

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

Caroline Marques Maders Silva

**ENCAPSULAÇÃO DE CARVACROL EM NANOCÁPSULAS DE MUCILAGEM DE
CHIA E LINHAÇA VISANDO À INIBIÇÃO DE *SALMONELLA* E
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

PORTO ALEGRE

2021

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

Caroline Marques Maders Silva

**ENCAPSULAÇÃO DE CARVACROL EM NANOCÁPSULAS DE MUCILAGEM DE
CHIA E LINHAÇA VISANDO À INIBIÇÃO DE *SALMONELLA* E *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS***

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

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

Coorientadora: MSc. Fabíola Ayres Cacciatore

PORTO ALEGRE

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Caroline Marques Maders
ENCAPSULAÇÃO DE CARVACROL EM NANOCÁPSULAS DE
MUCILAGEM DE CHIA E LINHAÇA VISANDO À INIBIÇÃO DE
SALMONELLA E STAPHYLOCOCCUS AUREUS / Caroline Marques
Maders Silva. -- 2021.

49 f.

Orientadora: Patrícia da Silva Malheiros.

Coorientadora: Fabíola Cacciatore.

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, 2021.

1. Nanocápsulas. 2. Mucilagem. 3. Carvacrol. 4.
Salmonella. 5. Staphylococcus aureus. I. da Silva
Malheiros, Patrícia, orient. II. Cacciatore, Fabíola,
coorient. III. Título.

Caroline Marques Maders Silva

**ENCAPSULAÇÃO DE CARVACROL EM NANOCÁPSULAS DE MUCILAGEM DE
CHIA E LINHAÇA VISANDO À INIBIÇÃO DE *SALMONELLA* E
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

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

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

Coorientadora: MSc. Fabíola Ayres Cacciatore

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Patrícia da Silva Malheiros
Orientadora
Doutora em Microbiologia Agrícola
ICTA/UFRGS

Adriano Brandelli
Doutor em Ciências Químicas
ICTA/UFRGS

Karla Joseane Perez
Doutora em Ciências Biológicas
UERGS

Dedico esse TCC a minha mãe, Simone (in memoriam), que mesmo não estando ao meu lado eu sinto todo seu amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, ao meu pai, Dagoberto, que sempre me deu todo apoio e suporte ao longo de todos esses anos da graduação. Agradeço também as minhas irmãs Paola, Bruna e Camila pelo carinho e compreensão com meus momentos de ausências. Muito obrigada, amo muito vocês!

Agradeço ao meu namorado, Juan Rojas, por me alimentar em dias cansativos de provas, por tantas caronas até as aulas, mas principalmente por sempre estar ao meu lado.

Agradeço a minha orientadora, Prof. Dr^a. Patrícia Malheiros, por cada aprendizado, pela disponibilidade, pelo carinho e apoio durante os anos de iniciação científica e ao longo desse trabalho. Agradeço também a minha coorientadora e amiga Fabíola Cacciatore, pela parceria e ajuda nos experimentos, pela paciência, carinho e apoio em toda a trajetória desse trabalho.

Agradeço também a todos os professores do ICTA que de alguma forma contribuíram para minha formação, em especial ao Prof. Dr. Eduardo Tondo, por me apresentar esse incrível mundo da microbiologia.

Agradeço a todos meus colegas do laboratório de Microbiologia de Alimentos (ICTA/UFRGS), em especial à Daniela Laranja, pelas conversas e risadas diárias.

