlic (*Allium sativum* L.) cultivars belonging to different ecophysiological groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10282-10288.
- Hsieh, Y., Yan, M., Liu, J., & Hwang, J. (2011). The synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria* spp. in soymilk. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 576-579.
- Kaur, G., Malik, R.K., Mishra, S.K., Singh, T.P., Bhardwaj, A., Singroha, G., et al. (2011). Nisin and class IIa bacteriocin resistance among *Listeria* and other foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 17, 197-205.
- Keller, B.C. (2001). Liposomes in nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 25-31.
- Kim, J.E., Choi, N.H., & Kang, S.C. (2007). Anti-listerial properties of garlic shoot juice at growth and morphology of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 1198-1203.
- Kim, E.L., Choi, N.H., Bajpai, V.K., & Kang, S.C. (2008). Synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Chemistry*, 110, 375-382.

- Kopermsub, P., Mayen, V., & Warin, C. (2011). Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. *Food Research International*, 44, 605-612.
- Liang, Y., Zhang, J.J., Zhang, Q.B., Wang, Z.X., Yin, Z.N., Li, X.X., Chen, J., Ye, L.M. (2013). Release test of alliin/alliinase double-layer tablet by HPLC-allicin determination. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3, 187-192.
- Lu, Q., Lu, P.M., Piao, J.H., Xu, X.L., Chen, J., Zhu, L., & Jiang, J.G. (2014). Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. *LWT Food Science and Technology*, 57, 686-695.
- Malheiros, P.S., Brandelli, A., Noreña, C.P.Z., & Tondo, E.C. (2009). Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. *Journal of Food Safety*, 29, 302-317.
- Malheiros, P.S., Micheletto, Y.M.S., Silveira, N.P., & Brandelli, A. (2010a). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43, 1198-1203.
- Malheiros, P.S., Daroit, D.J., Silveira, N.P., & Brandelli, A. (2010b). Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology*, 27, 175-178.
- Malheiros, P.S., Sant'Anna, V., Utpott, M., & Brandelli, A. (2012). Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. *Food Control*, 23, 42-47.
- Mirzaei, R., Liaghati, H., & Damghani, A.M. (2007). Evaluating yield quality and quantity of garlic as affected by different farming systems and garlic clones. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 2219-2224.

- Motta, A.S., & Brandelli, A. (2002). Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 63-70.
- Nilsson, L., Chen, Y., Chikindas, M.L., Huss, H.H., Gram, L., & Montville, T.J. (2000). Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 769-774.
- Phongphakdee, K., & Nitisinprasert, S. (2015). Combination inhibition activity of nisin and ethanol on the growth of Gram-negative bacteria and their application as disinfectant solution. *Journal of Food Science*, 80, M2241-M2246.
- Pol, I.E., & Smid, E.J. (1999). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 166-170.
- Rabsch, W., Tschäpe, H., Andreas, J., Bäuml, A.J., 2001. Review, non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infection* 3, 237–247.
- Rohani, S.M.R., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S., & Griffiths, M.W. (2011). The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *LWT Food Science and Technology*, 44, 2260-2265.
- Ross, R.P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones J.L., & Griffin, P.M. (2001). Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7-15.
- Sobrino-López, A., & Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18, 329-343.
- Taylor, T.M., Davidson, P.M., Bruce, B.D., & Weiss, J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 587-605.

- Teixeira, M.L., Santos, J., Silveira, N.P., & Brandelli, A. (2008). Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 49-53.
- Thomas, L.V., Clarkson, M.R., & Delves-Broughton, J. (2000). Nisin. In A.S. Naidu (Ed.), *Natural Food Antimicrobial Systems* (pp. 463-517). Boca Raton: CRC Press.
- Verma, D.D., Verma, S., Blume, G., & Frahr, A. (2003). Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 258, 141-151.
- Wallock-Richards, D., Doherty, C.J., Doherty, L., Clarke, D.J., Place, M., Govan, J.R.W., & Campopiano, D.J. (2014). Garlic revisited: antimicrobial activity of allicin-containing garlic extracts against *Burkholderia cepacia* complex. *PLoS ONE*, 9, e112726.
- Wang, H., Li, X., Shen, D., Oiu, Y., & Song, J. (2014). Diversity evaluation of morphological traits and allicin content in garlic (*Allium sativum* L.) from China. *Euphytica*, 198, 243-254.
- Were, L.M., Bruce, B.D., Davidson, M., & Weiss, J. (2003). Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipids nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8073-8079.
- Were, L.M., Bruce, B., Davidson, P.M., & Weiss, J. (2004). Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 67, 922-927.
- Zhou, H., Fang, J., Tian, Y., & Lu, X.Y. (2014). Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. *Annals of Microbiology*, 64, 413-420.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível nano encapsular extrato de alho com propriedades antilisteriais iguais ao extrato livre, porém, devido ao tamanho de partícula e seu baixo potencial zeta, os lipossomas de extrato de alho podem apresentar baixa estabilidade fisicoquímica.

