

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

CAROLINE HECKLER

Avaliação do efeito de antimicrobianos naturais e encapsulação de timol e carvacrol em lipossomas visando inibir *Salmonella* aderida em superfície de vidro

PORTO ALEGRE

2018

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

CAROLINE HECKLER

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS E
ENCAPSULAÇÃO DE TIMOL E CARVACROL EM LIPOSSOMAS VISANDO
INIBIR *SALMONELLA* ADERIDA EM SUPERFÍCIE DE VIDRO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para obtenção do título
de Engenheira de Alimentos

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

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Heckler, Caroline

Avaliação do efeito de antimicrobianos naturais e encapsulação de timol e carvacrol em lipossomas visando inibir Salmonella aderida em superfície de vidro / Caroline Heckler. -- 2018.

79 f.

Orientador: Patrícia da Silva Malheiros.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curso de
Engenharia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. antimicrobianos. 2. sinergismo. 3. lipossomas.
4. vidro. 5. Salmonella. I. Malheiros, Patrícia da
Silva, orient. II. Título.

CAROLINE HECKLER

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS E
ENCAPSULAÇÃO DE TIMOL E CARVACROL EM LIPOSSOMAS VISANDO
INIBIR *SALMONELLA* ADERIDA EM SUPERFÍCIE DE VIDRO**

Aprovada em: ___/ ___/ _____

Comissão Examinadora

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

Adriano Brandelli
Doutor em Ciências Biológicas
ICTA/UFRGS

Claudia Titze Hessel
Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos
ICTA / UFRGS

Aos meus pais, Marlise e Laurino, e ao meu irmão, André, que me apoiaram e que amo tanto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Laurino e Marlise, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Vocês são meus maiores exemplos. Não foi nada fácil chegar até aqui e sem a ajuda, o carinho e a atenção de vocês, nada seria possível. Agradeço também ao meu irmão, André, que mesmo de longe, sempre me mandou energias positivas em todos os momentos. Obrigada por tudo. Amo vocês!

Agradeço a minha orientadora, Prof. Dr^a. Patrícia, por ter me adotado no laboratório em 2014 como IC e ter me mostrado o lindo mundo da microbiologia de alimentos. Obrigada por cada aprendizado, pela paciência em me ensinar e por todos os momentos de convívio. Muito mais do que uma orientadora, hoje, minha amiga que eu levo para a vida.

Agradeço aos professores Adriano Brandelli, Eduardo Cesar Tondo e Plinho Francisco Hertz, pelo empréstimo de seus laboratórios e equipamentos para a realização desta pesquisa. Também agradeço ao técnico Francis Almeida pela paciência em me ajudar com as análises de MEV e a professora Cristiane dos Santos pelo auxílio com as análises de caracterização dos lipossomas. E ainda, gostaria de agradecer ao professor Alessandro Rios e ao professor Voltaire Sant'Anna pela ajuda com as análises estatísticas.

Agradeço a todos meus colegas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS), pelo apoio e companheirismo. Em especial, gostaria de agradecer a Caroline Maders e a Fabiola Cacciatore pelo auxílio nos experimentos e pela grande amizade, me apoiando muito nessa reta final.

Agradeço a todos meus colegas formandos: Alisson, Carolina, Carolinne, Diego, Eliana, Gabriela, Lívia, Martina, Michelle, Raquel e Roberta. Vocês se tornaram muito importantes para mim e estiveram comigo nessa linda etapa que se encerra. Sem o alto astral e o apoio emocional de vocês, tudo ficaria muito mais difícil. Levarei a amizade de vocês comigo sempre.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me proporcionar diversas oportunidades de conhecimento e pelo ensino de qualidade.

E por fim, agradeço a todos, que de alguma forma contribuíram para minha formação, sendo possível chegar ao final do curso com a sensação de satisfação e felicidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos Gerais	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Micro-organismos de importância em alimentos	16
3.1.1 <i>Salmonella</i>	16
3.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.2 Adesão bacteriana e biofilmes	18
3.3 Materiais de contato com alimentos	20
3.3.1 Vidro	20
3.4 Higienização na indústria de alimentos	21
3.5 Antimicrobianos	22
3.5.1 Nisina	23
3.5.2 Timol e carvacrol	24
3.6 Encapsulação	24
3.6.1 Lipossomas	25
4. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Artigo 1	29
4.2 Artigo 2	45
5. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

RESUMO

A formação de biofilmes nas superfícies que entram em contato com alimentos é uma das principais causas de contaminações microbiológicas responsáveis por doenças transmitidas por alimentos (DTA). Para evitá-los, a higienização deve ser eficiente prevenindo a adesão e multiplicação de micro-organismos. Diversos antimicrobianos naturais são conhecidos por demonstrarem capacidade para inibir e controlar a multiplicação de micro-organismos, sendo que o efeito sinérgico entre eles deve ser considerado visando reduzir a concentração de cada composto utilizado. Além disso, a encapsulação pode proteger esses compostos de possíveis interações com o ambiente e pode proporcionar uma liberação controlada, evitando uma contaminação posterior da superfície. Assim, este trabalho apresenta dois objetivos principais: (1) avaliar o efeito sinérgico de antimicrobianos naturais como carvacrol, timol e nisina contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* (2) encapsular timol e carvacrol em lipossomas e avaliar sua ação frente à *Salmonella* aderida em superfície de vidro. Para analisar o efeito sinérgico, foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos compostos antimicrobianos individualmente seguidos de um planejamento fatorial. Os resultados mostraram que a mistura dos antimicrobianos nisina, carvacrol e timol; a interação entre timol e carvacrol bem como a interação entre nisina e carvacrol demonstraram efeito sinérgico frente a *S. aureus*. Do mesmo modo, a interação entre timol e carvacrol foi significativa na redução de *S. Enteritidis* sugerindo efeito sinérgico entre os dois compostos. Posteriormente, timol e carvacrol foram encapsulados, individualmente e em conjunto, em lipossomas pela técnica de hidratação do filme lipídico. Os lipossomas foram caracterizados e a eficiência de encapsulação (EE) determinada. A CIM foi determinada novamente. Então, um *pool* composto por diferentes cepas de *Salmonella* foi aderido em superfície de vidro (2 cm x 2 cm x 1 mm), seguido de sanitização por 1 minuto de contato com os compostos desenvolvidos. Após esse tempo, o número de células sobreviventes foi determinado por contagem em placas. Além disso, foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a adesão de *Salmonella* e a ação das soluções antimicrobianas. Os lipossomas contendo timol, carvacrol ou ambos, apresentaram diâmetro médio variando de 230 a 270 nm; polidispersidade de 0,20 a 0,34; potencial zeta de aproximadamente -30 mV; e eficiência de encapsulação de 99%. Todas as formulações foram estáveis por pelo menos 28 dias. Os resultados mostraram que a adesão dos micro-organismos ao vidro foi de $5,89 \pm 0,36$ log UFC/cm². As soluções antimicrobianas inativaram totalmente a população de micro-organismos aderida ao coupon de vidro nas concentrações de CIM e 2xCIM para os compostos livres. Já, para os compostos em lipossomas, somente inativaram totalmente com o 2xCIM. Nas concentrações de CIM, os compostos em lipossomas tiveram uma redução de 4,03 log UFC/cm² para timol, 3,79 log UFC/cm² para carvacrol e de 3,94 log UFC/cm² para ambos os compostos, demonstrando uma liberação mais lenta. O controle positivo realizado com somente a solução alcoólica 20% (v/v) confirmou que o efeito antimicrobiano é devido ao timol e/ou carvacrol presentes nas soluções. A MEV mostrou a adesão da *Salmonella* ao vidro e a ação do carvacrol livre e encapsulado. Portanto, os antimicrobianos livres e/ou encapsulados em lipossomas desenvolvidos neste trabalho foram capazes de reduzir ou inativar alta concentração de *Salmonella* aderida em vidro, sugerindo potencial para utilização como desinfetante alternativo para indústrias de alimentos e serviços de alimentação.

Palavras-chave: antimicrobianos, sinergismo, lipossomas, vidro, *Salmonella*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: *Brain Heart Infusion*

BPF: Boas Práticas de Fabricação

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CL: Lipossomas contendo carvacrol

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

EE: Eficiência de Encapsulação

FDA: *Food and Drug Administration*

GRAS: *Generally Regarded As Safe*

PDI: Polidispersidade

TCL: Lipossomas contendo timol e carvacrol em conjunto

TL: Lipossomas contendo timol

UFC/cm²: Unidades Formadoras de Colônia por centímetro quadrado

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

XLD: *Xylose Lysine Deoxycholate*

LISTA DE EQUAÇÕES

Artigo 1:

Equação 1: Modelo do planejamento experimental para <i>S. aureus</i>	33
Equação 2: Modelo do planejamento experimental para <i>S. Enteritidis</i>	34
Equação 3: Equação do modelo de regressão para <i>S. aureus</i>	36
Equação 4: Equação do modelo de regressão para <i>S. Enteritidis</i>	38

Artigo 2:

Equação 1: Eficiência de encapsulação	49
Equação 2: Conversão de log UFC/mL para log UFC/cm ²	51

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica:

Figura 1: Estágios de formação de biofilme	19
Figura 2: Formação de lipossomas	26

Artigo 1:

Figura 1: Diagrama de Pareto do efeito combinado de nisina, timol e carvacrol sobre <i>S. aureus</i>	36
Figura 2: Diagrama de Pareto do efeito combinado de timol e carvacrol sobre a <i>S. Enteritidis</i>	39

Artigo 2:

Figura 1: Estabilidade dos lipossomas quanto ao diâmetro médio (nm), polidispersidade e potencial zeta (mV), durante estocagem a 4 °C. Lipossomas de Timol (◇), Carvacrol (□) e Timol e Carvacrol em conjunto (Δ). Valores de média ± desvio padrão de três experimentos independentes	55
Figura 2: Cinética de multiplicação de <i>Salmonella in vitro</i> . Compostos livres e em lipossomas (□) e controle com solução alcóolica 20% (Δ). Valores das médias ± desvio padrão de três repetições independentes	57
Figura 3: Inibição de <i>Salmonella</i> em superfície de vidro utilizando solução alcóolica 20% com timol (CIM = 331 µg/mL), carvacrol (CIM = 331 µg/mL) ou uma mistura de timol e carvacrol em conjunto (CIM = 331 µg/mL) livres após 1 minuto de contato. O controle é população do <i>pool</i> de <i>Salmonella</i> que aderiu à superfície de vidro e a solução alcóolica 20% é a solução pura, sem antimicrobianos	58
Figura 4: Inibição de <i>Salmonella</i> em superfície de vidro utilizando TL (CIM = 663 µg/mL), CL (CIM = 663 µg/mL) e TCL (CIM = 1325 mg/mL) após 1 minuto de contato. O controle é população do <i>pool</i> de <i>Salmonella</i> que aderiu à superfície de vidro e a solução alcóolica 20% é a solução pura, sem antimicrobianos	60

Figura 5: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a 10 kV do controle de adesão do *pool* de *Salmonella* com aumento de 3000X (A) e 7000X (B) sobre a superfície de vidro. Solução antimicrobiana de CL espalhados sobre a superfície de vidro (C) e ação da ação antimicrobiana de CL sobre a *Salmonella* (D) **61**

LISTA DE TABELAS

Artigo 1:

Tabela 1: Estudo do efeito sinérgico de carvacrol, timol e nisina frente a *S. aureus* 35

Tabela 2: Estudo do efeito sinérgico de carvacrol e timol frente a *S. Enteritidis* SE86 38

Artigo 2:

Tabela 1: Caracterização dos lipossomas e eficiência de encapsulação 54

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima de timol, carvacrol e mistura de timol e carvacrol livre e em lipossomas para *pool* de *Salmonella*..... 56

1. INTRODUÇÃO

As indústrias alimentícias e serviços de alimentação tem se preocupado cada vez mais com a adesão de micro-organismos às superfícies e equipamentos. A limpeza e sanitização ineficientes podem resultar em sobrevivência de células e formação de biofilmes, que podem contaminar os alimentos durante o processamento. Os setores de controle de qualidade e segurança dos alimentos, juntamente com órgãos fiscalizadores e instituições de pesquisa têm buscado novas alternativas e tecnologias.

Diversos materiais podem ser utilizados para o desenvolvimento de superfícies que entram em contato com alimentos, sendo os mais comuns o aço inoxidável, o vidro e o polipropileno (CHIA et al., 2009). As características e propriedades dos materiais estão ligadas diretamente a adesão dos micro-organismos. O vidro é um material utilizado em embalagens, placas de corte e utensílios. Tem característica hidrofílica, sendo menos propenso a adesão de micro-organismos e mesmo assim, *Salmonella* tem demonstrado capacidade de formar biofilme em sua superfície (PROUTY e GUNN, 2003). Para evitar essa adesão, a sanitização é fundamental sendo que diversos produtos químicos como, por exemplo, hipoclorito de sódio, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, quaternário de amônio, entre outros têm sido utilizados com essa finalidade. Entretanto, estes compostos podem gerar a formação de subprodutos indesejados, como os trihalometanos, ou ainda, contribuir para a resistência antimicrobiana (XUE et al., 2017; DOYLE, 2006). Além disso, os consumidores estão mais conscientes e preocupados, buscando cada vez mais produtos naturais. Por esse motivo, desinfetantes desenvolvidos a partir de extratos naturais e compostos provenientes de óleos essenciais estão se popularizando, já que são mais seguros e ambientalmente mais amigáveis (BURT, 2004).

Diversos compostos antimicrobianos presentes em óleos essenciais de plantas são conhecidos por demonstrarem capacidade para inibir ou controlar a multiplicação de micro-organismos (D'AMATO et al., 2018). Carvacrol e seu isômero timol são compostos naturais, monoterpenos aromáticos, componentes majoritários dos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) (PEIXOTO-NEVES et al., 2010). São classificadas como substâncias Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2018) e tem demonstrado eficiência contra um amplo espectro de fungos, bactérias e seus biofilmes (BURT, 2004; GUTIERREZ, BARRY-RYAN e BOURKE, 2008; SZCZEPANSKI e LIPSKI, 2014). Outro antimicrobiano aprovado para uso em alimentos considerado GRAS é a nisina. A nisina é uma bacteriocina, ou seja, um

peptídeo que apresenta ação antimicrobiana, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis* que tem seu uso autorizado para aplicação em alimentos em mais de 50 países (DE ARAUZ et al., 2009; COTTER, HILL e ROSS, 2005; DEEGAN et al., 2006; WILLIAMS e DELVES-BROUGHTON, 2003).

A escolha do antimicrobiano a ser utilizado como desinfetante pode ser baseada em fatores como efetividade contra micro-organismos de interesse, resistência microbiana, segurança dos compostos, entre outros. Em todos os casos, é interessante considerar a combinação de diferentes antimicrobianos naturais, já que os mesmos podem apresentar efeito sinérgico (MATHUR et al., 2017).

Os compostos naturais como o timol, carvacrol e nisina, quando utilizados livremente, comumente apresentam problemas por terem baixa estabilidade, interação com o meio ambiente, resíduos de alimentos e de produtos de limpeza, problemas quanto à hidrofobicidade, volatilidade e fortes características organolépticas (LI et al., 2015). Estes problemas podem ser superados encapsulando-se os compostos para que tenham maior estabilidade física, bioatividade aumentada, através de uma liberação controlada e minimizando a influência de características organolépticas (DONSÌ et al., 2011). A encapsulação em lipossomas é amplamente estudada para utilização nas áreas farmacêutica, alimentícia, agricultura e cosmética (ZYLBERBERG e MATOSEVIC, 2016; MOZAFARI et al., 2008; RAHIMPOUR e HAMISHEHKAR, 2012). São estruturas colidais constituídas de bicamadas lipídicas e um núcleo interno aquoso, podendo ser utilizados para a encapsulação de compostos lipofílicos, hidrofílicos e anfifílicos (ELOY et al., 2014). Diversos estudos mostram que compostos antimicrobianos encapsulados em lipossomas são efetivos para inibir bactérias de importância em alimentos (MALHEIROS et al., 2010; MOZAFARI et al., 2008; TAYLOR et al., 2005).

Dentre as principais bactérias responsáveis por surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil, entre os anos de 2000 e 2017, estão *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito sinérgico de antimicrobianos naturais, como timol, carvacrol e nisina, frente à *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*, bem como encapsular timol e carvacrol em lipossomas visando inibir *Salmonella* aderida em superfície de vidro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito sinérgico de antimicrobianos naturais contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*, bem como encapsular timol e carvacrol em lipossomas visando inibir *Salmonella* aderida em superfície de vidro.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos naturais timol, carvacrol e nisina frente à *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis.
- Avaliar o efeito sinérgico de timol, carvacrol e nisina frente a *Staphylococcus aureus* através da elaboração de um planejamento fatorial 2³.
- Avaliar o efeito sinérgico de timol e carvacrol frente a *Salmonella* Enteritidis através da elaboração de um planejamento fatorial 2².
- Encapsular timol e carvacrol em lipossomas, caracterizá-los e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) frente a um *pool* composto por 3 cepas de *Salmonella*.
- Avaliar a ação das soluções com antimicrobianos naturais timol e carvacrol livres e encapsulados em lipossomas frente a um *pool* composto por 3 cepas de *Salmonella* aderidas em superfície de vidro.
- Observar a ação antimicrobiana de carvacrol livre e encapsulado em lipossomas frente à *Salmonella* aderida em vidro, utilizando microscopia eletrônica de varredura.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Micro-organismos de importância em alimentos

O crescimento no número de DTA, causadas principalmente por bactérias, é um problema de saúde pública e tem sido foco de grande preocupação nos últimos anos. A contaminação microbiana dos alimentos pode ocorrer em qualquer etapa de produção, principalmente por problemas no processamento e na manipulação (KUAYE, 2017). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2018), os principais micro-organismos responsáveis por surtos de DTA, entre os anos de 2000 e 2017, foram *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, nessa ordem.

3.1.1 *Salmonella*

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos e não esporulados. Caracterizam-se por serem catalase positiva, oxidase negativa, com temperatura ótima de multiplicação de 37 °C, mas já foi observada multiplicação entre 5 e 45 °C (KUAYE, 2017).

A *Salmonella* é causa comum de doenças infecciosas transmitidas por alimentos, principalmente ovos e frango, e água, para humanos e animais. A maioria das infecções é associada à ingestão de alimentos contaminados, principalmente carne e produtos cárneos. No entanto, pode estar relacionada a uma variedade de frutas e vegetais frescos e minimamente processados, uma vez que esses também podem estar contaminados e causar surtos (SANT'ANA et al., 2011; DENIS et al., 2016).