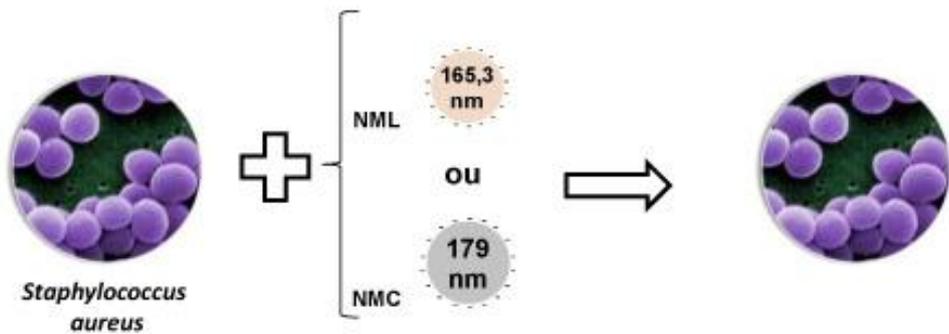
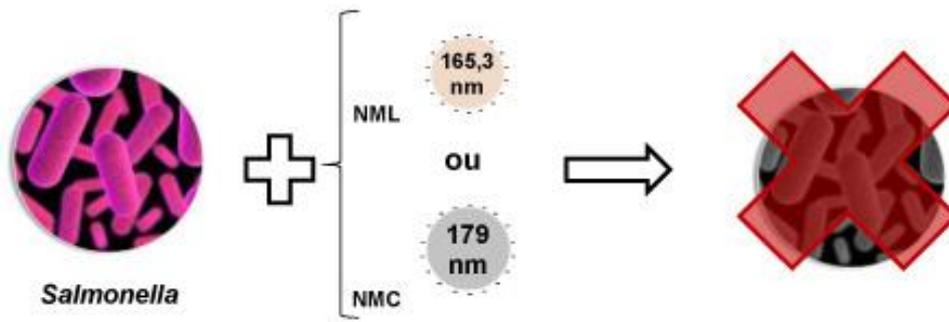
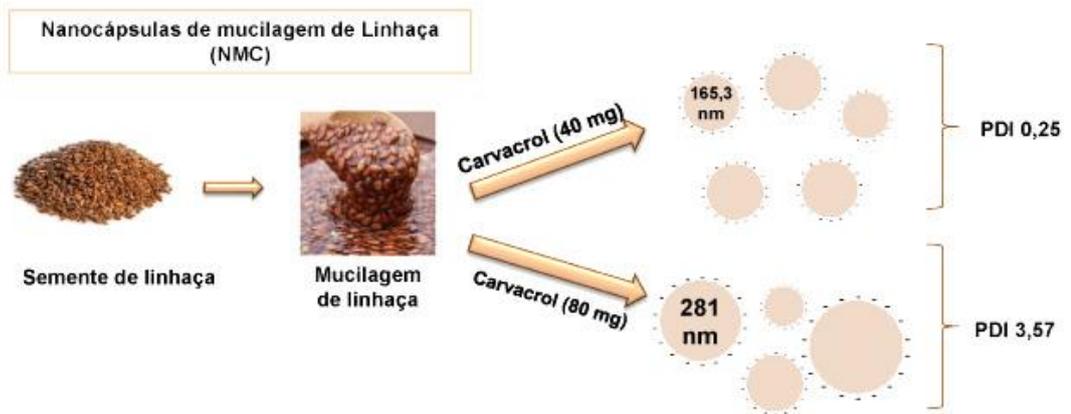
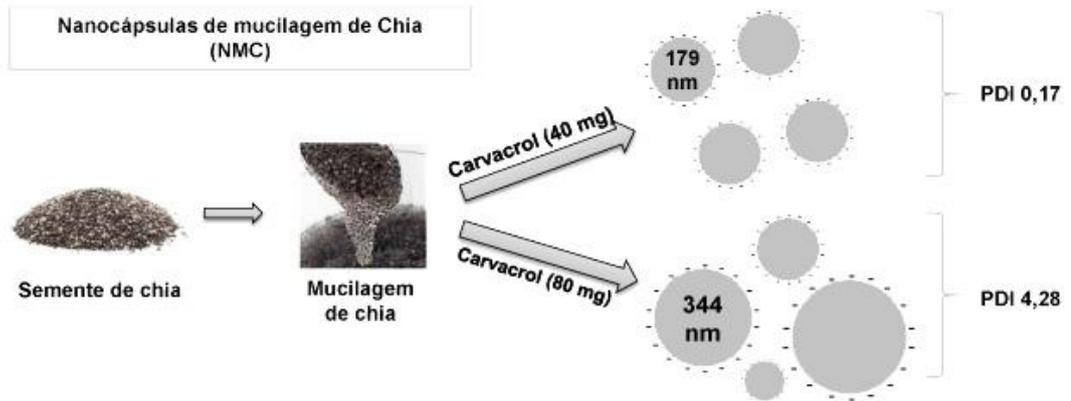
Agradeço aos meus amigos e colegas Vitória Conter, Raissa Ferreira, Halisson Baron e Daniela Vargas por tantas madrugadas de estudos, por não me deixarem desistir mesmo nos momentos mais difíceis. Sem nossas conversas e risadas tudo ficaria mais difícil. Agradeço também à minha amiga Amanda Meggiato, que mesmo distante, sempre me apoiou e torceu por mim.