A eficiência de encapsulação do extrato de alho foi baixa (47,5%), porém, a atividade antibacteriana não teve diferença estatística, quando comparada com o extrato livre, indicando que o processo de encapsulação não teve nenhum efeito adverso nas propriedades antilisteriais do extrato.

O extrato de alho produzido teve atividade contra *Listeria monocytogenes*, e também foi ativo frente a cepas de *Listeria* spp isoladas de alimentos e contra *Listeria innocua*, em um meio complexo como leite integral.

Os lipossomas constituem um sistema apropriado para a encapsulação de compostos voláteis instáveis como os compostos ativos do extrato de alho.

Mesmo longe dos objetivos deste estudo, encapsulamento em lipossomas pode oferecer proteção para a atividade antioxidante do extrato de alho e enfraquecer seu odor indesejável.

A encapsulação de extrato de alho provou ser uma tecnologia promissora com múltiplas aplicações, incluindo a de agente antilisterial. No entanto, são necessários mais estudos para determinar o mecanismo de ação do extrato de alho, além de aprimorar a estabilidade dos lipossomas a fim de melhorar a eficiência de encapsulação.

Os lipossomas obtidos na segunda parte deste trabalho, apresentaram alta eficiência de encapsulação da nisina e extrato de alho, além de melhor índice de polidispersividade e potencial zeta, quando comparados com os lipossomas que contêm somente extrato de alho, indicando uma melhora na estabilidade dos lipossomas, pela adição de nisina na formulação. Um efeito sinérgico adicional não explorado anteriormente.

A combinação de nisina e extrato de alho nanoencapsulado, manteve seu efeito sinérgico no controle contra *L. monocytogenes* e também foi demonstrado que possui atividade contra *S. aureus* e bactérias Gram-negativas como *S. Enteritidis* e *E. coli* em leite integral durante incubação a 37°C, atividade não relatada anteriormente.

A baixa concentração de nisina empregada amplia as possibilidades de aumento das concentrações desta bacteriocina e assim obter inibição completa de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, além de melhorar sua atividade contra bactérias gram-negativas em produtos lácteos.

É necessário melhorar as características físicoquímicas dos lipossomas a fim de aprimorar a estabilidade e também são necessários testes em outras matrizes alimentares, para avaliar seu potencial como antimicrobiano de alto espectro inibitório e de baixo custo.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho proporcionam informações de interesse para novos estudos sobre o efeito sinérgico da nisina e os compostos do extrato do alho, a exploração de seu potencial antimicrobiano contra outras espécies bacterianas e fúngicas em alimentos, devido ao efeito benéfico da encapsulação, oferecendo múltiplas opções de aplicações em alimentos e embalagens. Mesmo assim são necessários maiores estudos quanto ao mecanismo de atividade e melhoramento da estabilidade físicoquímica dos lipossomas. Algumas das novas abordagens sugeridas são:

- Estudo do mecanismo de atividade da mistura nisina/EA
- Melhoramento da estabilidade físicoquímica dos lipossomas com adição de colesterol ou outros fosfolipídios.
- Incorporação de um *masking* para inibir os odores do alho.
- Testes em alimentos.
- Avaliação da atividade anti-biofilme da mistura nisina/EA

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AASEN, I.M.; MARKUSSEN, S.; MORETRO, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L., & NATERSTAD, K. Interactions of bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. **International Journal of Food Microbiology**, 87, 35-43, 2003.