A salmonelose é a DTA que mais causa surtos no Brasil e no mundo, acarretando um custo significativo para toda sociedade (DUPONT, 2007). Em salmoneloses humanas, a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis são as mais frequentes. Comumente, além de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, os sorotipos de salmonelas mais envolvidos em surtos alimentares são *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Montevideo*, e *S. Saint Paul* (GIERALTOWSKI et al., 2016; ZAIDI et al., 2006; FERNANDES et al., 2006).

O período de incubação desta bactéria é cerca de 12 a 36 horas. Os primeiros sintomas são náusea, vômito e podem evoluir para quadro clínico de diarreia e fortes dores abdominais.

Como esta bactéria invade e danifica a mucosa intestinal, pode haver presença de sangue na diarreia e febre alta. Pode-se considerar a salmonelose uma ameaça à saúde pública, mesmo que ela tenha uma baixa taxa de mortalidade (FORSYTHE, 2013).

Segundo LEVINSON (2016), as salmoneloses, na maioria das vezes, são infecções autolimitantes, ou seja, tem um período de tempo limitado, que tem variação entre um a quatro dias dependendo do organismo. São infecções que precisam ser notificadas às autoridades para que possa haver uma investigação e determinação da fonte da doença.

Salmonella tem a capacidade de aderir a superfícies como teflon, aço, vidro e fórmica, formando biofilmes. A falta de controle e boas práticas de fabricação (BPF) contribuem para a disseminação de bactérias no ambiente de preparo dos alimentos. Por essa razão, o controle desta bactéria deve ser feito em todas as etapas do processamento, a partir da matéria prima, no momento que sai do local de origem, passando pelo processo de industrialização até a chegada do produto ao consumidor final (MALDONADO, 2008).

3.1.2 *Staphylococcus aureus*

Os micro-organismos do gênero estafilococos são anaeróbios facultativos, em formato esféricos de cocos, não esporulados, que se agrupam aos pares, em cadeias curtas ou em aglomerados, que lembram cachos de uvas (HENNEKINNE, 2018). É um micro-organismo Gram positivo, catalase positivo, oxidase negativa, com temperatura ótima de multiplicação de 30 a 37 °C, mas já foi observada multiplicação entre 7 e 48,5 °C (KUAYE, 2017; KADARIYA, SMITH e THAPALIYA, 2014).

É uma bactéria comensal, habitante principalmente do nariz, da pele e da mucosa de alguns animais e humanos, e do meio ambiente, além de ser ainda, um patógeno humano (HENNEKINNE, 2018). Sabe-se que aproximadamente 30% da população humana é colonizada por *S. aureus* (WERTHEIM et al., 2005). Apesar disso, apenas uma pequena minoria de portadores adoece devido à infecção por *S. aureus* (BROWN et al., 2014). Mesmo assim, os portadores nasais de *S. aureus* podem se tornar fontes de contaminação de alimentos durante a manipulação (SANTANA et al., 2010).

Até hoje, mais de 50 espécies do gênero estafilococos já foram identificados e são divididas de acordo com a produção, ou não, de coagulase (KUAYE, 2017). As intoxicações alimentares estafilocócicas são doenças frequentemente transmitidas por alimentos e causadas pela ingestão de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por cepas de estafilococos

enterotoxigênicos. A maioria dos estafilococos enterotoxigênicos são estafilococos coagulases positivos, sendo os *Staphylococcus aureus* os mais importantes (HENNEKINNE, 2018). As toxinas de *S. aureus* conseguem danificar as membranas biológicas, e assim, levam à morte celular (OTTO, 2014). Os sintomas de intoxicações estafilocócicas, devido a ingestão de grandes quantidade de enterotoxinas nos alimentos, aparecem entre 2 e 8 horas, e geralmente são náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia (MURRAY, 2005; KUAYE, 2017), que comumente desaparecem dentro de 24 a 48 horas (MURRAY, 2005).

Como consegue sobreviver em diversos ambientes, o *Staphylococcus aureus* é encontrado em locais de circulação de pessoas e pode ser transmitido por contato interpessoal direto ou indireto, por meio de objetos e equipamentos contaminados, dentre outros (KADARIYA, SMITH e THAPALIYA, 2014). Os surtos de *S. aureus* surgem, muitas vezes, por causa de práticas inadequadas de higiene durante o processamento (ASAO et al., 2003).

3.2 Adesão bacteriana e biofilmes

Em seus habitats naturais, os micro-organismos não vivem como culturas puras ou células individuais, mas em vez disso, acumulam-se em interfaces para formar agregados polimicrobianos, como filmes, tapetes, flocos, lamas ou biofilmes, tornando-se mais resistentes (WINGENDER, NEU e FLEMMING, 1999).

A produção de biofilme é um mecanismo natural pelo qual alguns micro-organismos tendem a se proteger de ambientes desfavoráveis. Depois de aderir a uma superfície, os micro-organismos começam a secretar uma matriz extracelular complexa e ficam embutidos nela (SIMÕES, BENNETT e ROSA, 2009).

Biofilmes microbianos podem ser definidos como comunidades complexas de agregados de micro-organismos, incorporados em matrizes extracelulares de exopolissacarídeos (EPS), que se fixam em superfícies bióticas ou abióticas (COSTERTON e LEWANDOWSKI, 1995). A adesão de micro-organismos é influenciada por diversos fatores, como propriedades físico-químicas da superfície, sistemas de comunicação célula-célula, condições de processamento de alimentos (fluxo de líquidos, concentração de nutrientes), gênero e espécie de micro-organismos, aparatos celulares (pili, flagelos e fímbrias), temperatura, condições de multiplicação e capacidade de produção de matriz extracelular (FLEMMING e WINGENDER, 2010; AGARWAL et al., 2011; KUAYE, 2017).

A formação de biofilmes envolve vários estágios, que estão representados na Figura 1. Na etapa 1, ocorre a fixação de células à superfície, onde os aparatos celulares podem ajudar a

fixar as bactérias. Em seguida, na etapa 2, ocorre a adesão de célula a célula, formando um aglomerado. Na etapa 3, as células são replicadas e forma-se um encapsulado de barreira com uma camada de hidrogel. Nesse estágio, o biofilme amadurece as células replicadas e o EPS acumula-se. No estágio final, na etapa 4, ocorre o descolamento de células e essas células podem formar biofilme em outras localizações (KAMARUZZAMAN et al., 2018).

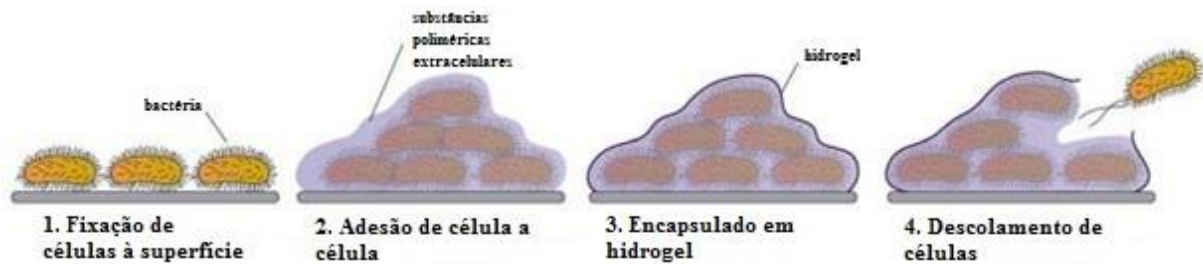


Figura 1: Estágios de formação de biofilme (KAMARUZZAMAN et al., 2018);

Desde o primeiro relato de biofilme (ZOBELL, 1943), a forma como alguns micro-organismos conseguem se aderir a superfícies e formar biofilmes continua a constituir um grande desafio para diferentes indústrias, já que são responsáveis por significantes perdas de eficiência dos processos e danos em equipamentos (KUAYE, 2017).

Nas indústrias de alimentos e serviços de alimentação, devido à diversidade de produtos fabricados, das matérias primas, dos processos e equipamentos, pode ocorrer a formação de biofilmes por diferentes micro-organismos, nas diversas superfícies que entram em contato com os alimentos durante o processamento. Quando ocorre o desprendimento de células dos biofilmes já formados, há o risco de contaminação dos produtos alimentícios. A grande preocupação é com o aumento de resistência e proteção dos micro-organismos em biofilmes frente aos agentes de higienização, uma vez que, as células podem ser de 10 a 1.000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos químicos utilizados normalmente nas indústrias de alimentos (SIMÕES, SIMÕES e VIEIRA, 2010; KAMARUZZAMAN et al., 2018).

Os biofilmes, uma vez formados, tornam-se difíceis de serem removidos, já que a microbiota se torna mais resistente aos processos de higienização (SIMÕES et al., 2006). Por isso, é importante que se previna a formação dos biofilmes em superfícies que entram em contato com alimentos antes da sua formação. A principal medida de prevenção é limpar e desinfetar, adequadamente e eficientemente, as superfícies regularmente antes que as células das bactérias consigam se fixar e aderir às superfícies (SIMÕES et al., 2006; MARQUES, 2007).

3.3 Materiais de contato com alimentos

As superfícies de contato com alimentos são fabricadas utilizando diversos materiais, sendo os mais comuns o aço inoxidável, o vidro e o polipropileno (CHIA et al., 2009). As características e propriedades dos materiais podem estar ligadas diretamente a adesão dos micro-organismos à superfície. A produção de biofilme pode ocorrer em diversos tipos de superfícies, tanto bióticas como abióticas (CHIA et al., 2009).

Os micro-organismos conseguem aderir facilmente quando as superfícies possuem irregularidades e poros, como madeiras e rochas. No entanto, superfícies aparentemente lisas, como o vidro, também possuem imperfeições, que podem ser microscópicas, facilitando a adesão destas bactérias (CHAE et al., 2006).

3.3.1 Vidro

O vidro é um material sólido, inerte, que possui uma estrutura atômica molecular não cristalina, obtida, de modo geral, pelo resfriamento de uma massa fundida de sílica e outros óxidos, em condições controladas que impeçam sua cristalização (ROSA, COSENZA e BARROSO, 2007). Pode ser incolor ou colorido. São identificados os seguintes tipos de vidro: vidro borossilicato, vidro sódio-cálcico e cristal (com teor mínimo de 10% de um ou mais dos seguintes metais: chumbo, bário, potássio, zinco, expressos como óxido) (BRASIL, 1996).

Como o vidro é fisicamente e quimicamente inerte, é superior para o acondicionamento e contato direto em superfícies de alimentos e bebidas, já que não transfere sabores indesejáveis aos produtos. Nos últimos anos, o vidro vem sendo substituído por outros materiais, como é o caso do polietileno tereftalato (PET), do policloreto de vinila (PVC) e do polietileno (PE). Apesar disso, algumas indústrias alimentícias, como é o caso do vinho, do azeite, da cerveja e de alguns produtos em conserva, dificilmente substituem o vidro por causa da exigência de maior qualidade da embalagem (ROSA, COSENZA e BARROSO, 2007).

O vidro é também utilizado em placas de corte, painéis, recipientes, utensílios, embalagens e revestimentos na indústria de alimentos e em serviços de alimentação (ROSA, COSENZA e BARROSO, 2007). Em virtude da crescente preocupação da sociedade com o

ambiente e da futura elevação dos custos da energia, uma das principais vantagens da utilização do vidro como material de contato com alimentos está associada ao aspecto da reciclagem, uma vez que o vidro é retornável, reutilizável e totalmente reciclável (100%), sem perda de volume e das suas propriedades químico-físicas, além de ter capacidade de reciclagem infinita, fato que não acontece com o plástico e o papel (ROSA, COSENZA e BARROSO, 2007).

Como tem característica hidrofílica, é menos propenso a adesão de micro-organismos quando comparado a superfícies hidrofóbicas, como náilon, teflon e polímeros, como o polietileno e polipropileno (SINDE e CARBALLO, 2000). Mesmo assim, alguns micro-organismos, como a *Salmonella*, têm demonstrado capacidade de formar biofilme em sua superfície (PROUTY e GUNN, 2003; BEN ABDALLAH et al., 2014). Chia (2009) verificou que a superfície do vidro é altamente polar, um material liso e doador de elétrons, carregado positivamente e não encontrou nenhuma correlação entre a rugosidade da superfície e a adesão das bactérias.

3.4 Higienização na indústria de alimentos

Os métodos modernos de produção e processamento de alimentos são baseados no uso de métodos de lavagem e saneamento seguros, que visam simultaneamente fornecer e manter a segurança do produto e a qualidade nutricional, sensorial e higiênico-sanitária inalterada desde o momento da produção até o consumo (MEMISI et al., 2015).

O processo técnico de higienização é visto atualmente como fundamental para a qualidade e a segurança dos alimentos. Quando se fala em segurança, também se fala em inocuidade, em ausência de perigos físicos, químicos e biológicos, em níveis que causem dano ao consumidor, o que torna ainda mais importante a adoção de métodos de higienização adequados e eficazes, seguindo a legislação vigente (QUARENTEI et al., 2015).

O processo de higienização consiste em duas etapas: a limpeza, que se destina à remoção das sujidades e a desinfecção ou sanitização, que tem a função de reduzir o número de micro-organismos sobre uma superfície (TONDO e BARTZ, 2017).

A higienização das superfícies deve ser eficiente e capaz de evitar a adesão e multiplicação de micro-organismos. Atualmente são utilizados rotineiramente nas indústrias processadoras de alimentos, vários agentes químicos, como por exemplo, hipoclorito de sódio, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, quaternário de amônio, entre outros. Estes

compostos podem gerar a formação de subprodutos indesejados ou ainda, contribuir para o aumento da resistência dos micro-organismos (DOYLE, 2006; XUE et al., 2017). Além disso, o desenvolvimento de resistência antimicrobiana associada à resistência dos biofilmes, e a atual demanda dos consumidores pela redução do uso de produtos químicos, abre caminho para explorar novas estratégias a fim de garantir alimentos seguros (SCHLISSSELBERG e YARON, 2013). Portanto, novas abordagens para o controle de biofilmes vêm sendo estudadas como possíveis ferramentas biológicas incluindo o uso de enzimas, bacteriófagos, interações microbianas e antimicrobianos naturais de origem microbiana ou vegetal (SREY, JAHID e HA, 2013; ALVES, 2014).

3.5 Antimicrobianos

A utilização de plantas e seus derivados, como óleos essenciais e extratos vegetais, é feita pelas populações desde muito tempo, principalmente na área terapêutica. Dentre os compostos, os óleos essenciais são misturas de compostos aromáticos voláteis produzidos durante o metabolismo secundário das plantas e podem ser influenciados por fatores bióticos e abióticos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; ANDRADE et al., 2014). Os compostos majoritários presentes nos óleos essenciais possuem diversas propriedades, tais como as atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiparasitárias, antitoxigênicas, antissépticas, anestésicas (FERNANDES JÚNIOR et al., 2014).

Outros antimicrobianos de importância são os peptídeos, metabólitos ativos sintetizados por fungos, bactérias, insetos, mamíferos, peixes, plantas, procariontes e humanos (ALVES, 2014). As bacteriocinas, e seus micro-organismos produtores correspondentes, têm sido reconhecidos como potenciais agentes bioconservadores de alimentos devido a suas propriedades, como a alta estabilidade às variações de temperatura e pH e o amplo espectro de ação (SETTANNI e CORSETTI, 2008; ALVES, 2014).

Os antimicrobianos podem ser utilizados em sinergismo, ou não, com outros componentes presentes em menores quantidades e ainda, podem ser combinados dois ou mais antimicrobianos, com o objetivo de reduzir a concentração de cada composto utilizado e também minimizar a possibilidade de resistência pelos micro-organismos. Eles podem interagir em diferentes locais da célula microbiana, causando a perda de constituintes celulares, colapso da estrutura da membrana plasmática e morte celular (BARBOSA et al., 2009; BURT, 2004).

A busca e a pesquisa por novos antimicrobianos têm aumentado, principalmente na indústria farmacêutica e na indústria de alimentos. Isso acontece como consequência do grande número de bactérias resistentes aos antimicrobianos e agentes químicos utilizados atualmente. A busca cada vez maior por conservantes que possibilitem o aumento na vida útil dos alimentos e o interesse por produtos mais saudáveis, com menor adição ou totalmente sem aditivos químicos, vem crescendo constantemente. Os produtos obtidos de fontes naturais, especialmente os de origem microbiana e vegetal são considerados fontes importantes para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (ALVES, 2014).

3.5.1 Nisina

A nisina é uma bacteriocina da classe dos lantibióticos, produzida por linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, uma bactéria amplamente utilizada na indústria de alimentos como cultura starter na composição de fermentos lácticos para o processamento de queijos (CLEVELAND, et al., 2001).

O uso comercial da nisina começou em 1953, na Inglaterra, e no ano de 1988 ela foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para ser utilizada como conservante em alimentos, reconhecida como GRAS (*Generally Regarded as Safe*) (ZACHAROF e LOVITTB, 2012). Assim, tornou-se a primeira bacteriocina aprovada para uso em alimentos e com liberação para aplicação no processamento de leite e derivados. Atualmente já tem seu uso aprovado como conservante em mais de 50 países (DE ARAUZ et al., 2009; COTTER, HILL e ROSS, 2005; DEEGAN et al., 2006; WILLIAMS e DELVES-BROUGHTON, 2003).

Estruturalmente a nisina consiste num pequeno polipeptídeo de característica anfifílica formado por 34 aminoácidos com grupos terminais amina e carboxila e cinco anéis internos envolvendo pontes dissulfeto. Possui os resíduos atípicos de dehidroalanina e dehidrobutirina, além dos anéis de lantionina e β -metil-lantionina já característicos dos lantibióticos (PAPAGIANNI, 2003; WILLIAMS e DELVES-BROUGHTON, 2003).

As bactérias Gram negativas não sofrem ação inibitória pela nisina devido a sua parede celular externa atuar como uma barreira impermeável a essas moléculas. A nisina não consegue acessar a membrana plasmática, local de ação da mesma, e isso justifica a resistência destas bactérias a este peptídeo antimicrobiano (HELANDER e MATTILA-SANDHOLM, 2000). Como as bactérias Gram positivas não possuem a membrana externa, a

atividade antimicrobiana ocorre especialmente em *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* (BALCIUNAS et al., 2013).