RESUMO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocasionam grande desafio para indústrias alimentícias e serviços de alimentação, pois representam um grave e frequente problema de saúde pública. No Brasil, dentre os principais microrganismos causadores de surtos alimentares estão *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*. Devido à demanda crescente dos consumidores por alimentos mais saudáveis, diversos antimicrobianos naturais estão sendo estudados, destacando-se o carvacrol (componente do óleo essencial de orégano e tomilho). O objetivo deste trabalho foi encapsular carvacrol em nanocápsulas de mucilagem de chia e linhaça visando à inibição de *Salmonella* e *S. aureus*. Para selecionar a melhor concentração de carvacrol capaz de inibir esses patógenos mantendo as características preconizadas para considerar um produto como nanotecnológico, analisou-se a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e o tamanho de duas formulações distintas (40 mg ou 80 mg de carvacrol) para cada tipo de mucilagem. A formulação que utilizou 80 mg de carvacrol foi eficiente para inibir ambas bactérias, porém houve muita variação de tamanho entre as nanocápsulas (alta polidispersidade - PDI), fator que favorece agregação das partículas, provocando instabilidade do sistema. Então, foi selecionada a formulação usando 40 mg de carvacrol, que apresentou tamanho médio de 179 nm para nanocápsulas de mucilagem de chia (NMC) e 165,3 nm para nanocápsulas de mucilagem de linhaça (NML). Ambas nanocápsulas apresentaram PDI em torno de 0,2 e valores negativos de potencial zeta (NMC: -11,4 mV e NML: -12,6 mV). As NMC e NML apresentaram estabilidade a 4 °C por pelo menos 21 dias e eficiência de encapsulação de 98,65 e 98,02 %, respectivamente. Para inibição de *S. aureus* nenhuma das nanocápsulas (NMC e NML) foram eficientes nas concentrações testadas, porém 1,33 mg/mL de carvacrol livre demonstrou ação bactericida contra esse microrganismo. Por outro lado, os resultados de CBM demonstraram que foi necessária uma menor concentração do composto encapsulado (0,42 mg/mL) para inativar *Salmonella* quando comparado ao carvacrol livre (1,77 mg/mL). Os resultados obtidos sugerem que nanocápsulas de mucilagem de chia e de linhaça carregadas com carvacrol apresentam potencial para aplicação em alimentos visando o controle de *Salmonella*.

Palavras-chaves: Carvacrol. Mucilagem. Nanocápsulas. *Salmonella*. *Staphylococcus aureus*.