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. **Listeriosis: a resurgent foodborne infection** **Clinical Microbiology and Infection**, 16 pp. 16–23, 2010.

AMAGASE, H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. **J. Nutr** 136(3 Suppl.), 716S–725S, 2006.

AMAGASE, H.; MILNER, J.A. Impact of various sources of garlic and their constituents on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene binding to mammary cell DNA. **Carcinogenesis** 14(8), 1627–1631, 1993.

AMAGASE, H.; PETESCH, B.L.; MATSUURA, H.; KASUGA, S.; ITAKURA, Y. Intake of garlic and its bioactive components. **J. Nutr** 131(3s), 955S–962S, 2001.

ANAPA, 2014

ANKRI, S.; MIRELMAN, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. **Microbes and Infection**, 1(2), 125e129,1999.

ANONYMOUS, M.O. T. M. U. O. P. **Exeter: European Scientific Cooperative on Phytotherapy**. 1997

ARZANLOU, M.; BOHLOOLI, S. Introducing of green garlic plant as a new source of allicin. **Food Chemistry**, 120(1), 179-183. (2010).

AOUADHI, C.; ROUISSI, Z.; KMIHA, S.; MEJRIB, S.; MAAROUFI, A. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus sporothermodurans* spores to nisin and heat. **Food Microbiology**. Volume 54, Pages 6–10, 2016

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, D. J. **Herbal Medicines**. London: **Pharmaceutical Press**, 279–289, 2007

BELOGLAZOVA, N.; GORYACHEVA, I.Y.; SHMELIN, P.; KURBANGALEEV, V.; DE SAEGER, S. Preparation and characterization of stable phospholipid–silica nanostructures loaded with quantum dots. **Journal of Materials Chemistry B**, 3(2), 180-183, 2015.

BENDAHO, M.; MUSELLI, A.; GRIGNON, D. M. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation. **Food Chemistry**, 106, 132–139, 2008.

BERNELA, M.; KAUR, P.; CHOPRA, M.; THAKUR, R. Synthesis, characterization of nisin loaded alginate–chitosan–pluronic composite nanoparticles and evaluation against microbes. **LWT-Food Science and Technology**, 59(2), 1093-1099, 2014.

BLOEM, E.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Storage life of field-grown garlic bulbs (*Allium sativum* L.) as influenced by nitrogen and sulfur fertilization. **J Agric Food Chem** 59(9), 4442–4447, 2011.

BRANDELLI, A.; TAYLOR, T.M. Nanostructured and nanoencapsulated natural antimicrobials for use in food products, in: Taylor, T.M. (Ed), **Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**. Elsevier, Oxford, pp. 229-257, 2015.

BRASIL. 2015.

BRITO, J.R.; SANTOS, E.M.P.; ARCURI, E.F.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P. SOUZA, G.N.; CERQUEIRA, M.M.P.O. MARCELA SOTO BELTRAN, J.; CALL, J.E.; LIU, Y.; PROTO-FEET, A.C.S.; LUCHANSKY, J.B. Retail survey of brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.15, p.4954-4961, 2008.

CAI, Y.; WANG, R.; PEI, F. Antibacterial activity of allicin alone and in combination with beta-Lactams against *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of Antibiotics**, 60, 335–338, 2007.

CARVALHO, J.D.G.; VIOTTO, W.H.; KUAYNE, A.Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v.18, n.2, p.262-267, 2007.

CASTRO, A, R.; BADIMON, J.; BADIMON, L. A garlic derivative, ajoene, inhibits platelet deposition on severely damaged vessel wall in an in vitro porcine experimental model. **Thromb Res**. 75, p. 243, 1994.

CDC, Preliminary Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2014. **Weekly**. May 15, 2015 / 64(18);495-499

CHAUHAN, N.B. Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576. **J Ethnopharmacol** 108(3), 385–394, 2006.

CHANDRA, K.K.; SINGH, S.V. Diallyl trisulfide inhibits activation of signal transducer and activator of transcription 3 in prostate cancer cells in culture and in vivo. **Cancer Prev Res (Phila)** 3(11), 1473–1483, 2010.

CHATURONGAKUL, S.; RAENGPRADUB, M.; WIEDMANN, K.J. Boor Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. **Trends Microbiology**, 16, pp. 388–396, 2008.