3.5.2 Timol e carvacrol

Carvacrol, eugenol e timol são os principais compostos extraídos de óleos essenciais e, portanto, os mais estudados (ZHENG et al., 2013). Carvacrol e seu isômero timol são componentes majoritários do óleo essencial de orégano e de tomilho, respectivamente. Ambos são compostos fenólicos com atividade contra bactérias, bolores e leveduras, apresentando potencial para estender a vida útil e aumentar a segurança de alimentos (MILADI et al., 2016; PERIAGO et al., 2004). Carvacrol e timol foram classificados como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (SUPPAKUL et al., 2003) e representam uma "alternativa verde" aos fungicidas clássicos e antimicrobianos sintéticos.

Os compostos timol e carvacrol interagem com a bicamada lipídica da membrana plasmática devido a sua natureza hidrofóbica (MARTÍNEZ-GRACIÁ et al., 2015). Por esse motivo, as propriedades antimicrobianas de carvacrol e timol dependem da capacidade dos compostos em permeabilizar, despolarizar e romper a membrana citoplasmática das bactérias (LAMBERT et al., 2001; ULTEE, BENNIK e MOEZELAAR, 2002; MEMAR et al., 2017). Os efeitos de timol e carvacrol podem ocorrer em mais locais das células bacterianas, sendo efetivos contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, causando a perda de constituintes essenciais das células e por consequência, morte celular (BARBOSA et al., 2009; BURT, 2004; SARTORATTO et al., 2004).

3.6 Encapsulação

Compostos naturais extraídos de óleos essenciais, como o timol e carvacrol, e compostos sintetizados por micro-organismos, como as bacteriocinas, quando utilizados livremente, comumente apresentam problemas por terem baixa estabilidade, interação com o meio ambiente, com resíduos de alimentos e de produtos de limpeza, problemas quanto à hidrofobicidade, volatilidade e/ou fortes características organolépticas (LI et al., 2015). Estes problemas podem ser superados encapsulando-se os compostos para que tenham maior estabilidade física, bioatividade aumentada, através de uma liberação controlada, facilitando

sua interação com a superfície e minimizando a influência de características organolépticas (DONSÌ et al., 2011).

A encapsulação é um método bastante utilizado para proteger o composto de interesse, podendo mascarar odores e/ou sabores indesejáveis e ressaltar atributos desejáveis. Além disso, pode aumentar a estabilidade e eficácia de moléculas em aplicações alimentares, preservando suas propriedades físico-químicas e proporcionando uma liberação controlada de compostos bioativos (TAYLOR et al., 2005; CHAPAL, 2017).

A escolha da técnica adequada e do material de encapsulação implica a análise de uma série de fatores, levando-se em consideração as características físico-químicas do composto a encapsular, as condições de processamento, a influência sobre a eficiência de encapsulação, o mecanismo de liberação, o tamanho de partícula, a densidade e a morfologia final necessários para incorporá-lo corretamente no produto final (RODRIGUEZ et al., 2016; RAY et al., 2016).

Entre os sistemas de encapsulamento, podem ser utilizadas matrizes lipídicas, adequadas para serem incorporadas ou entrarem em contato com alimentos. As principais matrizes existentes são as emulsões, micelas, esferas de hidrogel, moléculas complexas, partículas lipídicas e lipossomas (MCCLEMENTS e RAO, 2011).

3.6.1 Lipossomas

Os lipossomas são estruturas colidais constituídas por lipídeos anfipáticos que são capazes de se organizar em bicamadas e um núcleo interno aquoso (DE LA TORRE e DE PINHO, 2015). São sistemas utilizados para encapsular substâncias hidrofílicas, hidrofóbicas e anfifílicas (ELOY et al., 2014; MOZAFARI et al., 2006). Durante o processo de encapsulação e formação dos lipossomas, as moléculas hidrofóbicas são incorporadas nas bicamadas fosfolipídicas enquanto as moléculas hidrofílicas ficam imersas no núcleo aquoso, conforme mostrado na Figura 2 (GILLET et al., 2009).

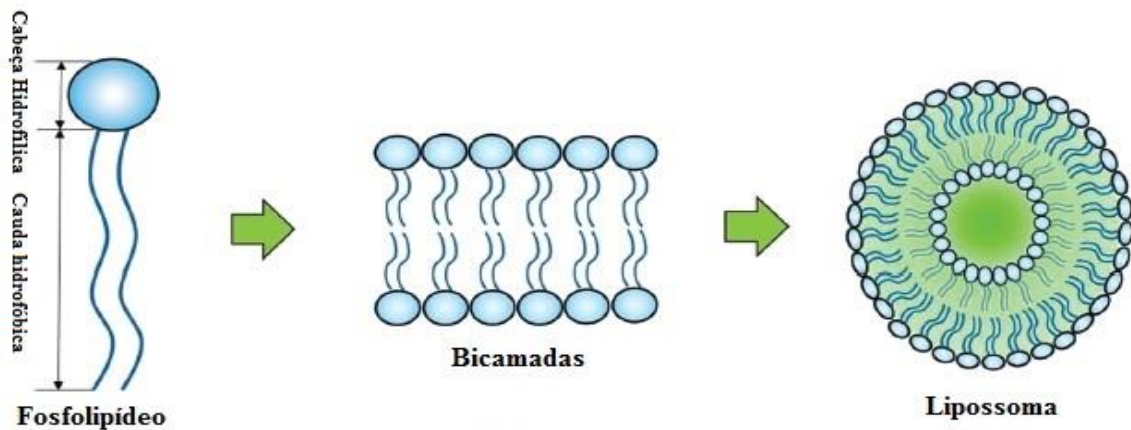


Figura 2: Formação de lipossomas (LIU, YE e SINGH, 2015)

A encapsulação em lipossomas melhora muitas vezes a estabilidade dos compostos (SEBAALY et al., 2015). São estruturas amplamente estudadas para utilização nas áreas farmacêutica, alimentícia, agricultura e cosmética (TAYLOR et al., 2005; ZYLBERBERG e MATOSEVIC, 2016; ELOY et al., 2014; RAHIMPOUR e HAMISHEHKAR, 2012). Na área de alimentos, os lipossomas são muito utilizados para encapsular antioxidantes (MOZAFARI et al., 2006) e antimicrobianos (ENGEL et al., 2017; SEBAALY et al., 2015).

Existem muitas técnicas para a encapsulação em lipossomas, destacando-se injeção de etanol, evaporação em fase reversa, liofilização, congelamento e descongelamento, rápida expansão da solução supercrítica, processo de secagem solução gás-saturado (GSS) e hidratação do filme lipídico. Esta última é a mais utilizada e aprofundada na área de alimentos (CHAPAL, 2017).

A técnica de hidratação do filme lipídico consiste na solubilização dos fosfolípidios em solvente orgânico, o qual é evaporado em seguida para a formação de um filme lipídico fino e em seguida, é re-hidratado com a solução a ser encapsulada sob agitação mecânica vigorosa e com uma temperatura mais alta do que a temperatura de transição de fase dos fosfolípidios. Isso leva à formação das vesículas e este processo geralmente é seguido de agitação por ultrassom, onde as vesículas têm redução de tamanho (BANGHAM, STANDISH e WATKINS, 1965).

Portanto, a encapsulação de antimicrobianos naturais hidrofóbicos como timol e carvacrol, utilizando a técnica de hidratação do filme lipídico, pode representar uma

alternativa visando o desenvolvimento de um composto capaz de inibir bactérias de importância em alimentos como a *Samonella* aderida em superfície de vidro.

4. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

4.1 ARTIGO 1

Avaliação do efeito sinérgico de timol, carvacrol e nisina frente à *Staphylococcus aureus* e de timol e carvacrol frente à *Salmonella Enteritidis*

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

4.2 ARTIGO 2

Encapsulação de timol e carvacrol em lipossomas: caracterização e inibição de *Salmonella* aderida em superfície de vidro

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

4.1 ARTIGO 1

Avaliação do efeito sinérgico de antimicrobianos naturais frente à *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Enteritidis*

Caroline Heckler¹, Voltaire Santa'Anna², Patrícia da Silva Malheiros^{1*}

¹Departamento de Ciências de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – ICTA/UFRGS, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Área da Vida e Meio Ambiente, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Campus em Encantado, Encantado, RS, Brasil.

*Autor correspondente: ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91540-000, Porto Alegre, Brasil. Fax: +55 51 3308 7048.

E-mail: patricia.malheiros@ufrgs.br

Resumo

O crescimento no número de doenças transmitidas por alimentos (DTA) é um problema de saúde pública e tem sido foco de grande preocupação nos últimos anos no Brasil e em todo mundo. Diversos antimicrobianos são conhecidos por demonstrarem capacidade para inibir e controlar a multiplicação de micro-organismos em alimentos. O efeito sinérgico entre diferentes antimicrobianos pode reduzir a concentração de cada composto necessária e minimizar a possibilidade de resistência dos micro-organismos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi determinar o efeito sinérgico de carvacrol, timol e nisina contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis. Primeiramente, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) para cada composto individualmente. Em seguida, foi determinado o efeito sinérgico utilizando um planejamento fatorial 2^3 para *S. aureus* e um planejamento fatorial 2^2 para *Salmonella*. Para *S. aureus* a CIM de timol, carvacrol e nisina foi 150, 200 e 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para *Salmonella* a CIM de timol e carvacrol foi 200 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a nisina não causou efeito inibitório. Os resultados referentes ao planejamento fatorial mostraram que a mistura dos antimicrobianos nisina, carvacrol e timol; a interação entre timol e carvacrol bem como a interação entre nisina e carvacrol demonstraram efeito combinado frente a *S. aureus*. Do mesmo modo, a interação entre timol e carvacrol foi significativa na redução de *S. Enteritidis* sugerindo efeito combinado entre ambos os compostos.

Palavras-chave: antimicrobianos, sinergismo, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*.

1. Introdução

A crescente demanda dos consumidores por alimentos inócuos, preparados sem a adição de conservantes químicos e com longa vida útil impulsionam a indústria alimentícia e as instituições de pesquisas para a busca por novas tecnologias de conservação. Dentre as alternativas para atender essa demanda estão os ingredientes antimicrobianos naturais, os quais podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com outras tecnologias.

Os ingredientes antimicrobianos podem ser incorporados diretamente nos alimentos ou podem ser constituintes de embalagens ativas. Em ambos os casos, é interessante considerar a combinação de diferentes antimicrobianos naturais os quais podem apresentar efeito sinérgico (Mathur et al., 2017). A escolha do antimicrobiano deve ser baseada na compatibilidade química, nutricional e sensorial deste com o alimento alvo, na sua efetividade contra micro-

organismos indesejáveis, resistência microbiana, segurança, dentre outras características (Pisoschi et al., 2018).

Diversos compostos antimicrobianos presentes em óleos essenciais de plantas são conhecidos por demonstrarem capacidade para inibir ou controlar a multiplicação de micro-organismos em alimentos (D'Amato, Serio, López, & Paparella, 2018). Carvacrol, eugenol e timol são extraídos de óleos essenciais e são compostos amplamente estudados (Zheng, Bae, Jung, Heu, & Lee, 2013). Carvacrol e seu isômero timol são componentes majoritários do óleo essencial de orégano e de tomilho. Ambos são compostos fenólicos com atividade contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras apresentando potencial para estender a vida útil e aumentar a segurança de alimentos (Miladi et al., 2016; Periago et al., 2004). Carvacrol e timol foram classificados como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (Suppakul, Miltz, Sonneveld, & Bigger, 2003) e representam uma "alternativa verde" aos fungicidas clássicos e antimicrobianos sintéticos.

Outro antimicrobiano aprovado para uso em alimentos considerado GRAS é a nisina. A nisina é uma bacteriocina, ou seja, um peptídeo que apresenta ação antimicrobiana, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis* que tem seu uso autorizado para aplicação em alimentos em mais de 40 países (Cleveland, Montville, Nes, & Chikindas, 2001). Foi a primeira bacteriocina produzida comercialmente e autorizada para utilização em alimentos, especialmente em produtos lácteos (Balciunas et al., 2013; De Martinis, Alves, & Franco, 2002). Possui atividade antimicrobiana especialmente contra bactérias Gram positivas, como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Balciunas et al., 2013).

S. aureus, assim como a bactéria Gram negativa *Salmonella*, estão entre os agentes etiológicos mais frequentemente envolvidos nos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Brasil de 2007 a 2017, com 26,18% e 20,69% dos casos, respectivamente (Ministério da Saúde, 2017). Visando diminuir as contaminações provocadas por esses micro-organismos, os antimicrobianos naturais podem ser uma boa alternativa para serem utilizados isoladamente ou em conjunto, podendo aumentar seu potencial inibitório. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito sinérgico de carvacrol, timol e nisina contra *S. aureus* e *Salmonella*.

2. Materiais e métodos

2.1 Culturas bacterianas

S. aureus ATCC 2998 e *Salmonella* Enteritidis (linhagem SE86) foram selecionados como um representante Gram positivo e Gram negativo, respectivamente. Ambas as bactérias fazem parte da coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos da UFRGS. A *Salmonella* SE86 foi isolada de um repolho envolvido em surto alimentar em 1999 apresentando o mesmo perfil genotípico das linhagens de *S. Enteritidis* envolvidas na maioria das salmonelose ocorridas de 1999 a 2012, no Rio Grande do Sul (Capalonga et al., 2014; Oliveira, Brandelli, & Tondo, 2006).

Ambas as bactérias foram mantidas a - 18 °C em 10% de glicerol. Para ativação foi transferido 20 µL de cada cultura para 3 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) adquirido da HiMedia (Mumbai, Índia) incubado a 37 °C por 24 h.

2.2 Preparo das soluções antimicrobianas

Timol ($\geq 98,5\%$ pureza) e carvacrol (98% pureza) foram adquiridas de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para a preparação das soluções, adicionou-se a um tubo estéril 0,106g do composto antimicrobiano e 10 mL de uma solução de DMSO 10% em água (Chorianopoulos et al., 2008).

Nisina comercial (Nisaplin®) foi adquirida da Danisco Brasil Ltda. De acordo com o fabricante a formulação contém 77,5% de NaCl, 20% de sólidos desnaturados de leite e 2,5% de nisina pura. Para preparação da solução primeiramente 1 g de Nisaplin® foi diluído em 10 mL de HCl 0,01M e filtrado em poros de 0,22 µm (Millipore). Em seguida, 2 mL dessa solução foi diluído em 3 mL de tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 (da Silva Malheiros, Micheletto, Silveira, & Brandelli, 2010).

2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada para os antimicrobianos timol, carvacrol e nisina usando como indicadores as cepas citadas acima. Cada bactéria foi ajustada para aproximadamente 10^8 UFC/mL diluindo a suspensão em caldo BHI para obter uma absorbância (DO_{630nm}) de aproximadamente 0,5 (escala de MacFarland), usando espectrofotômetro Ultrospec™ 3100 pro (Amersham Biosciences, UK). Para confirmação, foi realizada contagem em placas usando agar BHI. Inicialmente, foram adicionados 100 µl de caldo Mueller Hinton, adquirido de HiMedia (Mumbai, Índia), para cada poço. Após, 100 µl de cada solução contendo os antimicrobianos foram adicionados ao primeiro poço, homogeneizados e transferidos para o

segundo poço, do segundo ao terceiro, e assim por diante. Então, 100 µl de cada cultura bacteriana, separadamente, foram adicionados em cada poço. Controle positivo foi realizado usando somente o caldo BHI. Controle negativo foi realizado usando as soluções diluentes sem o antimicrobiano. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C durante 18-24 h e a turbidez de cada poço foi observada. A CIM foi considerada a menor concentração sem turbidez no poço.

2.4 Planejamento fatorial para determinação do efeito sinérgico

A fim de avaliar o efeito combinado entre os três antimicrobianos estudados, utilizou-se a metodologia de planejamento fatorial, que permite avaliar o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (Peralta-Zamora, De Moraes, & Nagata, 2005). Para analisar este efeito sobre a população de *S. aureus*, os procedimentos experimentais foram organizados por meio de um planejamento fatorial 2^3 com três repetições do ponto central. Para descrever a superfície de resposta, foram utilizados planejamentos fatoriais completos com três níveis codificados [com seus dois pontos aumentados (valores codificados -1 e +1) com quatro repetições dos pontos centrais (todos os fatores no nível 0) e três variáveis para estudar a influência combinada de concentração de nisina (x_1), concentração de timol (x_2) e concentração de carvacrol (x_3). Os pontos codificados +1 foram avaliados considerando o dobro da concentração inibitória mínima de cada antimicrobiano; o ponto -1, considerado sem antimicrobiano; e o ponto central, considerado o valor da concentração inibitória mínima. O planejamento experimental codificado, juntamente com os valores reais das variáveis independentes são mostrados na Tabela 1. O modelo da equação para este caso foi expressa como:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (1)$$

onde Y é resposta (população de *S. aureus*); b_0 , intercepta; b_1 , b_2 , b_3 coeficientes lineares e b_{12} , b_{13} , b_{23} , b_{123} coeficientes de interação.

Bactérias Gram negativas não sofrem ação inibitória pela nisina devido a sua parede celular atuar como uma barreira impermeável a essas moléculas. A superfície dessas bactérias é geralmente aniônica e possui uma tendência natural de ligação com a nisina, que é catiônica. Quando a nisina liga-se com a membrana externa da parede de bactérias Gram negativas, através de ligações eletrostáticas, a mesma não consegue mais acessar a membrana

plasmática, local de ação da nisina, e isso justifica a resistência destas bactérias a este peptídeo antimicrobiano (Helander & Mattila-Sandholm, 2000). Por esse motivo, para analisar o efeito combinado de antimicrobianos sobre a população de *S. Enteritidis*, os procedimentos experimentais foram organizados por meio de um planejamento fatorial 2^2 , utilizando-se apenas os antimicrobianos timol e carvacrol, com três repetições do ponto central.

Para descrever a superfície de resposta, foram utilizados planejamentos fatoriais completos com três níveis codificados [com seus dois pontos aumentados (valores codificados -1 e +1) com três repetições dos pontos centrais (todos os fatores no nível 0)] e duas variáveis para estudar a influência combinada de concentração de timol (x_1) e concentração de carvacrol (x_2). Os pontos codificados +1 foram avaliados considerando o dobro da concentração inibitória mínima de cada antimicrobiano; o ponto -1, considerado sem antimicrobiano; e o ponto central, considerado o valor da concentração inibitória mínima. O planejamento experimental codificado, juntamente com os valores reais das variáveis independentes são mostrados na Tabela 2.