RESUMO GRÁFICO



ABSTRACT

Foodborne diseases (FD) pose a major challenge for food industries and food services, as they represent a serious and frequent public health problem. In Brazil, among the main microorganisms causing foodborne outbreaks were *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus*. Due to the growing consumer demand for healthier foods, several natural antimicrobials are being studied, especially carvacrol (component of oregano and thyme essential oil). The objective of this work was to encapsulate carvacrol in chia and flaxseed mucilage nanocapsules to inhibit *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*. To select the best concentration of carvacrol capable of inhibiting these pathogens while maintaining the characteristics recommended to be considered as a nanotechnologic product it was analyzed Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and the size of two different formulations (40mg or 80mg of carvacrol), for each type of mucilage. The formulation that used 80 mg of carvacrol was efficient to inhibiting both bacteria, but there was a wide variation in size between the nanocapsules (high polydispersity - PDI), a factor that favors particle aggregation, causing system instability. So, it was selected the formulation using 40 mg of carvacrol because it showed an average size of 179 nm for chia mucilage nanocapsules (NMC) and 165.3 nm for flaxseed mucilage nanocapsules (NML). Both nanocapsules showed PDI around 0.2 and negative zeta potential values (NMC: -11.4 mV and NML: -12.6 mV). NMC and NML showed stability at 4 °C for at least 21 days and encapsulation efficiency of 98.65 and 98.02 %, respectively. To inhibiting *S. aureus*, none of the nanocapsules (NMC and NML) was efficient at the tested concentrations, but 1.33 mg/mL of free carvacrol demonstrated bactericidal action against this microorganism. On the other hand, the MBC results demonstrated that a lower concentration of the encapsulated compound (0.42 mg/mL) was necessary to inactivate *Salmonella* when compared to free carvacrol (1.77 mg/mL). The results obtained suggest that chia mucilage nanocapsules and flaxseed mucilage nanocapsules loaded with carvacrol have potential for food application to *Salmonella* control.

Keywords: Carvacrol. Mucilage. Nanocapsules. *Salmonella*. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas	24
Figura 2 - Encapsulação de carvacrol em nanocápsulas de mucilagem de chia ou linhaça.....	29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Comparação entre mucilagem de chia e mucilagem de linhaça.....	25
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração Bactericida Mínima de nanocápsulas de mucilagem de chia contendo carvacrol (NMC) e nanocápsulas de mucilagem de linhaça contendo carvacrol (NML) contra os <i>pools</i> de <i>Salmonella</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Tabela 2 - Avaliação do tamanho das nanocápsulas de chia (NMC) e de linhaça (NML) com diferentes concentrações de carvacrol	33
Tabela 3 - Tamanho médio, polidispersidade (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulação das nanocápsulas de mucilagem de chia (NMC) e nanocápsulas de mucilagem de linhaça (NML) contendo carvacrol.....	35
Tabela 4 - Estabilidade das nanocápsulas produzidas com mucilagem de chia (NMC) e das nanocápsulas produzidas com mucilagem de linhaça (NML)	37
Tabela 5 - Concentração bactericida mínima (CBM) de carvacrol livre, nanocápsulas branco (BNMC e BNML), nanocápsulas de mucilagem contendo 40 mg de carvacrol (NMC e NML) contra <i>pools</i> bacterianos de <i>Salmonella enterica</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	38

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Cálculo do índice de polidispersidade (PDI).....	30
Equação 2 – Cálculo da eficiência de encapsulação	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI: Brain Heart Infusion

BP: Agar *Paired Parker*

BNMC: Nanocápsulas branco produzidas com mucilagem de chia

BNML: Nanocápsulas branco produzidas com mucilagem de linhaça

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CLSI: *Clinical Laboratory Standards*