CHAU, C.F.; WU, S.H.; YEN, G.C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, 18(5), 269-280, 2007.

CHEN, H.; HOOVER, D. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2(3), 82-100, 2003.

CHO, S.J.; RHEE, D.K.; PYO, S. Allicin, a major component of garlic, inhibits apoptosis of macrophage in a depleted nutritional state. **Nutrition**, 22, 11-12, 2006.

CURTIS, H.; NOLL, U.; STORMANN, J.; SLUSARENKO, A.J. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 65, 79–89, 2004.

CUSHEN, M.J.; KERRY, M.; MORRIS, M.; ROMERO, C.; CUMMINS, E. Nanotechnologies in the food industry – recent developments, risks and regulation. **Trends in Food Science & Technology**, 24, 30–46, 2012.

DE KWAADSTENIET, M.; TEN DOESCHATE, K.; DICKS, L. Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). **Applied and Environmental Microbiology**, 74(2), 547-549, 2008.

DILLON, V.; BOARD, R. **Natural antimicrobial systems and food preservation: CAB international**. 1994.

DISCHINGER, J.; CHIPALU, S.B.; BIERBAUM, G. Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care. **International Journal of Medical Microbiology**, 304, 51–62, 2014.

DONNELLY, C.W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, 59, 183–194, 2001.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; VINCENSI, M.; FERRARI, G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, 159(4), 342-350, 2012.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. J. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiological Reviews**, 55, 476e511, 1991.

FERREIRA, V.; WIEDMANN, M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ, M.J. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **J. Food Prot.** 77, 150–170, 2014.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, 120, 51-70, 2007.

GARRIDO, V.; VITAS, A.I.; GARCÍA-JALÓN, I. The problem of Listeriosis and ready-to-eat products: prevalence and persistence. In: Menéndez-Vilas, A. (Ed.), **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Formatex, Badajoz, Spain, pp. 1182–1189, 2010.

GONEN, A.; HARATS, D.; RABINKOV, A.; MIRON, T.; MIRELMAN, D.; WILCHEK, M. The antiatherogenic effect of allicin: possible mode of action. **Pathobiology**, 72(6), 325-334, 2005.

GUIGA, W.; SWESI, Y., GALLAND, S.; PEYROL, E.; DEGRAEVE, P.; SEBTI, I. Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 11(2), 352-360, 2010.

HARVEY, M.J. Onion and other cultivated Alliums. In: SMARTT & SIMONDS. 1995. **Evaluation of Crop Plant**. 2nd ed. p. 445-448. London-England.

HAASE, H.; HIEKE, N.; PLUM, L. M.; GRUHLKE, M. C. H.; SLUSARENKO, A. J.; RINK, L. Impact of allicin on macrophage activity. **Food Chemistry**, 134(1), 141-148, 2012.

HARRIS, J. C.; COTTRRELL, S.; PLUMMER, S.; LLOYD, D. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). **Applied Microbiological and Biotechnology**, 57, 282–286, 2001.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, p.32-37, 2006.

HSU, S. T. D.; BREUKINK, E.; TISCHENKO, E.; LUTTERS, M. A. G.; DE KRUIJFF, B.; KAPTEIN, R.; et al. The nisin–lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. **Nature Structural & Molecular Biology**, 11, 963–967. 2004.

HWANG, I. G.; WOO, K. S.; KIM, D. J.; HONG, J. T.; HWANG, B. Y.; LEE, Y. R. Isolation and Identification of an Antioxidant Substance from Heated Garlic (*Allium sativum* L.). **Food Sci Biotech** 16(6), 963–966, 2007.

IBGE, 2015.

IMRAN, M.; KLOUJ, A.; REVOL-JUNELLES, A. M.; DESOBRY, S. Controlled release of nisin from HPMC, sodium caseinate, poly-lactic acid and chitosan for active packaging applications. **Journal of Food Engineering**, 143, 178-185, 2014.

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**, 32, 19-24, 2013.

JUNG, D. S.; BODYFELT, F. W.; DAESCHEL, M. A. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. **Journal of Dairy Science**, 75, 387-393, 1992.