O modelo da equação para este caso foi expressas como:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (2)$$

onde Y é resposta (população de *S. Enteritidis*); b_0 , interceptar; b_1 e b_2 coeficientes lineares e b_{12} o coeficiente de interação.

2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados com auxílio do software Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), através das médias de dois experimentos independentes. Foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e foram desenhados Diagramas de Pareto para ilustrar os efeitos das variáveis independentes sobre as populações das bactérias estudadas e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas, quando $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1 Concentração Inibitória Mínima

A CIM para *S. aureus* foi de 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de timol e carvacrol, respectivamente. Portanto, mesmo sendo isômeros a CIM foi diferente para ambos os agentes antimicrobianos.

Esses resultados estão em concordância com Guarda, Rubilar, Miltz, & Galotto (2011), que observaram CIM para timol e carvacrol de 250 e 225 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus* ATCC 25923, respectivamente. Por outro lado, a CIM de carvacrol contra a bactérias Gram positiva *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi de somente 0,6 $\mu\text{g/mL}$ de acordo com De Sousa et al. (2012). Em relação a CIM de nisina contra *S. aureus* o valor encontrado neste trabalho foi de 30 $\mu\text{g/mL}$. Do mesmo modo, Shi et al. (2017) encontraram que a CIM de nisina contra 13 isolados de *S. aureus* e ATCC 29213 variou de 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$.

Para *S. Enteritidis*, a CIM foi de 200 $\mu\text{g/mL}$ utilizando timol e carvacrol como agentes antimicrobianos, enquanto a nisina não foi capaz de causar efeito inibitório sobre a bactéria Gram negativa. Do mesmo modo, Kim, Marshall & Wei (1995) observaram CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$ de carvacrol contra *S. Typhimurium*. A incapacidade da nisina em inibir a *Salmonella* possivelmente se dá pela presença da membrana externa que protege a parede celular de bactérias Gram negativas limitando a passagem de alguns compostos antimicrobianos (Vaara, 1992). Além da nisina, diversas outras bacteriocinas precisam ser combinadas com algum agente quelante para inibir bactérias Gram negativa. Lappe, Motta, Sant'Anna & Brandelli (2009), por exemplo, observaram que a combinação de cereína 8A com EDTA e lactato de sódio (compostos quelantes) agiram sinergicamente na inibição de *S. Enteritidis*, possivelmente devido à ação sequestraste de íons magnésio da camada de lipopolissacarídeos, permitindo maior ação da bacteriocina na membrana celular da bactéria.

3.2 Efeito Combinado

A Tabela 1 mostra os resultados para o planejamento fatorial referente ao estudo do efeito da combinação de nisina, timol e carvacrol sobre *S. aureus*.

Tabela 1 – Efeito sinérgico de carvacrol, timol e nisina frente a *S. aureus*.

Ensaio*	X ₁ (N)	X ₂ (T)	X ₃ (C)	<i>S. aureus</i> (log UFC/mL)
1	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	9,37 ± 0,01
2	+1 (60)	-1 (0)	-1 (0)	8,89 ± 0,16
3	-1 (0)	+1 (300)	-1 (0)	9,03 ± 0,21
4	+1 (60)	+1 (300)	-1 (0)	8,04 ± 0,19
5	-1 (0)	-1 (0)	+1 (400)	8,70 ± 0,00
6	+1 (60)	-1 (0)	+1 (400)	5,85 ± 0,21

7	-1 (0)	+1 (300)	+1 (400)	5,96 ± 0,55
8	+1 (60)	+1 (300)	+1 (400)	4,39 ± 0,01
9	0 (30)	0 (150)	0 (200)	8,34 ± 0,06
10	0 (30)	0 (150)	0 (200)	8,16 ± 0,23
11	0 (30)	0 (150)	0 (200)	8,01 ± 0,01

*Aleatorizados previamente à experimentação

X₁ – concentração de Nisina (N) expressa em µg/mL

X₂ – concentração de Timol (T) expressa em µg/mL

X₃ – concentração de Carvacrol (C) expressa em µg/mL

A análise de variância (ANOVA) mostra que o valor F calculado para a regressão não linear dos dados experimentais à Equação 1 foi de 37,05, sendo maior que o F tabelado (2,79) à 95% de confiança e que o R^2 estimado foi de 0,9368, indicando que 93,68% dos pontos experimentais são explicados pela equação obtida e significância do modelo de regressão, que foi:

$$Y = 7,70 - 0,74x_1 - 0,67 x_2 - 1,30 x_3 - 0,37 x_1x_3 - 0,38 x_2x_3 \quad (3)$$

O Diagrama de Pareto (Figura 1) mostra os efeitos das interações das combinações de nisina, timol e carvacrol sobre *S. aureus*. Os resultados indicam que as concentrações dos antimicrobianos (nisina, timol e carvacrol) isoladamente são significativos ($p < 0,05$), e ainda, a interação entre timol e carvacrol e a interação entre nisina e carvacrol foram significativas ($p < 0,05$) para reduzir a população de *S. aureus*, nas condições testadas. A interação entre nisina e timol não foi significativa ($p > 0,05$).

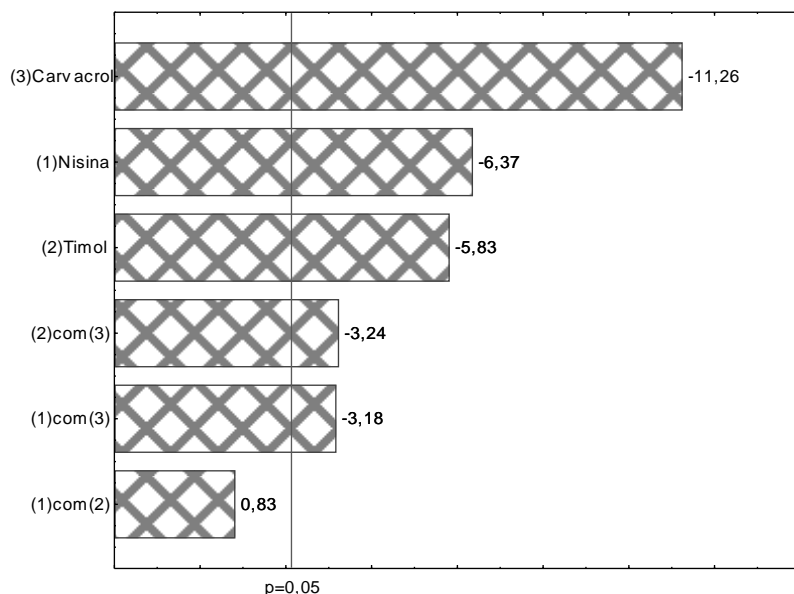


Figura 1. Diagrama de Pareto do efeito combinado de nisina, timol e carvacrol sobre *S. aureus*.

Os resultados da ANOVA indicam que a interação entre nisina e timol bem como timol e carvacrol foram significativas ($p < 0,05$) na redução da contagem microbiana de *S. aureus*. Ainda, ao analisar o efeito dos antimicrobianos (Tabela 1), a presença de nisina reduziu 0,48 log UFC/mL a população de *S. aureus* em relação aos experimentos sem antimicrobianos, enquanto o carvacrol reduziu 0,67 log UFC/mL e o timol 0,34 log UFC/mL. Já quando a nisina foi combinada com timol, houve redução de 1,33 log UFC/mL e quando combinada com carvacrol a redução foi de 3,52 log UFC/mL. A combinação de timol e carvacrol, reduziu a contagem microbiana em 3,41 log UFC/mL. A solução contendo nisina, timol e carvacrol nas concentrações de 30, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ acarretou em redução de aproximadamente 1,20 log UFC/mL, sendo que no dobro dessa concentração a redução foi de 4,98 log UFC/mL em relação ao controle. Portanto, houve efeito combinado entre os três antimicrobianos testados.

A nisina utilizada em conjunto com outros compostos antimicrobianos pode ser uma alternativa para o aumento do espectro de ação, redução das concentrações de nisina necessárias e diminuição da resistência dos micro-organismos (Ettayebi, El Yamani, & Rossi-Hassani, 2000). O efeito da nisina pode ser explicado pelas interações fosfolipídicas com a membrana citoplasmática, que formam poros e assim, o efluxo de constituintes essenciais dos micro-organismos (Williams & Delves-Broughton, 2003). Já timol e carvacrol têm estruturas semelhantes com o grupo hidroxila em diferente localização no anel fenólico. Eles interagem

com a bicamada lipídica da membrana plasmática, devido a sua natureza hidrofóbica (Martínez-Graciá, González-Bermúdez, Cabellero-Valcárcel, Santaella-Pascual, & Frontela-Saseta, 2015). Os efeitos de timol e carvacrol podem ocorrer em mais locais das células bacterianas, sendo efetivos contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, causando a perda de constituintes essenciais das células, colapso da estrutura da membrana plasmática e por consequência, morte celular (Barbosa et al., 2009; Burt, 2004; Sartoratto et al., 2004).

Alves (2014) verificou a existência de sinergismo quando foram testadas as combinações de nisina com outros compostos (timol, carvacrol, eugenol e cinamaldeído) sobre *S. aureus*. Outros estudos utilizando nisina em conjunto com compostos antimicrobianos isolados contra bactérias Gram positivas (Abdollahzadeh, Rezaei, & Hosseini, 2014; Chen & Zhong, 2017; Pajohi, Tajik, Farshid, & Hadian, 2011) também demonstraram ação sinérgica. Ettayebi et al. (2000) analisaram o efeito sinérgico entre nisina e timol frente a *L. monocytogenes* concluíram que a interação entre esses compostos se deve ao fato do timol, assim como outros compostos fenólicos, provocar a despolarização da membrana plasmática dessas bactérias, facilitando assim a entrada da nisina mesmo quando utilizada em concentrações sub-inibitórias.

A Tabela 2 mostra os resultados para o planejamento fatorial referente ao estudo do efeito da combinação de timol e carvacrol sobre *S. Enteritidis*.

Tabela 2. Estudo do efeito de carvacrol e timol frente a *S. Enteritidis* SE86.

Ensaio*	X ₁ (T)	X ₂ (C)	População de <i>S. Enteritidis</i>
			(log UFC/mL)
1	-1 (0)	-1 (0)	9,79 ± 0,07
2	+1 (400)	-1 (0)	5,51 ± 0,13
3	-1 (0)	+1 (400)	4,65 ± 0,92
4	+1 (400)	+1 (400)	0,00 ± 0,00
5	0 (200)	0 (200)	5,38 ± 0,14
6	0 (200)	0 (200)	5,47 ± 0,18
7	0 (200)	0 (200)	5,41 ± 0,01

*Aleatorizados previamente à experimentação

X₁ – T concentração de Timol (T) expressa em µg/mL

X₂ – concentração de Carvacrol (C) expressa em µg/mL

A análise de variância (ANOVA) mostra que o valor F calculado para a regressão não linear dos dados experimentais à Equação 1 foi de 202,02, sendo maior que o F tabelado (3,71) à 95% de confiança e que o R^2 estimado foi de 0,9840, indicando que 98,40% dos pontos experimentais são explicados pela equação obtida e significância do modelo de regressão, que foi:

$$Y = 5,17 - 2,66x_1 - 2,23x_2 \quad (4)$$

A análise do Diagrama de Pareto (Figura 2) indica matematicamente que a interação entre os dois antimicrobianos testados frente à *S. Enteritidis* não foi significativa ($p > 0,05$) e somente os antimicrobianos isoladamente foram significativos ($p < 0,05$). Contudo, a análise dos dados da Tabela 2 mostra que a combinação de ambos os compostos implicam em redução significativa ($p < 0,05$) de *S. Enteritidis* em relação a suas atuações individuais. Uma solução composta por 400 $\mu\text{g/mL}$ de timol e 400 $\mu\text{g/mL}$ de carvacrol foi capaz de inativar uma população de 9,79 log UFC/mL de *S. Enteritidis*. Ao utilizar metade dessa concentração de antimicrobianos (200 $\mu\text{g/mL}$ de timol e 200 $\mu\text{g/mL}$ de carvacrol) a inibição também foi elevada, em torno de 4,5 log UFC/mL de *S. Enteritidis*.

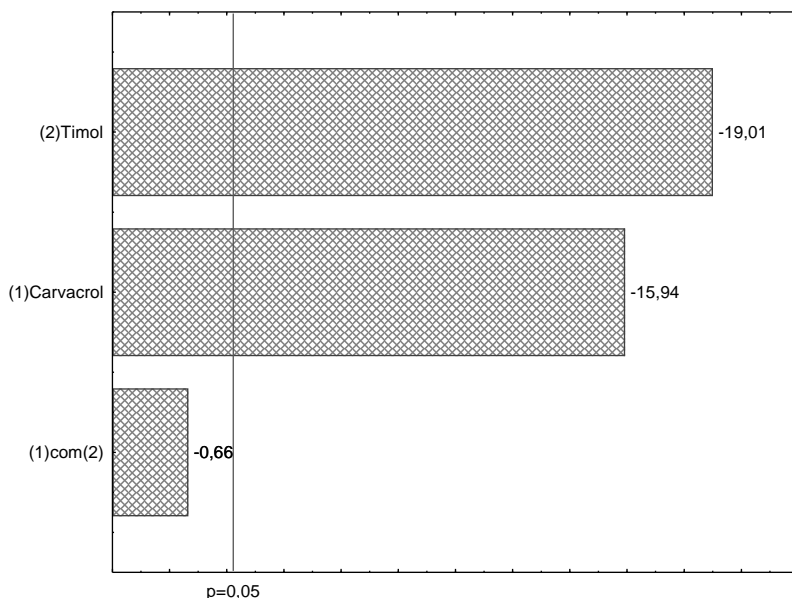


Figura 2. Diagrama de Pareto do efeito combinado de timol e carvacrol sobre a *S. Enteritidis*.

Como explicado anteriormente, timol e carvacrol tem estruturas semelhantes, pois são isômeros, e interagem com a membrana plasmática, devido a sua natureza hidrofóbica

(Martínez-Graciá et al., 2015). Por isso, as propriedades antimicrobianas de carvacrol e timol dependem da capacidade dos compostos em permeabilizar, despolarizar e romper a membrana citoplasmática das bactérias Gram negativas (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001; Memar, Raei, Alizadeh, Aghdam, & Kafil, 2017; Ultee, Bennik, & Moezelaar, 2002).

A eficácia antibacteriana aumentada de carvacrol e timol quando utilizados em conjunto contra *Salmonella* também foi observada por outros pesquisadores (Du et al., 2015; Jesus et al., 2015; Moon & Rhee, 2016). Segundo Ahmad et al. (2011), o grupo hidroxila aumenta a hidrofobicidade destes compostos, ajudando-os a dissolver as células bacterianas, o que explica a maior atividade para a combinação de timol e carvacrol do que para cada composto isoladamente. Além disso, monoterpenos fenólicos, como o timol e carvacrol têm uma tendência para aumentar a atividade de outras substâncias naturais quando usado em misturas (Bassolé & Juliani, 2012).

4. Conclusão

O presente estudo leva à conclusão de que a mistura dos antimicrobianos nisina, carvacrol e timol; a interação entre timol e carvacrol e a interação entre nisina e carvacrol demonstraram efeito combinado frente a *S. aureus*. Além disso, a mistura de timol e carvacrol demonstrou efeito combinado frente a *S. Enteritidis* SE86, mostrando potencial para aplicação dos compostos em conjunto.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Referências Bibliográficas

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.004>
- Ahmad, A., Khan, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2011). Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30, 41–50. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1050-8>

Alves, F. C. B. (2014). *Ação antibacteriana de associações de antimicrobianos: nisina, óleos essenciais e compostos majotitários*. Botucatu.

Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. de M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32(1), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>

Barbosa, L. N., Rall, V. L. M., Fernandes, A. A. H., Ushimaru, P. I., da Silva Probst, I., & Fernandes, A. (2009). Essential Oils Against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria in Minced Meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(6), 725–728. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0282>

Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989–4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

Capalonga, R., Ramos, R. C., Both, J. M. C., Soeiro, M. L. T., Longaray, S. M., Haas, S., & Tondo, E. C. (2014). *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(7), 811–817. <https://doi.org/10.3855/jidc.3791>

Chen, H., & Zhong, Q. (2017). Lactobionic acid enhances the synergistic effect of nisin and thymol against *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 260, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.013>

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8)

D'Amato, S., Serio, A., López, C. C., & Paparella, A. (2018). Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*, 86, 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.030>

De Martinis, E. C. P., Alves, V. F., & Franco, B. D. G. M. (2002). Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, 18, 191–208. <https://doi.org/10.1081/FRI-120014688>

De Sousa, J. P., De Azerêdo, G. A., De Araújo Torres, R., Da Silva Vasconcelos, M. A., Da Conceição, M. L., & De Souza, E. L. (2012). Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.026>

Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., & Guo, Y. (2015). In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium*

perfringens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0055-7>

Ettayebi, K., El Yamani, J., & Rossi-Hassani, B. D. (2000). Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 183(1), 191–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00665-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00665-5)

Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., & Galotto, M. J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011>

Helander, I. M., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3), 153–156. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00307-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00307-X)

Jesus, F. P. K., Ferreira, L., Bizzi, K. S., Loreto, S., Pilotto, M. B., Ludwig, A., ... Santurio, J. M. (2015). In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. *Journal de Mycologie Medicale*, 25(2), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.10.023>

Kim, J., Marshall, M. R., & Wei, C. (1995). Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components against Five Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2839 – 2845. <https://doi.org/10.1021/jf00059a013>

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G.-J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>

Lappe, R., Motta, A. S., Sant'Anna, V., & Brandelli, A. (2009). Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A, EDTA and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology*, 135(3), 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.003>

Malheiros, P. da S., Micheletto, Y. M. S., Silveira, N. P. da, & Brandelli, A. (2010). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.015>

Martínez-Graciá, C., González-Bermúdez, C. A., Cabellero-Valcárcel, A. M., Santaella-Pascual, M., & Frontela-Saseta, C. (2015). Use of herbs and spices for food preservation: Advantages and limitations. *Current Opinion in Food Science*, 6, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.011>

Mathur, H., Field, D., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2017). Bacteriocin-antimicrobial synergy: A medical and food perspective. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1205. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01205>

Memar, M. Y., Raei, P., Alizadeh, N., Aghdam, M. A., & Kafil, H. S. (2017). Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical*

Microbiology, 28(2), 63–68. <https://doi.org/10.1097/MRM.000000000000100>

Miladi, H., Mili, D., Ben Slama, R., Zouari, S., Ammar, E., & Bakhrouf, A. (2016). Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microbial Pathogenesis*, 93, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.017>

Ministério da Saúde. (2017). Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Retrieved September 16, 2018, from http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf

Moon, H., & Rhee, M. S. (2016). Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.009>

Oliveira, F. A. de, Brandelli, A., & Tondo, E. C. (2006). Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *New Microbiologica*, 29, 49–54.