DTA: Doenças transmitidas por alimentos

EE: Eficiência de Encapsulação

FAO: *Food and Agricultural Organization*

FDA: *Food and Drug Administration*

GRAS: *Generally Recognized as Safe*

° C: Graus Celsius

ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mV: Milivolt

nm: Nanômetro

NMC: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de chia

NML: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de linhaça

%: Percentual

PDI: Polidispersidade

PCL: Nanocápsulas poliméricas de poli (ϵ -caprolactona)

rpm: Rotações por minuto

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

XLD: *Xylose Lysine Deoxycholate*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Microrganismos de importância em alimentos	19
3.1.1	<i>Salmonella enterica</i>	19
3.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.2	Antimicrobianos naturais	20
3.2.1	Óleos essenciais.....	21
3.2.2	Carvacrol	22
3.3	Encapsulação	22
3.3.1	Nanoencapsulação.....	23
3.3.2	Nanopartículas poliméricas.....	24
3.3.3	Nanocápsulas desenvolvidas com polímeros sintéticos e naturais	25
3.3.3.1	Chia.....	26
3.3.3.2	Linhaça.....	27
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Materiais.....	28
4.2	Culturas Bacterianas	28
4.3	Encapsulação de carvacrol em nanocápsulas de mucilagem de chia e linhaça.....	28
4.4	Caracterização físico-química das nanocápsulas contendo carvacrol.	30
4.5	Eficiência de encapsulação.....	30
4.6	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	31
4.7	Análise estatística	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	Determinação da melhor formulação de nanocápsulas	32
5.2	Caracterização físico-química e determinação da eficiência de encapsulação das nanocápsulas contendo carvacrol	34

5.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das nanocápsulas branco (BNMC e BNML) e do carvacrol livre e encapsulado em nanocápsulas de mucilagem de chia e linhaça.....	37
6. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos, devido à quantidade e variedade de nutrientes presentes, são bastante suscetíveis à contaminação por microrganismos, ocasionando grande desafio para indústrias alimentícias e serviços de alimentação na manutenção de sua segurança (FLORES; MELO, 2015). Os microrganismos patogênicos e suas toxinas podem transmitir doenças a partir de alimentos contaminados, as DTAS, cujos principais sintomas são náuseas, vômito e diarreia (BRASIL, 2010). No Brasil, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* estão entre os principais microrganismos causadores de surtos alimentares (BRASIL, 2019).

Atualmente as indústrias de alimentos estão buscando atender uma demanda crescente dos consumidores por alimentos mais naturais, com longa vida útil, porém com menos aditivos sintéticos. Os óleos essenciais e seus componentes, devido às características antimicrobianas contra uma ampla gama de microrganismos, possuem potencial promissor como conservante natural (VELDHUIZEN *et al.*, 2006). Dentre eles destaca-se o carvacrol, um composto derivado dos óleos essenciais de orégano e tomilho, que pode ser utilizado em alimentos, pois possui status GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) (MAGI; MARINI; FACINELLI, 2015; SHRESTHA *et al.*, 2019). Apresenta eficiência contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SHARIFI-RAD *et al.*, 2018), porém sua aplicação na indústria de alimentos é limitada devido a problemas como alta volatilidade, baixa solubilidade e estabilidade, além de ocasionar sabor/odor residual (FELÍCIO *et al.*, 2020; SHRESTHA *et al.*, 2019). Visando minimizar os problemas acima expostos pode-se utilizar a nanoencapsulação como uma estratégia para aplicar este composto em sistemas alimentares.

A principal vantagem da encapsulação é a liberação controlada do composto encapsulado, além do aumento de sua estabilidade e redução de transferência de sabor e aromas indesejáveis para os alimentos (SILVA *et al.*, 2019). As nanopartículas orgânicas se caracterizam por possuírem tamanho de até 999 nm (JEEVANANDAM *et al.*, 2018; SILVESTRE *et al.*, 2020). Nas pesquisas em alimentos envolvendo nanomateriais, as nanopartículas poliméricas são uma das mais estudadas, devido à liberação lenta dos compostos encapsulados (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012). São classificadas como