KALAYARASAN, S.; SRIRAM, N.; SUDHANDIRAN G. Diallylsulfide attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis Critical role of iNOS, NF- κ B, TNF- α and IL-1 β . **Life Sci**, 82, pp. 1142–1153, 2008.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, 65, 1811-1829, 2002.

KELLER, B. C. Liposomes in nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, 12(1), 25-31, 2001.

KHAN, I.; KHAN, M.; UMAR, M. N.; OH, D. H. Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. **IET Nanobiotechnology**, 1-5, 2015.

KIMBARIS, A.C.; SIATIS, N. G.; DAFERERA, D. J.; TARANTILIS, P. A.; PAPPAS, C. S.; POLISSIOU, M. G. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction

methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). **Ultrason Sonochem** 13(1), 54–60, 2006.

KOCH, H. P.; LAWSON, L. D. Garlic. **The science and therapeutic application of *Allium sativum* and related species** (2nd ed.) Baltimore, USA: Williams and Wilkins, 329. 1996.

KOZAK, J.; BALMER, R.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: incidence in dairy products. **Food Control**, v.7, n.4/5, p.215-221, 1996.

KHLEBTSOV, N.; KOVLER, L.; ZAGIROVA, S.; KHLEBTSOV, B.; BOGATYREV, V. Spectroturbidimetry of liposome suspensions. **Colloid J**, 63,491–8, 2001.

KHOSRAVI, D. K.; PARDAKHTY, A.; HONARPISHEH, H.; RAO, V. S.; MOZAFARI, M. R. The role of high-resolution imaging in the evaluation of nanovesicles for bioactive encapsulation and targeted nanotherapy. **Micron**, 38, 804-818, 2007.

KIM, C. K.; CHUNG, H. S.; LEE, M. K.; CHOI, L. N.; KIM, M. H. Development of dried liposomes containing beta-galactosidase for the digestion of lactose in milk. **Int J Pharm.** 183, 185–93, 1999.

KIMA, H. H. Y.; BAIANUA, I. C. Novel liposome microencapsulation techniques for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, 2, 55-61,1991.

KUIPERS, O. P.; BIERBAUM, G.; OTTENWÄLDER, B.; DODD, H. M.; HORN, N.; METZGER, J.; VAN DEN BOGAARD, P. **Protein engineering of lantibiotics**. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69(2), 161-170,1996.

Lambert, R. J .W.; Skandamis, P. N.; Coote, P.; Nychas, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, 91, 453–462, 2001.

LAYE, C.; McCLEMENTS. D. J.; WEISS J. Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan. **J Food Sci**, 73, N7–N15, 2008.

LARIDI, R.; KHEADR, E. E.; BENECH, R. O.; VUILLEMARD, J. C.; LACROIX, C.; FLISS, I. Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. **International Dairy Journal**, 13, 325–336, 2003.

Larson, A.E.; Yu, R. R. Lee, O. A.; Price, S.; Haas, G.J.; Johnson, E.A. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food **International Journal of Food Microbiology**, 33, 195–207, 1996.

LEE, S. N.; KIM, N. S.; LEE, D. S. Comparative study of extraction techniques for determination of garlic flavor components by gas chromatography–mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.** 377(4), 749–756, 2003.

LIU, W.; HANSEN, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*, **Appl. Environ. Microbiol.** 56, 2551–2558, 1990.

LI, J.; WANG, X.; ZHANG, T.; WANG, C.; HUANG, Z.; LUO, X.; DENG, Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 10(2), 81-98, 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 312-313, 2002.

LAWSON, L. D.; WANG, Z. J.; HUGHES, B. G. γ -Glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium spp.*: precursors of age-dependent trans-1-propenyl thiosulfinates. **J Nat Prod**, 136–444, 1991.

MARTINS, E. A.; LEAL GERMANO, P. M. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: occurrence, quantification, and serotyping. **Food Control**, 22, 297-302, 2011.

MAHERANI, B.; ARAB-TEHRANY, E.; MOZAFARI, M. R.; GAIANI, C.; LINDERM. Liposomes: a review of manufacturing techniques and targeting strategies. **Curr Nanosci**, 7, 436–52, 2011.