Pajohi, M. R., Tajik, H., Farshid, A. A., & Hadian, M. (2011). Synergistic antibacterial activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. seed and nisin in a food model. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 043-951. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04946.x>

Peralta-Zamora, P., De Moraes, J. L., & Nagata, N. (2005). Por que otimização multivariada? *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 10(2), 106–110. <https://doi.org/10.1590/s1413-41522005000200003>

Periago, P. M., Begón, B., Delgado, B., Fernández, P. S., Fernández, F., & Palop, A. (2004). Use of Carvacrol and Cymene To Control Growth and Viability of *Listeria monocytogenes* Cells and Predictions of Survivors Using Frequency Distribution Functions. *Journal of Food Protection* (Vol. 67).

Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K., & Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922–935. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>

Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 275–280. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>

Shi, C., Zhang, X., Zhao, X., Meng, R., Liu, Z., Chen, X., & Guo, N. (2017). Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Food Control*, 71, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.020>

Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Optimal transport and dynamics of expanding circle maps acting on measures. *Journal of Food Science*, 68(2), 408–420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05687.x>

Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561–1568. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>

Vaara, M. (1992). Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 56(3), 395–411.

Williams, G. C., & Delves-Broughton, J. (2003). Nisin. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 4128–4135. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00829-4>

Zheng, L., Bae, Y., Jung, K., Heu, S., & Lee, S. (2013). Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. *Food Control*, 32, 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.009>

4.2 ARTIGO 2

Encapsulação de timol e carvacrol em lipossomas: caracterização e inibição de *Salmonella* aderida em superfície de vidro

Caroline Heckler¹; Caroline Marques Maders Silva¹; Fabiola Ayres Cacciatore¹;
Patrícia da Silva Malheiros^{1*}

¹Departamento de Ciências de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – ICTA/UFRGS, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor correspondente: ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91540-000, Porto Alegre, Brasil. Fax: +55 51 3308 7048.

E-mail: patricia.malheiros@ufrgs.br

Resumo

A formação de biofilmes nas superfícies que entram em contato com alimentos é uma das principais fontes de contaminações microbiológicas no Brasil e no mundo. Para evitá-los, a limpeza e a sanitização devem ser eficientes, evitando a adesão e multiplicação de micro-organismos. Os antimicrobianos timol e carvacrol são compostos naturais extraídos de óleos essenciais de tomilho e orégano, e tem demonstrado eficiência contra um amplo espectro de bactérias e seus biofilmes. Assim, o objetivo desse trabalho foi encapsular timol e carvacrol, isoladamente e em conjunto, em lipossomas, caracterizá-los e avaliar sua ação contra *Salmonella* aderida em superfície de vidro. Para a encapsulação, utilizou-se a técnica de hidratação do filme lipídico. A caracterização mostrou que os lipossomas contendo timol (TL), carvacrol (CL) ou timol e/carvacrol (TCL) apresentaram diâmetro médio variando de 230 a 270nm; polidispersidade de 0,20 a 0,34; potencial zeta de aproximadamente -30 mV e eficiência de encapsulação de 99%. Todas as formulações foram estáveis por pelo menos 28 dias. Em seguida, foi determinada a CIM de cada composto livre e encapsulado frente a um *pool* composto por 3 cepas de *Salmonella*. Os resultados mostraram que a CIM para timol, carvacrol e o conjunto de timol e carvacrol livres foi de 331µg/mL; para TL e CL 663µg/mL; e para TCL 1325µg/mL. Então, o *pool* de *Salmonella* foi aderido em superfície de vidro (2 cm x 2 cm x 1 mm), seguido de sanitização por 1 minuto de contato com os compostos desenvolvidos utilizando a CIM, ½ CIM e 2xCIM. Após esse tempo, o número de células sobreviventes foi determinado por contagem em placas. Além disso, foi realizada MEV, mostrando a adesão de *Salmonella* e a ação das soluções antimicrobianas. Os resultados de adesão mostraram que a aderência dos micro-organismos ao vidro foi de $5,89 \pm 0,36$ log UFC/cm². As soluções antimicrobianas inativaram totalmente a população de micro-organismos aderida ao coupon de vidro nas concentrações de CIM e 2xCIM para os compostos livres. Já, para os compostos em lipossomas, somente inativaram totalmente com o 2xCIM. Nas concentrações de CIM, os compostos encapsulados tiveram uma redução de 4,03 log UFC/cm² para TL, 3,79 log UFC/cm² para CL e de 3,94 log UFC/cm² para TCL, demonstrando uma liberação mais lenta em comparação aos compostos livres. O controle positivo realizado com somente a solução alcoólica 20% (v/v) confirmou que o efeito antimicrobiano é devido ao timol e/ou carvacrol presentes nas soluções. A MEV mostrou a adesão da *Salmonella* ao vidro e a ação do carvacrol livre e encapsulado. Portanto, os antimicrobianos livres e/ou encapsulados em lipossomas desenvolvidos neste trabalho foram

capazes de reduzir ou inativar alta concentração de *Salmonella* aderida em vidro, sugerindo potencial para utilização como desinfetante alternativo para indústrias de alimentos e serviços de alimentação.

Palavras-chave: timol, carvacrol, vidro, lipossomas, *Salmonella*.

1. Introdução

A segurança dos alimentos é uma das principais preocupações dos consumidores, das indústrias de alimentos e dos órgãos fiscalizadores. Diferentes diretrizes têm sido propostas para prevenir e reduzir as contaminações dos alimentos (CAC, 2007). As medidas de controle englobam a recepção e o armazenamento adequados, as boas práticas de fabricação e as medidas higiênico-sanitárias ao longo de toda cadeia de alimentos (Tondo & Bartz, 2017).

As doenças mais comuns associadas ao consumo de alimentos contaminados são as infecções e intoxicações, manifestadas na maioria das vezes por febre, vômito, diarreia, mal-estar e cansaço. Dentre os principais patógenos veiculados por alimentos, a *Salmonella* é identificada como a maior causadora de surtos no Brasil e na União Europeia (EFSA, 2016; Ministério da Saúde, 2018). Além disso, também é um micro-organismo indicador de contaminação e higiene inadequada (Ceuppens et al., 2015).

No processamento de alimentos, superfícies como placas de corte, facas, equipamentos, máquinas, esteiras, tanques e cubas estão entre os principais veículos de contaminações em indústrias de alimentos e serviços de alimentação. Diversos materiais podem ser utilizados para a produção dessas superfícies, sendo os mais utilizados o aço inoxidável, o vidro e o polipropileno (Chia et al. 2009). O vidro é um material utilizado em placas de corte, utensílios e embalagens. É um material com característica hidrofílica, sendo menos propenso a adesão de micro-organismos, e mesmo assim, *Salmonella* tem demonstrado capacidade de formar biofilme em sua superfície (Prouty & Gunn, 2003).

A limpeza e a sanitização são etapas fundamentais para prevenir e evitar a adesão e multiplicação de micro-organismos em superfícies. Os produtos químicos, como hipoclorito de sódio, ácido peracético, peróxido de hidrogênio e quaternário de amônio, são os mais utilizados com essa finalidade. Porém, estes compostos podem gerar a formação de subprodutos indesejados, como os trihalometanos, ou ainda, contribuir para a resistência a antibióticos (Doyle, 2006; Xue et al., 2017). Além disso, os consumidores estão mais conscientes e preocupados, buscando cada vez mais produtos naturais e com menos aditivos

químicos. Por esse motivo, desinfetantes elaborados com extratos naturais e compostos provenientes de óleos essenciais estão se popularizando, já que são potencialmente mais seguros e ambientalmente mais amigáveis (Burt, 2004).

Os antimicrobianos timol e carvacrol são compostos naturais, monoterpenos aromáticos, constituintes principais extraídos dos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) (Peixoto-Neves et al., 2010). São classificados como substâncias GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2018) e tem demonstrado eficiência contra um amplo espectro de fungos, bactérias e seus biofilmes (Burt, 2004; Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2008; Szczepanski & Lipski, 2013). Esses compostos, quando utilizados livremente, comumente apresentam problemas por terem baixa estabilidade, interação com o meio ambiente, resíduos de alimentos e de produtos de limpeza, problemas quanto à hidrofobicidade, volatilidade e fortes características organolépticas (Li et al., 2015). Estes problemas podem ser superados encapsulando-se os compostos para que tenham maior estabilidade física, bioatividade aumentada, através de uma liberação controlada, facilitando sua interação com a superfície e minimizando a influência de características organolépticas (Donsì, Annunziata, Sessa, & Ferrari, 2011).

A encapsulação em lipossomas é amplamente estudada para utilização nas áreas farmacêutica, alimentícia, agricultura e cosmética (Mozafari, Johnson, Hatziantoniou, & Demetzos, 2008; Rahimpour & Hamishehkar, 2012; Zylberberg & Matosevic, 2016). Lipossomas são estruturas coloidais constituídas de bicamadas lipídicas e um núcleo interno aquoso, podendo ser utilizados para a encapsulação de compostos lipofílicos, hidrofílicos e anfifílicos (Eloy et al., 2014).

O objetivo desse trabalho foi encapsular timol e carvacrol em lipossomas e avaliar a ação das soluções com antimicrobianos frente a um *pool* composto por 3 cepas de *Salmonella* aderidas em superfície de vidro.

2. Materiais e Métodos

2.1 Micro-organismos

Foi utilizado um *pool* bacteriano composto por 3 cepas de *Salmonella*. As cepas utilizadas foram: *Salmonella* Enteritidis SE86, isolada de repolho envolvido em surto alimentar, *Salmonella* Heidelberg, isolada de produto avícola e *Salmonella* Typhimurium,

isolada de fezes de suínos. As cepas foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI; Merck, Darsmtadt, Alemanha), separadamente, e incubadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas. Cada suspensão bacteriana foi ajustada para 10^8 UFC/mL, através da resuspensão de células em caldo BHI estéril até obter absorvância de 0,5 (DO_{630nm}), em espectrofotômetro (Ultrospec 3100 pro, AmershamBiosciences, Reino Unido), e confirmada pela semeadura em placas com meio Agar *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD), incubadas a 37°C durante 18-24 horas e após, contagem em UFC/mL. Foram utilizadas 3 mL de cada cepa para totalizar 9 mL de *pool*.

2.2 Preparo das soluções

Timol (98% de pureza) e carvacrol ($\geq 99,5\%$ de pureza) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA). As soluções foram preparadas a partir de 0,106 g de cada composto antimicrobiano, timol ou carvacrol, ou 0,053 g de cada antimicrobiano, quando utilizados em conjunto, diluídas em 10 mL de solução alcoólica 20% (v/v).

2.3 Encapsulação em lipossomas

A encapsulação dos compostos antimicrobianos foi feita em lipossomas pela técnica de hidratação do filme lipídico (Malheiros et al., 2010). Para isso, pesou-se 0,08 g de fosfatidilcolina de soja (LIPOID S 100, Lipoid GMBH, Alemanha) e colocou-se em um balão de fundo redondo. Depois, adicionou-se 20 mL de clorofórmio, que foi removido em seguida por evaporação em rotaevaporador (Heidolph – Laborota 4000, Heizbad OB, Alemanha), formando-se o filme lipídico na superfície do balão. Para que não houvesse resíduo do solvente, deixou-se o balão em dessecador por 24 horas. Passado esse tempo, o filme foi re-hidratado pela solução contendo os antimicrobianos timol ou carvacrol ou ambos. A encapsulação foi realizada em banho-maria a 40 °C e sob agitação, para completa homogeneização. A fim de reduzir o tamanho dos lipossomas, a solução foi levada ao ultrassom de ponta (50 KHz, Sonics & Materials Inc. VCX 400, Danbury, CT, USA) por 3 ciclos de 1 minuto, em banho de gelo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.4 Caracterização dos lipossomas

Foi realizada a caracterização dos lipossomas, através de análise de diâmetro médio das nanopartículas em solução, polidispersidade (PDI), potencial zeta e pH.

O diâmetro médio e a polidispersidade foram determinados em equipamento Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, UK) e as medidas de potencial zeta foram realizadas em equipamento Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments, UK) em triplicata. Todas as medidas foram realizadas imediatamente após a encapsulação em lipossomas e analisadas após a diluição em água ultrapura na proporção de 1:10.

2.5 Estabilidade dos lipossomas

A estabilidade dos lipossomas foi acompanhada por 28 dias, mantendo-os a 4 °C. Mediu-se o diâmetro médio das partículas, a polidispersidade e o potencial zeta dos lipossomas nos dias 0, 7, 14, 21 e 28, seguindo a metodologia do item 2.4.

2.6 Eficiência de encapsulação

Previamente ao experimento foram realizadas varreduras (190-900nm) para determinar a absorbância máxima dos antimicrobianos em espectrofotômetro (Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, Reino Unido) e curvas padrões, com concentrações padrões conhecidas, para cada um dos compostos antimicrobianos. A eficiência de encapsulação dos antimicrobianos nos lipossomas desenvolvidos foi determinada de acordo com Shao *et al* (2018) com modificações, por separação de fases em centrífuga (MiniSpin®, Eppendorf, Alemanha). Para tal, colocou-se 1 mL da suspensão de lipossomas em tubos e estes foram submetidos à rotação de 10.000 g por 20 minutos. O sobrenadante, 0,1 mL, foi diluído em 4,9 mL de etanol 95% (v/v) e analisado no comprimento de absorção máxima dos compostos (260 nm para o timol e 297 nm para o carvacrol) em espectrofotômetro (Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, Reino Unido). A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada usando a seguinte equação:

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

2.7 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada utilizando-se microplacas com 96 poços (NCCLS, 2002). Cada suspensão bacteriana foi ajustada como descrito no item 2.1 para a formação do *pool*. Em seguida, colocou-se 100 µL de caldo BHI em cada um dos

poços. Depois, colocou-se 100 µL da solução com antimicrobianos no primeiro poço e realizaram-se as respectivas diluições, homogeneizando a solução com o caldo BHI e passando 100 µL para o poço seguinte, até que no último poço a solução fosse descartada. Por fim, colocou-se 100 µL do *pool* microbiano em cada um dos poços. Foram realizados controles positivos, com o caldo BHI e o *pool* microbiano e, com somente a solução alcoólica 20% (v/v) com o *pool* microbiano, para garantir que o efeito inibitório provia dos antimicrobianos e não da solução. Além disso, foi realizado controle negativo do diluente, com somente o caldo BHI e controle negativo das soluções com antimicrobianos, com somente o caldo BHI em conjunto com as soluções com antimicrobianos. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas. A CIM foi considerada a menor concentração na ausência de turbidez.

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada depois de passado o tempo de incubação das placas para a CIM. De cada poço foram inoculados 20 µL em placas com meio Agar *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD), para *Salmonella*, através da técnica de microgotas (Miles & Misra, 1938), e incubadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas. Após esse tempo, foi verificada a multiplicação ou não do micro-organismo, através de colônias típicas. A CBM foi considerada a menor diluição que inibiu totalmente o micro-organismo. Os testes foram realizados em triplicata.

2.8 Cinética de multiplicação de Salmonella in vitro na presença de soluções antimicrobianas

A cinética de multiplicação de *Salmonella in vitro* na presença das soluções com antimicrobianos foi realizada segundo Garcia & Isenberg (2010), com adaptações, utilizando-se o *pool* bacteriano ajustado em 10⁴ UFC/mL, através da diluição do padronizado em 10⁸ UFC/mL, conforme item 2.1, em caldo BHI. Após o ajuste, colocou-se 500 µL da solução em contato com a suspensão. Foram testadas as soluções antimicrobianas de timol, carvacrol e ambos compostos livres e as soluções com os compostos encapsulados em lipossomas. Os tubos de ensaio foram mantidos em estufa a 30 °C e foram retiradas amostras nos tempos de 0, 2, 4, 6, 24 e 48 horas. Em seguida, foram realizadas as devidas diluições seriadas e semeadura em placas com meio Agar XLD através da técnica das gotas (Miles & Misra, 1938), e incubadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas. Foi realizado controle positivo, com somente a solução alcoólica 20% (v/v), para garantir que o efeito inibitório provinha dos antimicrobianos e não da solução. Os testes foram realizados em triplicata.

2.9 Preparação das superfícies de vidro

Foram confeccionados corpos de prova de vidro nas dimensões de 2 cm x 2 cm, com espessura de 1 mm. Os coupons foram lavados com detergente neutro, enxaguados e em seguida secos a 60 °C. Depois, os coupons foram colocados em frascos e submetidos à autoclave a 121 °C, por 15 minutos, para esterilização (Rossoni & Gaylarde, 2000). Os coupons foram mantidos em frascos estéreis até a utilização nos ensaios.