nanocápsulas ou nanoesferas, dependendo da distribuição do composto encapsulado na matriz encapsulante, que pode ser um material sintético ou natural (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), dependendo das características desejadas para as nanocápsulas (SANTOS *et al.*, 2016). Atualmente diversas pesquisas estão utilizando mucilagens para nanoencapsulação de compostos bioativos (vitaminas, minerais, saborizantes), porém, até onde sabemos este material ainda não foi utilizado para encapsulação de óleos essenciais e seus compostos (TAHERI; JAFARI, 2019).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi encapsular carvacrol em nanocápsulas de mucilagem de chia e linhaça visando à inibição de *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Encapsular carvacrol em nanocápsulas de mucilagem de chia e linhaça visando à inibição de *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver nanocápsulas de mucilagem de chia contendo carvacrol;
- Desenvolver nanocápsulas de mucilagem de linhaça contendo carvacrol;
- Determinar as características físico-químicas das nanocápsulas quanto ao tamanho, potencial zeta, polidispersidade e eficiência de encapsulação;
- Determinar a estabilidade das nanocápsulas por 21 dias.
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de carvacrol livre, bem como do carvacrol encapsulado em nanocápsulas de chia e linhaça, contra *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microrganismos de importância em alimentos

As doenças transmitidas por alimentos (DTA), principalmente as causadas por microrganismos, representam um grave e frequente problema de saúde pública (NOTERMANS; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, 1992; SANTANA *et al.*, 2010). Os principais sintomas provocados pelas DTA são náuseas, vômitos e diarreia (BRASIL, 2010). Entretanto, algumas DTA podem causar sintomas mais graves, ocasionando até a morte, especialmente de pessoas imunodeprimidas e idosos (FORSYTHE, 2013).

Segundo o Ministério da Saúde dentre os principais microrganismos causadores de surtos alimentares no Brasil entre 2016 e 2019 estão *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2019).

3.1.1 *Salmonella enterica*

A salmonelose é uma doença transmitida por alimentos contaminados por *Salmonella*, um dos principais microrganismos causadores de surtos alimentares no Brasil (BRASIL, 2019; SHINOHARA *et al.*, 2008) e no mundo (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL [ECDC] & EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY [EFSA], 2018). Esta bactéria pertence à família *Enterobacteriaceae*, possuindo forma de bastonetes Gram-negativos, são anaeróbicas facultativas e tem como temperatura ótima de multiplicação 37 °C. Os alimentos mais relacionados com salmonelose são frango cru, carne e ovos, mas alguns surtos estão sendo relacionados ao consumo de vegetais crus e frutas (FORSYTHE, 2013).

As principais espécies associadas com infecções alimentares em humanos são *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis (BORGES; ANDRADE; MACHADO, 2010), causando nos doentes sintomas como dores abdominais, náuseas, vômitos e febre moderada (SHINOHARA *et al.*, 2008).

3.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, pertencente à família *Micrococcaceae*, possuem forma de cocos e apresentam-se de forma isolada ou agrupados em formato de cachos de uvas. São catalase positivo, não esporulados e possuem uma temperatura ótima de crescimento de 37 °C (SANTOS *et al.*, 2007). Esse microrganismo é produtor de enterotoxinas termorresistentes que, quando presentes no alimento causam intoxicação alimentar, sendo frequentemente associada a alimentos bastante manipulados como carne fatiada, produtos lácteos, presunto, sanduíches e saladas (FORSYTHE, 2013).

Grande parte das contaminações envolvendo o *S. aureus* acontece durante a manipulação dos alimentos pois este microrganismo pode ser encontrado na pele, cabelo, intestino, garganta e fossas nasais de seres humanos (SANTOS *et al.*, 2007), porém, quando não são seguidas as boas práticas de fabricação mesmo indivíduos sadios podem transmiti-los para os alimentos (OLAIMAT *et al.*, 2017).