MARIAN, M. N.; SHARIFAH AMINAH, S. M.; ZURAINI, M. I.; SON, R.; MAIMUNAH, M.; LEE, H. Y.; ET AL. MPN-PCR detection and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from raw and ready-to-eat foods in Malaysia. **Food Control**, 28, 309-314, 2012.

McCLEMENTS, D, J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science.** 219, 27–53, 2015.

MALHEIROS, P.; DAROIT, D. J.; DA SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, 27(1), 175-178, 2010.

MALHEIROS, P.; SANT'ANNA, V.; DE SOUZA BARBOSA, M.; BRANDELLI, A.; DE MELO FRANCO, B. D. G. Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like

substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. **International Journal of Food Microbiology**, 156(3), 272-277, 2012.

MELONI, D.; CONSOLATI, S.G.; MAZZA, R.; MUREDDU, A.; FOIS, F.; PIRAS, F.; MAZZETTE, R. Presence and molecular characterization of the major serovars of *Listeria monocytogenes* in ten Sardinian fermented sausage processing plants. **Meat Sci.** 97, 443–450, 2014.

MING, X.; DAESCHEL, M. A. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Protection**, 56, 944–948, 1993.

MIRON, T.; RABINKOV, A.; MIRELMAN, D.; WILCHEK, L.; WEINER, M. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1463, 20–30, 2000.

MIRON, T.; BERCOVICI, T.; RABINKOV, A.; WILCHEK, M.; MIRELMAN, D. [3H] Allicin: preparation and applications. **Analytical Biochemistry.** 331, 364–369, 2004.

MIRONA, T.; WILCHEKA, M.; SHARPB, A.; NAKAGAWA, Y.; NAOI, M.; NOZAWA, Y.; ET AL. Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HL60 and U937 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 19(8), 524-535, 2008.

MORRIS, V. J. Emerging roles of engineered nanomaterials in the food industry. **Trends in Biotechnology**, 29, 509-516, 2011.

MOZAFARI, M. R.; JOHNSON, C.; HATZIANTONIOU, S.; DEMETZOS, C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **J Liposome Res.** 18, 309–27, 2008.

MULDERS, J. W.; BOERRIGTER, I. J.; ROLLEMA, H. S.; SIEZEN, R. J.; VOS, W. M. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **Eur J Biochem.** 201, 581-584, 1991.

NAZNIN, M. T.; AKAGAWA, M.; OKUKAWA, K.; MAEDA, T.; MORITA, N. Characterization of E- and Z-Ajoene obtained from different varieties of garlics. **Food Chem.** 106, 1113–1119, 2008.

NEETHIRAJAN, S.; JAYAS, D. S. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. **Food and Bioprocess Technology**, 4(1), 39-47, 2011.

NENCINI, C.; FRANCHI, G. G.; CAVALLO, F.; MICHELI, L. Protective effect of *Allium neapolitanum* Cyr. versus *Allium sativum* L. on acute ethanol-induced oxidative stress in rat liver. **J Med Food**. 13(2), 329–335, 2010.

NORTON D, M.; BRADEN C, R. Foodborne Listeriosis. Ch 10 In: Ryser ET, Marth EH (eds) **Listeria, listeriosis and food safety**. 3, 305–356. 2007

O'CONNOR, P. M.; O'SHEA, E. F.; GUINANE, C. M.; O'SULLIVAN, O.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Nisin H is a new nisin variant produced by the gut-derived strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484. **Applied and Environmental Microbiology**. 81(12), 3953-3960, 2015.

ORTIZ, S.; LÓPEZ, V.; MARTÍNEZ J.V. Control of *Listeria monocytogenes* contamination in an Iberian pork processing plant and selection of benzalkonium chlorideresistant strains. **Food Microbiol**. 39, 81–88, 2014.

OKADA, Y.; TANAKA, K.; SATO, E.; OKAJIMA, H. Kinetic and mechanistic studies of allicin as an antioxidant. **Organic & Biomolecular Chemistry**. 4(22), 4113-4117, 2006.

PIERRE, S.; CROSBIE, L.; DUTTARROY, A. K. Inhibitory effect of aqueous extracts of some herbs on human platelet aggregation in vitro. **Platelets** 16(8), 469–473, 2005.

POWERS, K. W.; BROWN, S. C.; KRISHNA, V. B.; WASDO, S. C.; MOUDGIL, B. M.; ROBERTS, S. M. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. **Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. Toxicological Sciences**. 90, 296-303, 2006.