2.10 Adesão de *Salmonella* ao vidro e ação das soluções antimicrobianas desenvolvidas

Para a adesão, foi utilizado *pool* microbiano ajustado para 10⁸ UFC/mL, como realizado para a CIM, em um frasco. Primeiramente, um coupon de vidro foi imerso no frasco com 10 mL de *pool* microbiano. O frasco foi incubado em estufa a 37 °C por 15 minutos para adesão das células bacterianas à superfície do vidro. Em seguida, o coupon foi lavado em um frasco com 10 mL de água peptonada 0,1% para que as células pouco aderidas fossem removidas. O coupon com as células aderidas ao vidro foi, então, imerso em 10 mL da solução antimicrobiana por 1 minuto. Foram testadas as concentrações de CIM, ½ CIM e 2xCIM. Passado o tempo de contato, o coupon foi lavado em 10 mL de água peptonada 0,1% para remoção da solução antimicrobiana. Em seguida, foi imerso em um frasco contendo mais 10 mL de água peptonada 0,1% e submetido à lavadora ultrassônica (UNIQUE® – USC700, Brasil), com potência de 55 KHz durante 10 minutos, para que as células se soltassem da superfície de vidro (Sinde & Carballo, 2000). Foram realizadas diluições seriadas de cada coupon sonificado e 20 µL de cada diluição foi semeada em placas contendo agar XLD, pelo método da gota (Miles & Misra, 1938), e incubadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas. Foram realizados dois controles positivos: (1) submetendo-se o coupon a 10 mL de água peptonada 0,1% depois do contato com o *pool* microbiano e (2) submetendo-se o coupon a 10 mL de solução alcoólica 20% (v/v) por 1 minuto, nas mesmas condições das soluções antimicrobianas, para comprovar que a ação foi devido aos antimicrobianos e não a solução alcoólica. Para a conversão de log UFC/mL para log UFC/cm², foi utilizada a seguinte equação:

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

2.11 Capacidade de inibição da adesão de *Salmonella* em superfície de vidro

A capacidade dos antimicrobianos em inibir a adesão de *Salmonella* em superfície de vidro foi analisada colocando-se 100 µL da solução antimicrobiana sobre o coupon de vidro e o deixando por 30 minutos em estufa a 30 °C para secar. Passado esse período, o coupon foi retirado da estufa e colocou-se 100 µL do *pool* bacteriano de *Salmonella* ajustado em 10⁸ UFC/mL sobre a camada da solução antimicrobiana formada no coupon de vidro. O coupon foi submetido a estufa a 30 °C por 10 minutos. Passado o tempo de contato, o coupon foi lavado em 10 mL de água peptonada 0,1% para remoção das células pouco aderidas e em seguida, foi imerso em um frasco contendo mais 10 mL de água peptonada 0,1% e submetido à lavadora ultrassônica (UNIQUE® – USC700, Brasil), com potência de 55 KHz durante 10 minutos, para que as células se soltassem da superfície de vidro (Sinde & Carballo, 2000). Foram realizadas diluições seriadas de cada coupon sonificado e 20 µL de cada diluição foi semeada em placas contendo agar XLD, pelo método da gota (Miles & Misra, 1938), e incubadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas. Foi realizado controle negativo, submetendo-se o coupon a solução alcoólica 20% (v/v), nas mesmas condições das soluções antimicrobianas, para comprovar que a ação foi devido aos antimicrobianos e não a solução alcoólica.

2.12 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a visualização da adesão do *pool* de *Salmonella* e do efeito da adição das soluções antimicrobianas, os coupons de vidro foram, imediatamente após o experimento, fixados em solução composta por 1,2 mL de glutaraldeído 25%, 5 mL de tampão fosfato 0,2M e 3,8 mL de água destilada, e mantidos refrigerados (4° C) por uma semana. Após esse período de tempo, as amostras foram lavadas três vezes com tampão fosfato 0,2M e água destilada (1:1) por 30 minutos cada. Em seguida, as amostras foram desidratadas passando por diferentes concentrações de etanol (30% por 10 minutos, 50% por 10 minutos, 70% por 10 minutos, 90% por 10 minutos, 90% por 20 minutos, 100% por 10 minutos e 100% por 20 minutos). As amostras foram submetidas ao aparelho de secagem em ponto crítico (Critical Point Dryer BAL-TEC CPD 030, Liechtenstein), tendo como fluido de transição o CO₂ líquido. Depois, as amostras foram metalizadas com uma camada de 25 nm de ouro em equipamento metalizador (SputterCoater BAL-TEC SCD 030, Liechtenstein) e então, visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo JSM 6060, Alemanha) a 10 kV, seguindo a metodologia de Silveira (1998). As amostras testadas foram (1) vidro com

Salmonella aderida (2) vidro com *Salmonella* aderida e após a ação antimicrobiana de carvacrol livre (3) vidro com *Salmonella* aderida e após a ação antimicrobiana de carvacrol encapsulado em lipossoma.

2.13 Análise Estatística

Foi realizada análise estatística dos resultados obtidos através das análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de 95% de confiança ($p < 0,05$), utilizando o *Software* Statistica 12.0 (STATSOFT Inc., Tulsa, USA).

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização dos lipossomas

Timol e carvacrol foram encapsulados em lipossomas visando aumentar a estabilidade física e a bioatividade dos compostos, minimizando problemas de interação com o meio ambiente e evitando problemas quanto à hidrofobicidade, volatilidade e fortes características organolépticas (Donsì et al., 2011; Li et al., 2015).

Os resultados da caracterização, realizada imediatamente após a encapsulação, podem ser vistos na Tabela 2. O pH foi de 6,0 para todas as soluções antimicrobianas, mostrando que as soluções são levemente ácidas. Os lipossomas contendo timol (TL), carvacrol (CL) e timol e carvacrol em conjunto (TCL), apresentaram diâmetro médio apropriado, de acordo com De La Torre & De Pinho (2015), que afirmam que lipossomas são vesículas microscópicas e possuem diâmetros médios variando entre 100 nm e 1 μ m. E ainda, estão consistentes com Schaffazick, Guterres, De Lucca Freitas, & Pohlmann (2003), que determinam que nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, devem apresentar diâmetros médios entre 100 e 300 nm.

A polidispersidade, que indica a distribuição de tamanhos na suspensão, está de acordo com Hoeller, Sperger, & Valenta (2009), já que valores próximos a 0,25 indicam uniformidade entre os tamanhos das partículas e, portanto, provável estabilidade das soluções.

O potencial zeta indica as cargas superficiais da suspensão. As partículas encapsuladas que possuem valores de potencial zeta maiores que +30 mV ou menores que -30 mV têm maior estabilidade eletrostática (De La Torre & De Pinho, 2015; Mozafari et al., 2008; Müller, 1996). Nesse estudo, o potencial zeta foi negativo para todas as amostras e de

aproximadamente -30 mV, demonstrando a estabilidade das soluções, condição de extrema importância para a aplicação tecnológica.

3.2 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação depende da composição da solução a ser encapsulada, da proporção e da sinergia entre os compostos utilizados (Chapal, 2017). Neste estudo, a eficiência de encapsulação dos lipossomas foi de aproximadamente 99% para todos os antimicrobianos (Tabela 1). Baranauskaite et al. (2018) encontraram valores de eficiência de encapsulação variando entre 40,23 e 67,4% para lipossomas de soluções etanólicas com extrato de carvacrol e Chapal (2017) encontrou eficiência de encapsulação de 80,9% para um sistema lipossomal de uma suspensão aquosa de eugenol, ambos utilizando a técnica de hidratação do filme lipídico exposta por Bangham, Standish, & Watkins (1965). Já, Malheiros et al. (2010) encontraram eficiência de encapsulação de 94,12% para nisina em lipossomas preparados por hidratação do filme lipídico, usando banho em ultrassom. Ephrem, Greige-Gerges, Fessi, & Charcosset (2014) conseguiram aproximadamente 99% de eficiência de nanocápsulas de óleo essencial de alecrim, pelo método de nanoprecipitação. É importante destacar que, embora todos esses estudos tenham utilizado a técnica de hidratação do filme para a formação dos lipossomas, os compostos ativos, o lipídeo e a técnica de avaliação da eficiência de encapsulação foram diferentes. Portanto, é esperado que a eficiência de encapsulação apresente resultados diferentes em cada estudo desenvolvido. A natureza do composto ativo pode influenciar fortemente a eficiência de encapsulação através de suas características físico-químicas, interações eletrostáticas e hidrofobicidade (Calvo, Vila-Jato, & Alonso, 1996).

Tabela 1 – Caracterização dos lipossomas e eficiência de encapsulação

Parâmetro	TL	CL	TCL
Diâmetro médio (nm)	237,40 ^a ± 3,96	230,90 ^a ± 47,38	267,75 ^a ± 10,82
PDI	0,31 ^a ± 0,03	0,26 ^a ± 0,04	0,24 ^a ± 0,01
Potencial zeta (mV)	-30,30 ^a ± 0,07	-31,20 ^a ± 0,57	-30,70 ^a ± 0,42
pH	6,00 ^a	6,00 ^a	6,00 ^a
Eficiência de	99,87 ^a ± 0,06	99,27 ^a ± 0,27	99,01 ^a ± 0,85

encapsulação (%)

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

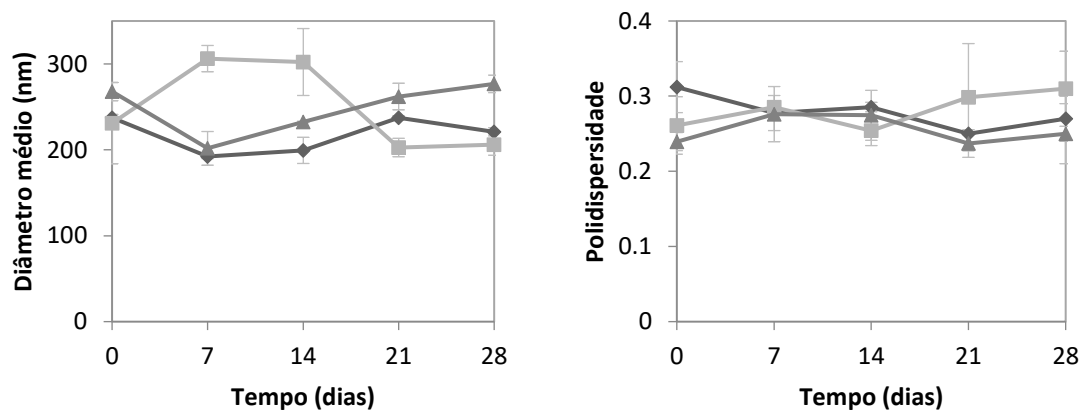
TL: Lipossomas com timol

CL: Lipossomas com carvacrol

TCL: Lipossomas com timol e carvacrol

3.3 Estabilidade dos lipossomas

Os lipossomas desenvolvidos foram mantidos sob refrigeração (4 °C) e avaliados quanto ao tamanho, PDI e potencial zeta por 28 dias (Figura 1). Os resultados mostraram que, em relação ao diâmetro médio, todos os compostos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com o passar do tempo. Apesar disso, não foi visualizada precipitação e todos os compostos permaneceram entre 200 e 300 nm, o que está de acordo com Schaffazick et al. (2003), que descreve nanopartículas com sistemas com tamanho entre 100 e 300 nm. Em relação ao PDI e potencial zeta, nenhum dos antimicrobianos apresentou diferença significativa ao longo do tempo ($p > 0,05$), demonstrando estabilidade por pelo menos 28 dias, quando armazenados a 4° C. Desta forma, apesar do diâmetro médio ter variações com o passar do tempo, ainda manteve-se em escala nanométrica, e os lipossomas desenvolvidos ainda podem ser considerados estáveis por pelo menos 28 dias, uma vez que o PDI manteve-se estável entre 0,2 e 0,3 e o potencial zeta demonstrou a existência de uma alta repulsão entre as partículas, não as deixando aglomerar.



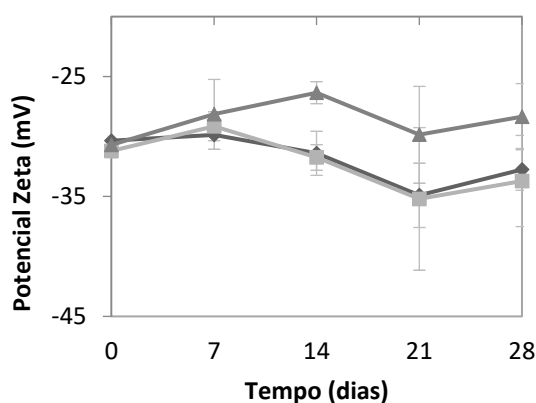


Figura 1 – Estabilidade dos lipossomas quanto ao diâmetro médio (nm), polidispersidade e potencial zeta (mV), durante estocagem a 4 °C. TL (◇), CL (□) e TCL (Δ). Valores de média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

3.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas mínimas foram determinadas *in vitro* para os compostos antimicrobianos livres e encapsulados em lipossomas, frente ao *pool* de *Salmonella* (Tabela 2). O controle positivo com a solução alcoólica 20% (v/v) não inibiu o *pool* microbiano, demonstrando que a ação é devido aos antimicrobianos naturais presentes nas soluções.

Resultados semelhantes de CIM e CBM foram obtidos por Trevisan et al. (2018), que encontraram CIM e CBM de 312 µg/mL para carvacrol, diluído em Caldo Mueller-Hinton e etanol a 0,5% (v/v), contra *S. Typhimurium* ATCC 14028. As concentrações dos compostos livres também estão de acordo com Miladi et al. (2017), que observaram valores de CIM e CBM que variaram de 64 a 512 µg/mL para carvacrol e de 32 a 128 µg/mL para timol, frente a 12 linhagens de *S. Typhimurium*, utilizando soluções diluídas em etanol. Gavaric, Mozina, Kladar, & Bozin (2015) também avaliaram as concentrações de CIM, encontrando 250 µg/mL para timol e 125 µg/mL para carvacrol frente a *Salmonella* Infantis MJ 106, isolada de carne de frango.

Os lipossomas apresentaram valores maiores de CIM e CBM em comparação aos antimicrobianos livres, assim como em outros estudos. Isso pode ser explicado por uma liberação mais lenta dos antimicrobianos encapsulados.

As CIM's entre 50-500 µg/mL são consideradas de elevada atividade antimicrobiana, as CIM's entre 600-1500 µg/mL são consideradas de moderada atividade antimicrobiana e as

CIM's acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas de fraca atividade antimicrobiana (Sartoratto et al., 2004). Com isso, as soluções antimicrobianas livres e as soluções de TC e CL podem ser classificadas como de alta atividade e somente a solução TCL de moderada atividade.

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima de timol, carvacrol e mistura de timol e carvacrol livre e em lipossomas para *pool* de *Salmonella*

Composto	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
Timol	331	663
Carvacrol	331	331
Timol/Carvacrol	331	331
TL	663	1325
CL	663	1325
TCL	1325	1325

TL: Lipossomas com timol

CL: Lipossomas com carvacrol

TCL: Lipossomas com timol e carvacrol

3.5 Cinética de multiplicação de *Salmonella* in vitro

A cinética de multiplicação de *Salmonella* in vitro (Figura 2) na presença de soluções antimicrobianas mostrou a inibição total do *pool* de *Salmonella* já no primeiro tempo de amostragem, tanto para os compostos livres como encapsulados em lipossomas. O controle mostra a população inicial de $4,06 \pm 0,35$ log UFC/mL e a população, após 48 horas a 30°C , atingiu $9,42 \pm 0,17$ log UFC/mL.

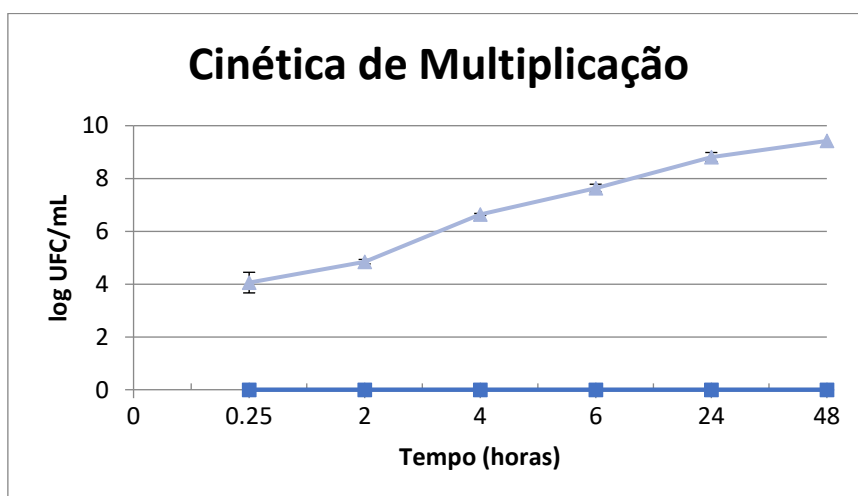


Figura 2 – Cinética de multiplicação de *Salmonella in vitro*. Compostos livres e em lipossomas (□) e controle com solução alcoólica 20% (Δ). Valores das médias ± desvio padrão de três repetições independentes.

3.6 Adesão microbiana e ação antimicrobiana

A presença de LPS na superfície celular de Gram-negativas tende a tornar a célula bacteriana mais hidrofílica e a perda de LPS da superfície celular torna a superfície mais hidrofóbica. Já foi relatado que a bactéria é capaz de alterar as características da superfície celular, como a hidrofobicidade, em função das mudanças no ambiente externo (Araújo et al., 2010). Como o vidro é um material hidrofílico, a adesão de micro-organismos é geralmente menos favorável (Araújo et al., 2010). Mesmo assim, a adesão, após 15 minutos de contato, do *pool* de *Salmonella* na superfície de vidro foi de $5,89 \pm 0,36$ log UFC/cm², a partir de um *pool* com contagem inicial de $8,51 \pm 0,25$ log UFC/mL, cultivado em caldo BHI. Outros estudos encontraram valores parecidos de adesão para outros materiais: 5,5 a 6,5 log CFU/cm² para *Salmonella* em aço inoxidável AISI 304 após 15 minutos de contato (Engel et al., 2017) e 5,7 a 7,34 log CFU/cm² para *S. Typhimurium* em polipropileno após 2 horas de contato (Bayoumi, Kamal, Abd El Aal, & Awad, 2012).

O controle com a solução alcoólica 20% mostrou que a solução não tem ação inibitória contra *Salmonella* e não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle de adesão do *pool* de *Salmonella* na superfície de vidro.

Os resultados de ação das soluções contendo os antimicrobianos naturais livres frente ao *pool* de *Salmonella* (Figura 3) mostram que tanto as soluções de timol, como carvacrol e ambos compostos, nas concentrações de CIM e 2xCIM, inativaram totalmente a população de micro-organismos aderida ao coupon de vidro ($5,89 \pm 0,36$ log UFC/cm²). Já, para a concentração de $\frac{1}{2}$ CIM, a população de micro-organismos aderida não teve redução significativa ($p > 0,05$) para timol e carvacrol, tendo somente redução significativa ($p < 0,05$) de 1,04 log UFC/cm² quando os compostos são utilizados em conjunto, demonstrando um possível efeito sinérgico entre eles, como demonstram alguns estudos (Du et al., 2015; Jesus et al., 2015; Moon & Rhee, 2016).

Os resultados mostraram que 1 minuto de contato foi suficiente para inativar toda a população de micro-organismos com as concentrações de CIM e 2xCIM para os antimicrobianos timol, carvacrol e ambos utilizados livremente.