QI, R.; LIAO, F.; INOUE, K.; YATOMI, Y.; SATO, K.; OZAKI, Y. Inhibition by diallyl trisulfide, a garlic component, of intracellular Ca(2+) mobilization without affecting inositol-1,4,5-trisphosphate (IP(3)) formation in activated platelets. **Biochem Pharmacol**. 60(10), 1475–1483, 2000.

QI, Z., YU, Y.; VÉLASQUEZ, J. E.; VAN DER DONK, W. A. Evolution of lanthipeptide synthetases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 109(45), 18361-18366, 2012.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**. 62(3), 373-380, 2002.

RAHIMI, E.; AMERI, M.; MOMTAZ, H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. **Food Control**, 21, 1448-1452, 2010.

RAY, B.; CHAUHAN, N.B.; LAHIRI, D. K. The “aged garlic extract:” (AGE) and one of its active ingredients S-allyl-L-cysteine (SAC) as potential preventive and therapeutic agents for Alzheimer's disease (AD). **Curr Med Chem.** 18(22), 3306–3313, 2011.

RIVLIN, R. S. Is garlic alternative medicine?. **J Nutr.** 136(3 Suppl.), 713S–715S, 2006.

ROCOURT, J.; COSSART, O. *Listeria monocytogenes* In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. Ed). **Food Microbiology: fundamentals and frontiers.** Washington: ASM Press, 337-352, 1997.

ROSSI, M.; CUBADDA, F.; DINI, L.; TERRANOVA, M.; AURELI, F.; SORBO, A.; PASSERI, D. Scientific basis of nanotechnology, implications for the food sector and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, 40(2), 127-148, 2014.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K.(Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination on foods.** 4.ed. Washington: American Public Health Association, 343-356. Chap. 36, 2001.

SAFDAR, A.; ARMSTRONG, D. Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955-1997). **Journal of Clinical Microbiology.** 41, 483-485, 2003.

SAMELIS, J.; BEDIE, G., SOFOS, J.; BELK, K., SCANGA, J.; SMITH, G. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **LWT-Food Science and Technology.** 38(1), 21-28, 2005.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P.M. **Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens Emerging Infectious Diseases.** 17, 7–15, 2011.

SHANKAR, S.; CHEN, Q.; GANAPATHY, S.; SINGH, K. P.; SRIVASTAVA, R. K. Diallyl trisulfide increases the effectiveness of TRAIL and inhibits prostate cancer growth in an orthotopic model: molecular mechanisms. **Mol Cancer Ther.** 7(8), 2328–2338, 2008.

SHIMPO, K.; CHIHARA, T.; KANEKO, T.; SHINZATO, M.; BEPPU, H.; HOSHINO, M. Inhibitory effects of heated garlic on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis in the duodenum and jejunum of C57BL/6 mice. **Asian Pac J Cancer Prev.** 3(4), 339–344, 2002.

SHUKLA, K. Nanotechnology and emerging trends in dairy foods: The inside story to food additives and ingredients. **International Journal of Nano Science and Technology**. 1(1), 41-58, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Varela, 536p, 2007.

SINGH, H.; THOMPSON, A.; CORREDIG, M. Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems. In: **Garti N, McClements DJ, editors. Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals**. Oxford, U.K. Woodhead Publishing. 287–318, 2012.

SILVESTRE, C.; DURACCIO, D.; S. CIMMINO. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Progress in Polymer Science**, 36, 1766–1782, 2011.

SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D.; VANNINI, L.; SALVETTI, E.; TORRIANI, S.; GARDINI, F.; LANCIOTTI, R. Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. **Food Microbiology**. 54, 11–19, 2016.

STERLING, S. J.; EAGLING, D. R. Agronomics and allicin yield of Australian grown garlic. **Acta Hortic**. 555, 2001.

STEVENS, K. A.; SHELDON, B. W.; KLAPES, N. A.; KLAENHAMMER, T. R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. **Applied Environmental Microbiology**. 57, 3613–3615, 1991.

TAN, C.; XIA, S. Q.; XUE, J.; XIE, J. H.; FENG, B. A.; ZHANG, X. M. Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. **J Agric Food Chem**. 61, 75–84, 2013.

TAYLOR, T. M.; DAVIDSON, P. M.; BRUCE, B. D.; WEISS J. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Crit Rev Food Sci Nutr**. 45, 587–605, 2005.

TEIXEIRA, M. L.; SANTOS, J.; SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Phospholipidnanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science and Emerging Technologie**. 9, 49–53, 2008.

THOMPSON, A. K.; MOZAFARI, M. R.; SINGH, H. The properties of liposomes produced from milk fat globule membrane material using different techniques. **Lait**, 87(4-5), 349-360, 2007.

TINKLE, S.; MCNEIL, S. E.; MÜHLEBACH, S.; BAWA, R.; BORCHARD, G.; BARENHOLZ, Y.; ET AL. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1313, 35–56, 2014.

TORCHILIN V. P.; WEISSIG, W. **Liposomes: a practical approach. Second ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2003.**

UEDA, Y.; KAWAJIRI, H.; MIYAMURA, N.; MIYAJIMA, R. Content of some sulfur-containing components and free amino acids in various strains of garlic. **J Jpn Soc Food Sci Technol**. 38, 429–434, 1991.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, D. J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**. 71(9), R107-R116, 2006.

WELLER, D; ANDRUS, A; WIEDMANN, M; DEN BAKKER, H. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 65, pp. 286–292, 2015.

WERE, L. M.; BRUCE, B. D.; DAVIDSON, P. M.; WEISS, J. Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipids nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 51, 8073–8079, 2003.

WIRAWAN, R. E.; KLESSE, N. A.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 72(2), 1148-1156, 2006.

WU, P. P.; LIU, K. C.; HUANG, W. W.; CHUEH, F. S.; KO, Y. C.; CHIU, T. H.; ET AL. Diallyl trisulfide (DATS) inhibits mouse colon tumor in mouse CT-26 cells allograft model in vivo. **Phytomedicine** 18(8–9), 672–676, 2011.

WU, Z.; WANG, W.; TANG, M.; SHAO, J.; DAI, C.; ZHANG, W.; CHEN, D. Comparative genomic analysis shows that *Streptococcus suis meningitis* isolate SC070731 contains a unique 105K genomic island. **Gene**. 535(2), 156-164, 2014.

XIA, S. Q.; XU, S. Y.; ZHANG, X. M.; Optimization in the preparation of coenzyme Q(10) nanoliposomes. **J Agric Food Chem**. 54, 58–66, 2006.

YANG, E.; FAN, L.; JIANG, J.; DOUCETTE, C. Fillmore. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. **AMB Express**, 2, 48, 2012.

YEH, Y. Y.; LIU, L. Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. **J Nutr**. 131(3s), 989S–993S, 2001.

YOO, M.; LEE, S.; LEE, S.; SEOG, H.; SHIN, D. Validation of high performance liquid chromatography methods for determination of bioactive sulfur compounds in garlic bulbs. **Food Sci Biotechnol**. 19(6), 1619–1626, 2010.

YUN, H.; BANA, J.; PARK, K.; LEE, C.; JEONG, K.; HAN, S.; HONG, J. Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolate from garlic. **Pharmacology & Therapeutics**. 142, 183–195, 2014.

ZENG, T.; GUO, F. F.; ZHANG, C. L.; ZHAO, S.; DOU, D. D.; GAO, X. C.; ET AL. The anti-fatty liver effects of garlic oil on acute ethanol-exposed mice. **Chem Biol Interact**. 176(2–3), 234–242, 2008.

ZENDO, T.; FUKAO, M.; UEDA, K.; HIGUCHI, T.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 67(7), 1616-1619, 2003.

ZENG, T.; GUO, F. F.; ZHANG, C. L.; SONG, F. Y.; ZHAO, X. L.; XIE, K. Q. Ameta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials for the effects of garlic on serum lipid profiles. **J Sci Food Agric**. 92(9), 1892–1902, 2012.

ZIEGLER, S. J.; STICHER, O. HPLC of S-alk(en)yl-L-cysteine derivatives in garlic including quantitative determination of (+)-S-allyl-L-cysteine sulfoxide (Alliin). **Planta Med**. 55(4), 372–378, 1989.