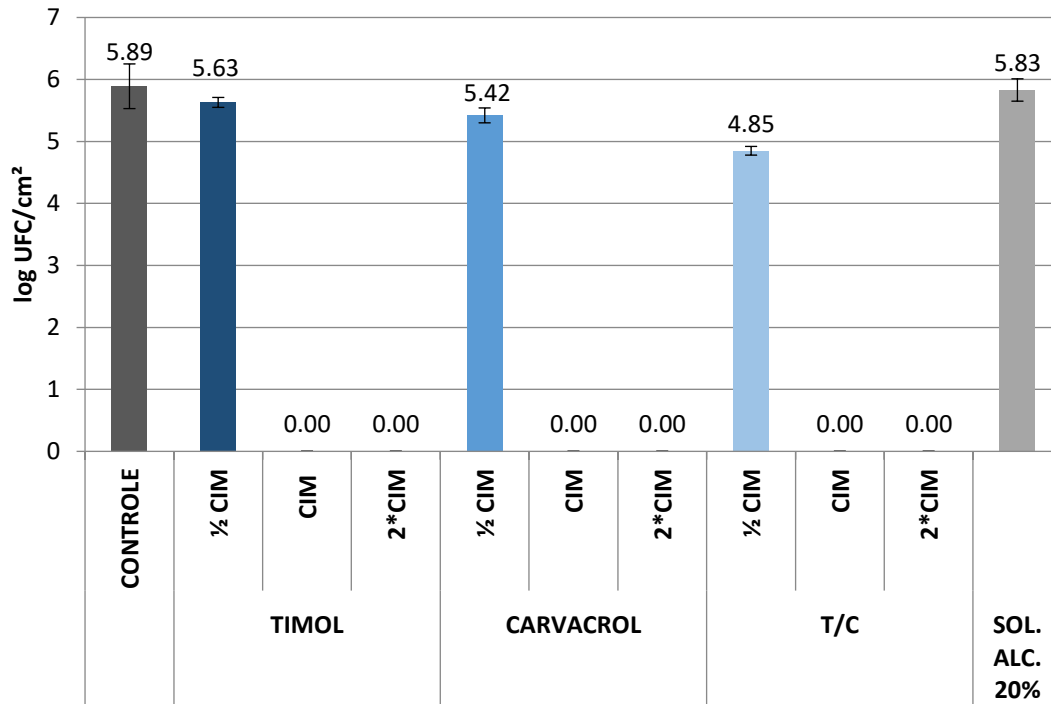


Figura 3 – Inibição de *Salmonella* em superfície de vidro utilizando solução alcoólica 20% com timol (CIM = 331 µg/mL), carvacrol (CIM = 331 µg/mL) ou uma mistura de timol e carvacrol em conjunto (CIM = 331 µg/mL) livres após 1 minuto de contato. O controle é população do *pool* de *Salmonella* que aderiu à superfície de vidro e a solução alcoólica 20% é a solução pura, sem antimicrobianos.

Os resultados de ação das soluções contendo os antimicrobianos naturais encapsulados em lipossomas frente ao *pool* de *Salmonella* (Figura 4) mostram que tanto as soluções de timol, como carvacrol e ambos os compostos, na concentração de 2xCIM, inativaram totalmente a população de micro-organismos aderida ao coupon de vidro ($5,89 \pm 0,36$ log UFC/cm²).

Já, para a concentração da CIM, houve redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle ($5,89 \pm 0,36$ log UFC/cm²) com todos os antimicrobianos. Não houve diferença significativa entre eles ($p > 0,05$), sendo que TL reduziu a população em 4,03 log UFC/cm², CL reduziu a população em 3,79 log UFC/cm² e TCL reduziram a população em 3,94 log UFC/cm²,

E, para a concentração da 1/2 CIM, a população de micro-organismos aderida não teve redução significativa ($p > 0,05$) para TL, tendo somente redução significativa ($p < 0,05$) de 1,93 log UFC/cm² para CL e de 1,58 log UFC/cm² TCL. Comparando a redução de CL e TCL, não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

Os resultados mostraram que 1 minuto de contato foi suficiente para inativar toda a população de micro-organismos com a concentração de 2xCIM para TL, CL e TCL. Além

disso, a redução foi significativa para todos os compostos na concentração da CIM e para carvacrol e ambos os compostos para a concentração de ½ CIM.

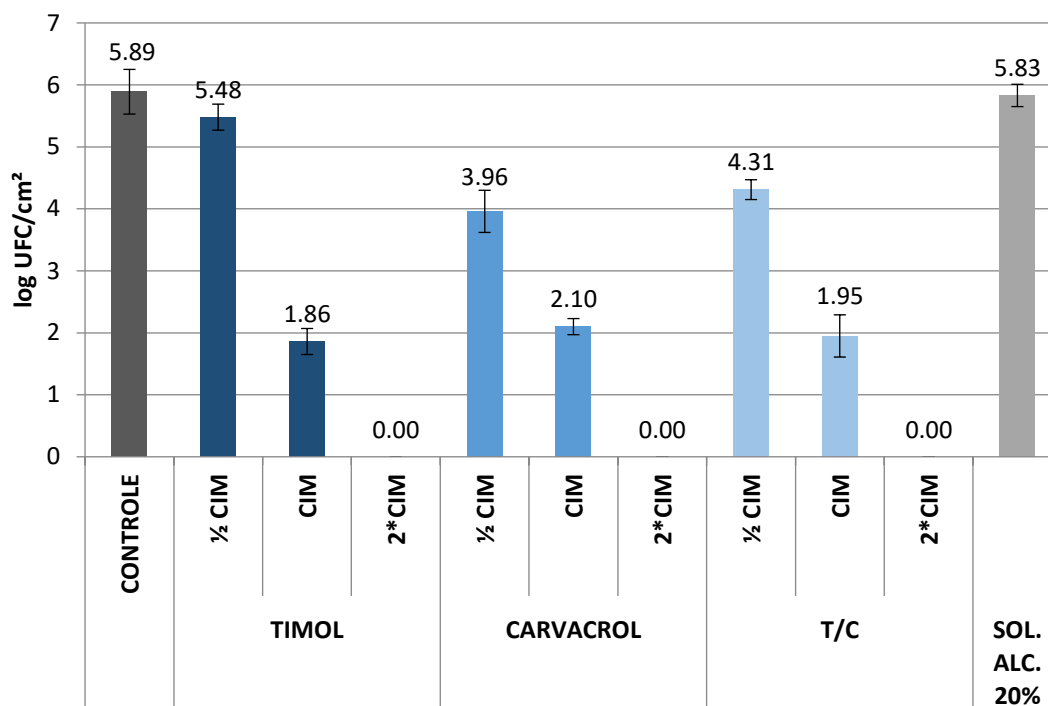


Figura 4 – Inibição de *Salmonella* em superfície de vidro utilizando TL (CIM = 663 µg/mL), CL (CIM = 663 µg/mL) e TCL (CIM = 1325 mg/mL) após 1 minuto de contato. O controle é população do *pool* de *Salmonella* que aderiu à superfície de vidro e a solução alcoólica 20% é a solução pura, sem antimicrobianos.

3.7 Capacidade de inibição da adesão de *Salmonella* em superfície de vidro

Visando avaliar se os compostos desenvolvidos seriam capazes de prevenir a posterior adesão microbiana, foi preparado um filme antimicrobiano na superfície de vidro seguido de imersão em solução contendo 10^4 UFC/mL do *pool* de *Salmonella*. Os resultados mostraram que o filme controle, sem composto antimicrobiano e com somente solução alcoólica 20% (v/v), permitiu a aderência de $3,87 \pm 0,21$ log UFC/cm² na superfície de vidro. Já, o filme preparado com timol, carvacrol e ambos os compostos livres e também, TL, CL e TCL, foi capaz de prevenir a adesão de *Salmonella*, já que as contagens foram abaixo do limite de detecção da técnica utilizada.

3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Utilizando o MEV foi possível observar as colônias de *Salmonella* aderidas na superfície de vidro (Figura 5A). As células tratadas com a solução antimicrobiana de carvacrol livre (Figura 5B) encontravam-se aglomeradas e tinham uma aparência murcha, comparadas com as células não tratadas, do mesmo modo que Trevisan et al. (2018) e Di

Pasqua et al. (2007), que encontraram alterações nas estruturas das células após tratamento com carvacrol.

O tratamento com solução antimicrobiana de CL (Figura 5C) mostrou as estruturas dos lipossomas espalhadas pela superfície do vidro, em escala nanométrica, consistente com a caracterização físico-química encontrada nesse estudo. A ação da solução antimicrobiana de CL sobre o *pool* de *Salmonella* (Figura 5D) mostra o mecanismo de ação proposto para o carvacrol contra o envelope celular externo, interagindo com a membrana (Di Pasqua et al., 2007). Também é possível ver a célula de *Salmonella* tentando aparentemente se defender do antimicrobiano, utilizando suas fímbrias e flagelo para alcançar o substrato.

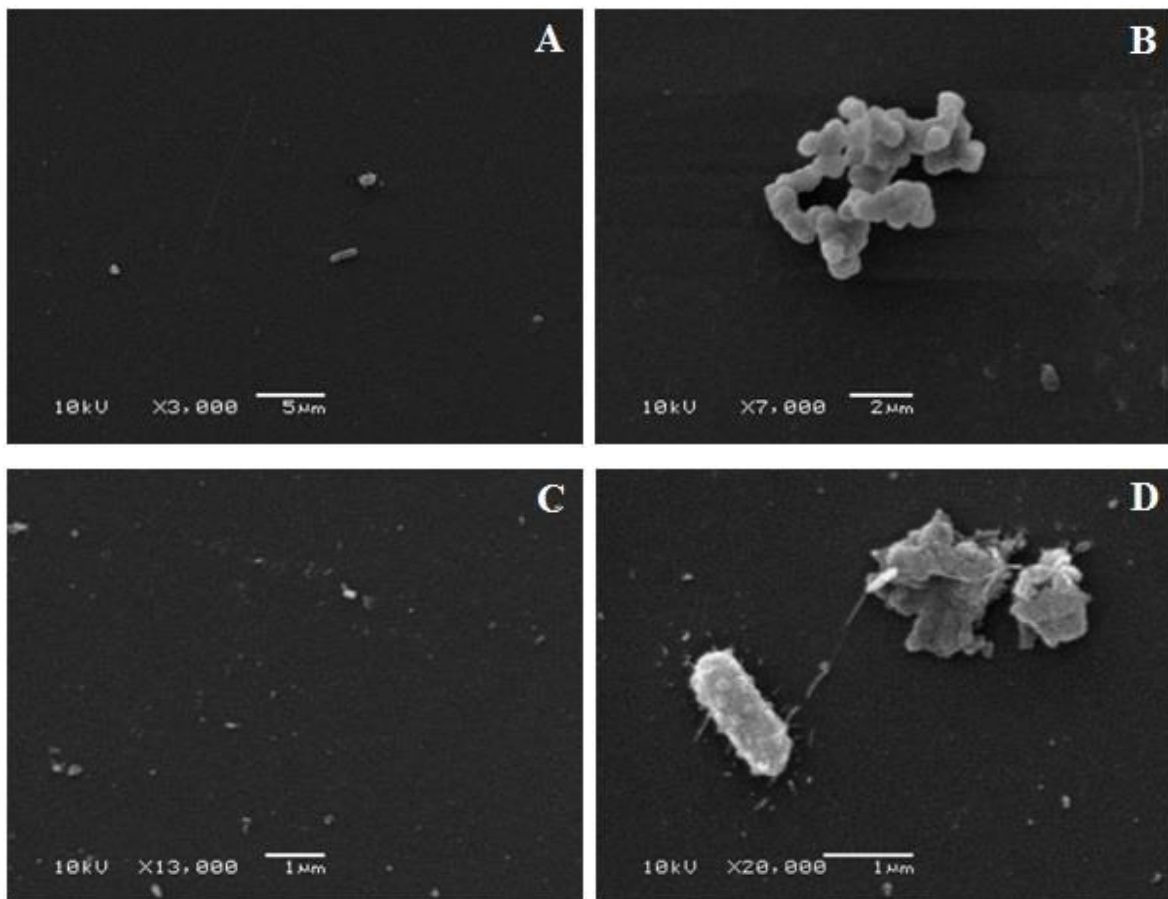


Figura 5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a 10 kV do controle de adesão do *pool* de *Salmonella* com aumento de 3000X (A) e 7000X (B) sobre a superfície de vidro. Solução antimicrobiana de CL espalhados sobre a superfície de vidro (C) e ação da ação antimicrobiana de CL sobre a *Salmonella* (D).

4. Conclusões

Com a realização deste estudo, foi possível concluir que TL, CL e TCL apresentaram alta eficiência de encapsulação, diâmetro médio adequado, baixo índice de polidispersidade,

potencial zeta negativo e foram estáveis durante 28 dias, na temperatura de 4 °C, evidenciando sua aplicabilidade tecnológica. Todas essas soluções foram capazes de reduzir e inativar a população de *Salmonella* aderida na superfície de vidro e podem ser uma alternativa interessante para a liberação controlada de agentes antimicrobianos para utilização em indústrias de alimentos e serviços de alimentação. A MEV mostrou a *Salmonella* aderida ao vidro e a ação de CL. Pode-se sugerir que as soluções antimicrobianas sejam utilizadas como alternativa aos desinfetantes convencionais para controlar a multiplicação microbiana em locais de processamento de alimentos. No entanto, são necessários mais estudos para que elas possam ser regulamentadas pelos órgãos oficiais.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Referências Bibliográficas

- Araújo, E. A., Andrade, N. J. De, Carvalho, A. F. De, Ramos, A. M., & Silva, C. A. de S. (2010). Aspectos coloidais da adesão de microrganismos. *Quim. Nova*, 33(9), 1940–1948. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000900022>
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13, 238–252. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
- Baranauskaite, J., Duman, G., Corapcioğlu, G., Baranauskas, A., Taralp, A., Ivanauskas, L., & Bernatoniene, J. (2018). Liposomal Incorporation to Improve Dissolution and Stability of Rosmarinic Acid and Carvacrol Extracted from Oregano (*O. onites* L.). *BioMed Research International*, 1–10. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2018.1535441>
- Bayoumi, M. A., Kamal, R. M., Abd El Aal, S. F., & Awad, E. I. (2012). Assessment of a regulatory sanitization process in Egyptian dairy plants in regard to the adherence of some food-borne pathogens and their biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 158(3), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.021>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

- CAC. (2007). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods e CAC/GL 61-2007. Retrieved September 16, 2018, from http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10740/CXG_061e.pdf
- Calvo, P., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1996). Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 530–536. <https://doi.org/10.1021/js950474+>
- Ceuppens, S., Johannessen, G. S., Allende, A., Tondo, E. C., El-Tahan, F., Sampers, I., ... Uyttendaele, M. (2015). Risk factors for *Salmonella*, shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* occurrence in primary production of leafy greens and strawberries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 9809–9831. <https://doi.org/10.3390/ijerph120809809>
- Chapal, J. C. A. (2017). *Desenvolvimento e caracterização de um sistema lipossomal para a encapsulação de eugenol*. Viçosa. Retrieved from <https://www3.dti.ufv.br/bbt/ficha/Validarficha>
- Chia, T. W. R., Goulter, R. M., McMeekin, T., Dykes, G. A., & Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26(8), 853–859. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.012>
- De La Torre, L. G., & De Pinho, S. C. (2015). Lipid Matrices for Nanoencapsulation in Food: Liposomes and Lipid Nanoparticles. In Springer (Ed.), *Food Engineering Series* (pp. 99–143). https://doi.org/10.1007/978-3-319-13596-0_7
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4863–4870. <https://doi.org/10.1021/jf0636465>
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1908–1914. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.003>
- Doyle, M. P. (2006). Dealing with antimicrobial resistance. *Food Technology*, 60(8), 22–29. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000390.pub2>
- Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., & Guo, Y. (2015). In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 58. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0055-7>
- EFSA. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 14(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>.
- Eloy, J. O., Claro de Souza, M., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J., & Marchetti, J. M. (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance

encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 345–363. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.029>

Engel, J. B., Heckler, C., Tondo, E. C., Daroit, D. J., & da Silva Malheiros, P. (2017). Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 252, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.003>

Ephrem, E., Greige-Gerges, H., Fessi, H., & Charcosset, C. (2014). Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *Journal of Microencapsulation*, 31(8), 746–753. <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.918669>

FDA. (2018). *CFR - Code of Federal Regulations Title 21: Part 182 – Substances Generally Recognized as Safe: Sec. 182.20. Essential Oils, Oleoresins (Solvent-Free), and Natural Extractives (Including Distillates)*. (FDA, Ed.). Silver Spring.

Garcia, L. S., & Isenberg, H. D. (2010). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. (A. Press, Ed.) (3rd ed.). Washington. <https://doi.org/10.1128/9781555817435>

Gavaric, N., Mozina, S. S., Kladar, N., & Bozin, B. (2015). Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils, Thymol and Carvacrol and Their Possible Synergism. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 18(4), 1013–1021. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.971069>

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028>

Hoeller, S., Sperger, A., & Valenta, C. (2009). Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 370, 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.11.014>

Jesus, F. P. K., Ferreiro, L., Bizzi, K. S., Loreto, S., Pilotto, M. B., Ludwig, A., ... Santurio, J. M. (2015). In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. *Journal de Mycologie Medicale*, 25(2), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.10.023>

Li, W., Chen, H., He, Z., Han, C., Liu, S., & Li, Y. (2015). Influence of surfactant and oil composition on the stability and antibacterial activity of eugenol nanoemulsions. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.012>

Malheiros, P. da S., Micheletto, Y. M. S., Silveira, N. P. da, & Brandelli, A. (2010). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43(4), 1198–1203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.015>

Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., & Chaieb, K. (2017). Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance

modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microbial Pathogenesis*, *104*, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.012>

Miles, A. A., & Misra, S. S. (1938). Estimation of the bactericidal power of the bloods. *Journal of Hygiene*, *38*(6), 732–749.

Ministério da Saúde. (2018). Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Retrieved September 20, 2018, from http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf

Moon, H., & Rhee, M. S. (2016). Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. *International Journal of Food Microbiology*, *217*, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.009>

Mozafari, M. R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, *18*, 309–327. <https://doi.org/10.1080/08982100802465941>

Müller, R. . (1996). *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*. (W. V. mbH Stuttgart., Ed.), Paperback APV. Stuttgart.

NCCLS. (2002). *M27-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. (N. C. for C. L. Standards, Ed.) (2nd ed.). Wayne. Retrieved from www.nccls.org

Peixoto-Neves, D., Silva-Alves, K. S., Gomes, M. D. M., Lima, F. C., Lahlou, S., Magalhães, P. J. C., ... Leal-Cardoso, J. H. (2010). Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, *24*, 341–350. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00768.x>

Prouty, A. M., & Gunn, J. S. (2003). Comparative Analysis of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Biofilm Formation on Gallstones and on Glass. *Infection and Immunity*, *70*, 2640–2649. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.12.7154-7158.2003>

Rahimpour, Y., & Hamishehkar, H. (2012). Liposomes in cosmeceutics. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *9*(4), 443–455. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.666968>

Rossoni, E. M. M., & Gaylarde, C. C. (2000). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, *61*(1), 81–85. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00369-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00369-X)

Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *35*, 275–280. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>

Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., De Lucca Freitas, L., & Pohlmann, A. R. (2003).

Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26(5), 726–737. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>

Silveira, M. (1998). Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: Souza, W. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Rio de Janeiro. *Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica*, 33-44.

Sinde, E., & Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17(4), 439–447. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0339>

Szczepanski, S., & Lipski, A. (2013). Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control*, 36(1), 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.023>

Tondo, E. C., & Bartz, S. (2017) *Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos*. Sulina, Porto Alegre.

Trevisan, D. A. C., Silva, A. F. da, Negri, M., Abreu Filho, B. A. de, Machinski Junior, M., Patussi, E. V., ..., & Mikcha, J. M. G. (2018). Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella* enterica serotype Typhimurium. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1). <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000117229>

Xue, R., Shi, H., Ma, Y., Yang, J., Hua, B., Inniss, E. C., ... Eichholz, T. (2017). Evaluation of thirteen haloacetic acids and ten trihalomethanes formation by peracetic acid and chlorine drinking water disinfection. *Chemosphere*, 189, 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.059>

Zylberberg, C., & Matosevic, S. (2016). Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Delivery*, 23, 3319–3329. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1177136>

5. CONCLUSÕES

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

- A mistura dos antimicrobianos nisina, carvacrol e timol, a interação entre timol e carvacrol e a interação entre nisina e carvacrol demonstraram efeito sinérgico frente a *S. aureus*.
- A mistura de timol e carvacrol demonstrou efeito sinérgico frente a *S. Enteritidis* SE86.
- Os antimicrobianos encapsulados em lipossomas apresentaram alta eficiência de encapsulação, diâmetro médio adequado, baixo índice de polidispersidade, potencial zeta negativo e foram estáveis durante 28 dias, na temperatura de 4 °C, evidenciando sua aplicabilidade tecnológica
- As soluções antimicrobianas podem ser uma alternativa interessante para a liberação controlada de agentes antimicrobianos para utilização em indústrias de alimentos e serviços de alimentação e pode-se sugerir a utilização como alternativa aos desinfetantes convencionais para controlar a multiplicação microbiana em locais de processamento de alimentos. No entanto, são necessários mais estudos para que elas possam ser regulamentadas pelos órgãos oficiais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, Teerã, v. 35, n. 1, p. 177-183, 2014.
- AGARWAL, R. K. *et al.* Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. **International Food Research Journal**, Izzatnagar, v. 18, n. 4, p. 1493-1498, 2011.
- AHMAD, A. *et al.* Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against candida. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, New Delhi, v. 30, p. 41–50, 2011.
- ALVES, F. C. B. **Ação antibacteriana de associações de antimicrobianos: nisina, óleos essenciais e compostos majotitários.** 2014. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- ANDRADE, B. F. M. T. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, São Paulo, v.1, n. 26, p. 34-40. 2014.
- ARAÚJO, E. A. *et al.* Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, Viçosa, v. 33, n. 9, p. 1940–1948, 2010.
- ASAO, T. *et al.* An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, Osaka, v. 130, n. 1, p. 33–40, 2003.
- BALCIUNAS, E. M. *et al.* Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 134–142, 2013.
- BANGHAM, D.; STANDISH, M.; E WATKINS, J. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 238- 252, 1965.
- BARANAUSKAITE, J. *et al.* Liposomal Incorporation to Improve Dissolution and Stability of Rosmarinic Acid and Carvacrol Extracted from Oregano (*O. onites L.*). **BioMed Research International**, Kaunas, p. 1–10, 2018.
- BARBOSA, L. N. *et al.* Essential Oils Against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria in Minced Meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, São Paulo, v. 6, n. 6, p. 725–728, 2009.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, Ouagadougou, v. 17, p. 3989–4006, 2012.

BAYOUMI, M. A. et al. Assessment of a regulatory sanitization process in Egyptian dairy plants in regard to the adherence of some food-borne pathogens and their biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Zagazig, v. 158, n. 3, p. 225–231, 2012.

BEN ABDALLAH, F. et al. Detection of cell surface hydrophobicity, biofilm and fimbriae genes in *Salmonella* isolated from Tunisian clinical and poultry meat. **Iran Journal Public Health**, Monastir, v. 43, n. 4, p. 423-431, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Secretário de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27, de 18 de março de 1996. Aprova o regulamento técnico sobre embalagens e equipamentos de vidro e cerâmica em contato com alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v. 134, n. 248, 20 mar. 1996. Seção I, p. 27834-27841.

BROWN, A.F. et al. *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. **Frontiers in Immunology**, Dublin, v. 4, n. 507, 2014.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, Utrecht, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

CAC. *Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods e CAC/GL 61-2007*. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10740/CXG_061e.pdf>. Acesso em: 16 set. 2018.

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

CAPALONGA, R. et al. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. **The Journal Of Infection In Developing Countries**, Porto Alegre, v. 8, n. 7, p. 811-817, 2004.

CEUPPENS, S. et al. Risk factors for Salmonella, shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* occurrence in primary production of leafy greens and strawberries. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Ghent, v. 12, n. 8, p. 9809 – 9831, 2015.

CHAE, M. S. et al. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, Guelph, v. 23, n. 3, p. 250–259, 2006.

CHAPAL, J. C. A. **Desenvolvimento e caracterização de um sistema lipossomal para a encapsulação de eugenol**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CHEN, H.; ZHONG, Q. Lactobionic acid enhances the synergistic effect of nisin and thymol against *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth and milk. **International Journal of Food Microbiology**, Knoxville, v. 260, p. 36–41, 2017.

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

CHORIANOPOULOS, N. G. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Athens, v. 104, n. 6, p. 1586–1596, 2008.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, New Jersey, v. 71, n. 1, p. 1–20, 2001.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Bozeman, v. 49, p. 711–745, 1995.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, Cork, v. 3, n. 10, p. 777–788, 2005.

D'AMATO, S. et al. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. **Food Control**, Teramo, v. 86, p. 126-137, 2018.

DE ARAUZ, L. J. et al. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science & Technology**, São Paulo, v. 20, n. 3-4, p. 146–154, 2009.

DE LA TORRE, L.; DE PINHO, S. Lipid Matrices for Nanoencapsulation in Food: Liposomes and Lipid Nanoparticles. In: HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; GUTIÉRRES-LÓPEZ, G. (Org) **Food Nanoscience and Nanotechnology**. Food Engineering Series. Springer, Cham. 2015.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, Ribeirão Preto, n. 18, p. 191-208, 2002.

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

DEEGAN, L. H. et al. P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, Cork, v. 16, n. 9, p. 1058–1071, 2006.

DENIS, N. et al. Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada. **Food Control**, Ottawa, v. 67, p. 225-234, 2016.

DI PASQUA R. et al. Toxicidade de membrana de compostos antimicrobianos de óleos essenciais. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Gloucestershire, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, 2007.

- DONSÌ, F. et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, Salerno, v. 44, n. 9, p. 1908 – 1914, 2011.
- DOYLE, M. P. Dealing with antimicrobial resistance. **Food Technology**, Griffin, v. 60, n. 8, p. 22 – 29, 2006.
- DU, E. et al. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal Animal Science Biotechnology**, Beijing, v. 6, p. 58, 2015.
- DUPONT, H. L. The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin. **Clinical Infectious Diseases**, Houston, v. 45, n. 10, p. 1353-1361, 2007.
- EFSA The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. **EFSA Journal**, Parma, v. 13, n. 12, 2016.
- ELOY, J.O. et al. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Ribeirão Preto, v. 123, p. 345 – 363, 2014.
- ENGEL, J. et al. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Porto Alegre, v. 252, p. 18–23, 2017.
- EPHREM, E. et al. Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. **Journal of Microencapsulation**, Lyon, v. 31, n. 8, p. 746–753, 2014.
- ETTAYEBI, K.; EL YAMANI, J.; ROSSI-HASSANI, B. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, Fez, v. 183, n. 1, p. 191–195, 2000.
- FDA. CFR - Code of Federal Regulations Title 21: Part 182 – Substances Generally Recognized as Safe: Sec. 182.20. *Essential Oils, Oleoresins (Solvent-Free), and Natural Extractives (Including Distillates)*. Silver Spring, MD: FDA, 2018.
- FERNANDES, S. A. et al. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 179-184, 2006.
- FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Medicinal Plants from the Brazilian Savanna with Antibacterial Properties. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, p.1-13. 2014.
- FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J.. The biofilm matrix. *Nature* **Reviews Microbiology**, Duisburg, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.
- FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Tradução por Andréia Bianchini, et al. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607 p.

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

GAVARIC, N., et al. Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils, Thymol and Carvacrol and Their Possible Synergism. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Novi Sad, v. 18, n. 4, p. 1013–1021, 2015.

GIERALTOWSKI, L. et al. National Outbreak of Multidrug Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to a Single Poultry Company. **PLoS ONE**, Atlanta, v. 11, n. 9, p.1-13, 2016.

GILLET, A. et al. Development of a new topical system: Drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. **International Journal of Pharmaceutics**, Liège, v. 380, n. 1-2, p.174-180, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 374-381. 2007.

GUARDA, A. et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, Santiago, v. 146, n. 2, p. 144–150, 2011.

GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal Food Microbiology**, Dublin, v. 124, p. 91 – 97, 2008.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology**, Espoo, v. 60, n. 2-3, p. 153–161, 2000.

HENNEKINNE, J.-A. *Staphylococcus aureus* as a Leading Cause of Foodborne Outbreaks Worldwide. **Staphylococcus aureus**, Maisons-Alfort Cedex, p. 129–146, 2018.

HOELLER, S.; SPERGER, A.; VALENTA, C. Nanoemulsões à base de lecitina: Estudo comparativo da influência de surfactantes não-iônicos e da fitoesfingosina catiônica no comportamento físico-químico e permeação cutânea. **International Journal of Pharmaceutics**, Vienna, v. 370, n. 1-2, p. 181-186, 2009.

JESUS, F. et al. In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, Porto Alegre, v. 25, n. 2, p. 89-93, 2015.

KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. **BioMed Research International**, Kent, p. 1–9, 2014.

KAMARUZZAMAN, N. F. et al. Targeting the Bacterial Protective Armour; Challenges and Novel Strategies in the Treatment of Microbial Biofilm. **Materials**, Kelantan, v. 11, n. 9, p. 1-27, 2018.

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

KUAYE, Arnaldo Yoshiteru. **Limpeza e sanitização na indústria de alimentos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017. 323 p. Volume 4.

LAMBERT, R. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Sharnbrook, v. 91, p. 453–462, 2001.

LAPPE, R. et al. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A, EDTA and sodium lactate. **International Journal of Food Microbiology**, Porto Alegre, v. 135, n. 3, p. 312–316, 2009.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 13 ed. Porto Alegre: Artmed. 2016. 800 p.

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

LIU, W.; YE, A.; SINGH, H. Progress in Applications of Liposomes in Food Systems. **Microencapsulation and Microspheres for Food Applications**, Hangzhou, 151–170, 2015.

MALDONADO, A. G. **Ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidos em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: Análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR**. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

MALHEIROS, P. S. et al. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. **Food Research International**, Porto Alegre, v. 43, n. 4, p. 1198 – 1203, 2010.

MARQUES, S. C. et al. Formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável e vidro e sua resistência a alguns sanitizantes químicos selecionados. **Revista Brasileira de Microbiologia**, Lavras, v. 38, n. 3, p. 538-543, 2007.

MARTÍNEZ-GRACIÁ, C. et al. Use of herbs and spices for food preservation: advantages and limitations. **Current Opinion in Food Science**. Murcia, v. 6, p. 38–43.

MATHUR, H. et al. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. **Frontiers in Microbiology**, Cork, v. 8, p. 1205, 2017.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Amherst, v. 51, p. 285–330, 2011.

MEMAR, M. Y. Carvacrol and thymol. **Reviews in Medical Microbiology**, Tabriz, v. 28, n. 2, p. 63–68, 2017.

MEMISI, N. et al. CIP cleaning processes in the dairy industry. **Procedia Food Science**, Subotica, v. 5, p. 184 – 186, 2015.

MILADI, K. et al. Nanoprecipitation process: from particle preparation to in vivo applications. In: VAUTHIER, C.; PONCHEL, G. (Org.). **Polymer Nanoparticles for Nanomedicines**. Cham: Springer, 2016. P. 17–53.

MILADI, H. et al. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. **Microbial Pathogenesis**, Monastir, v. 104, p. 56–63, 2017.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. Estimation of the bactericidal power of the bloods. **Journal of Hygiene**, London, v. 38, n. 6, p. 732 – 749, 1938.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017>> Acesso em: 20 set. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil*, 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>> Acesso em: 16 set. 2018.

MOON, H.; RHEE, M. S. Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. **International Journal of Food Microbiology**, Seoul, v. 217, p. 35-41, 2016.

MOZAFARI, M. R. et al. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Palmerston North, v. 86, n. 13, p. 2038-2045, 2006.

MOZAFARI, M. R. et al. Nanoliposomes and Their 584 Applications in Food Nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, Victoria, v. 18, p. 309 – 327, 2008.

MÜLLER, R.H. Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. **Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart**, 1996.

MURRAY, R. J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. **Internal Medicine Journal**, Perth, v. 2, p. 106 – 119, 2005.

NCCLS. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard – Second Edition. Document M27-A2*. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

OLIVEIRA, F. A.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. **The New Microbiologica**. Porto Alegre, v. 29, p. 49-54, 2006.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Current Opinion in Microbiology**, Bethesda, v. 17, p. 32–37, 2014.

PAJOHI, M.R. et al. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. seed and nisin in a food model. **Journal of Applied Microbiology**, Hamedan, v. 110, p 943-951, 2011.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, Thessaloniki, v. 21, p. 465-499, 2003.

PEIXOTO-NEVES D. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Fortaleza, v. 24, p. 341 – 350, 2010.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. DE; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 106–110, 2005.

PERIAGO, P.M. et al. Use of carvacrol and cymene to control growth and viability of *Listeria monocytogenes* cells and predictions of survivors using frequency distribution functions. **Journal of Food Protection**, Cartagena, v. 67, p. 1408–1416, 2004.

PISOSCHI, A. M. et al. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Bucharest, v. 143, p. 922-935, 2018.

PROUTY, A. M.; GUNN, J. S. Comparative Analysis of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Biofilm Formation on Gallstones and on Glass. **Infection and Immunity**, Columbus, v. 71, n. 12, p. 7154–7158, 2003.

QUARENTEI, S. S. et al. Princípios gerais de higienização. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. (Org.) **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. Barueri: Manole, 2015. P. 653–691.

RAHIMPOUR, Y.; HAMISHEHKAR, H. Liposomes in cosmeceutics. **Expert Opinion on Drug Delivery**, Tabriz, v. 9, n. 4, p. 443 – 455, 2012.

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, Kolkata, v.13, p.76-83. 2016.

RODRÍGUEZ, J. et al. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, Granada, v.83, p.41-59, 2016.

ROSA, S. E. S.; COSENZA, J. P.; BARROSO, D. V. Considerações sobre a indústria do vidro no Brasil – Minerais Não Metálicos. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 26, p. 101–138, 2007.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Porto Alegre, v. 61, n. 1, p. 81 – 85, 2000.

SANTANA, E. H. W. et al. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANT'ANA, A. S. et al. Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. **Food Microbiology**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 1235-1237, 2011.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Campinas, v. 35, n. 4, p. 275–280, 2004.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, Porto Alegre, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHLISSELBERG, D. B.; YARON, S. The effects of stainless steel finish on *Salmonella* Typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. **Food Microbiology**, Haifa, v. 35, n. 1, p. 65–72, 2013.

SEBAALY, C. et al. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food Chemistry**, Beirute, v. 178, p. 52–62, 2015.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, Mosciano Sant'Angelo, v. 121, n. 2, p. 123–138, 2008.

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

SHI, C. et al. Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. **Food Control**, Changchun, v. 71, p. 10–16, 2017.

SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W. (Org.) **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998. P. 33-44.

SIMÕES, M. et al. Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, Braga, v. 84, p. 338–345, 2006.

SIMÕES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, Porto, v. 26, p. 746–757, 2009.

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

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizer. **Food Microbiology**, Ourense, v. 17, n. 4, p. 439 – 447, 2000.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, Anseong-si, v. 31, p. 572–585, 2013.

SUPPAKUL, P. et al. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. **Journal of Food Science**, Melbourne, v. 68, p. 408–420, 2003.

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, Bonn, v. 36, n. 1, p. 224 – 229, 2014.

TAYLOR, T. M. et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Knoxville, v. 45, p. 587-605, 2005.

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2017, 263 p.

TREVISAN, D. A. C. et al. Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Maringá, v. 54, n. 1, 2018.

ULTEE, A.; BENNIK, M.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Wageningen, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, 2002.

VAARA, M. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. **Microbiological Reviews**, Helsinki, v. 56, n. 3, p. 395-411, 1992.

WERTHEIM, H. F. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infectious Diseases**, Rotterdam, v. 5, p.751–762, 2005.

WILLIAMS, G. C.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, Dorset, p. 4128–4135, 2003.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H-C. What are Bacterial Extracellular Substances?. In: WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H-C. **Microbial Extracellular Polymeric Substances**. Duisburg: Springer - Berlin Heidelberg, 1999. P. 1–19.

XUE, R. et al. Evaluation of thirteen haloacetic acids and ten trihalomethanes formation by peracetic acid and chlorine drinking water disinfection. **Chemosphere**, Rolla, v. 189, p. 349 – 356, 2017.

ZACHAROF, M. P.; LOVITTB, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria A Review Article. **APCBEE Procedia**, Swansea, v. 2, p. 50-56, 2012.

ZAIDI, M. B. et al. Nontyphoidal *Salmonella* from Human Clinical Cases, Asymptomatic Children, and Raw Retail Meats in Yucatan, Mexico. **Clinical Infectious Diseases**, Yucatan, vol. 42, n. 1, p. 21-28, 2006.

ZHENG, L. et al. Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. **Food Control.**, Anseong-si, v. 32, p. 665- 72, 2013.

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, San Diego, v. 46, p. 39–56, 1943.

ZYLBERBERG, C.; MATOSEVIC, S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery 580 systems and a look at the regulatory landscape. **Drug Delivery**, Florida, v. 23, p. 3319 – 3329, 2016.