Quando *S. aureus* presente no alimento encontra condições favoráveis como temperatura entre 10 e 46 °C e pH entre 7 e 7,5 pode ocorrer a produção de enterotoxina (SANTANA *et al.*, 2010). A detecção de enterotoxina é realizada através de contagens de quantidade de células de *S. aureus* acima de 10^6 UFC g⁻¹ (SANTANA *et al.*, 2010). Quando o consumidor ingere um alimento com grande quantidade destas enterotoxinas ocorre à intoxicação estafilocócica e após 1 – 6 h iniciam-se os principais sintomas como náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia (FORSYTHE, 2013; SANTANA *et al.*, 2010).

3.2 Antimicrobianos naturais

Atualmente os consumidores estão muito exigentes sobre as características dos alimentos, preferindo produtos mais naturais, sem a utilização de conservantes sintéticos, microbiologicamente seguros e que possuam uma longa vida útil (MACHADO; RIBEIRO; DRUZIAN, 2013).

Nos últimos anos o elevado número de surtos alimentares demonstra que a contaminação e multiplicação microbiana em alimentos é um grande desafio que as indústrias e serviços de alimentação enfrentam para manter os alimentos seguros até o momento do consumo (VELDHUIZEN *et al.*, 2006). A busca por alimentos com

menos conservantes sintéticos impulsionou o desenvolvimento de pesquisas visando a utilização de antimicrobianos naturais em aplicações alimentares (MALHEIROS *et al.*, 2010; SEOW *et al.*, 2014). Os antimicrobianos naturais provêm de origem vegetal, microbiana ou animal e podem inibir a multiplicação de bactérias, através de mecanismos que inibem a síntese de ácidos nucleicos, causam modificações em seu metabolismo e nas propriedades da membrana citoplasmática (BARROS *et al.*, 2020). Dentre estes, os mais utilizados são os óleos essenciais e seus componentes, devido à sua atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de microrganismos (BURT, 2004; RANDAZZO *et al.*, 2017; STOJKOVIĆ *et al.*, 2013).

3.2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos produzidos pelo metabolismo secundário de diversas plantas aromáticas, que possuem propriedades antibacteriana, antifúngica e antiviral (BURT, 2004; SEOW *et al.*, 2014). São uma mistura de substâncias voláteis que apresentam baixo peso molecular, encontram-se na forma líquida e exibem aromas pronunciados (ASBAHANI *et al.*, 2015). Além disso, apresentam baixa solubilidade em água e pouca estabilidade na presença de luz e calor (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais depende dos compostos presentes, variando de acordo com a espécie, fatores fisiológicos e do ambiente onde a planta se encontra, podendo ser sintetizados por diferentes partes das plantas, tais como folhas, flores, frutos e raiz (GOMES; MOREIRA; CASTELL-PEREZ, 2011). Compostos extraídos de óleos essenciais como timol, eugenol e carvacrol têm sua atividade antimicrobiana associada à presença de compostos fenólicos (ARFA *et al.*, 2006).

Atualmente são conhecidos aproximadamente três mil óleos essenciais, mas apenas 300 são utilizados em indústrias de alimentos, farmacêutica, de perfumes e afins (BHARGAVA *et al.*, 2015).

3.2.2 Carvacrol

O carvacrol é encontrado em diversas plantas aromáticas e normalmente é extraído do óleo essencial de orégano e tomilho (LEE; YUN; PARK, 2015; ULTEE; KETS, E. P. W.; SMID, E. J., 1999). Apresenta características como baixa solubilidade em água, porém boa solubilidade em etanol, acetona e éter dietílico. Esse composto possui atividade antiviral, antifúngica e antibacteriana contra Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso, também demonstra propriedade antioxidante e anticarcinogênica (SHARIFI-RAD *et al.*, 2018; YADAV; KAMBLE, 2009).

Devido a sua lipofilicidade o carvacrol age na membrana celular da bactéria, desestabilizando e rompendo sua estrutura, ocasionando a liberação de íons K^+ e H^+ , causando assim morte celular (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; PASQUA, DI *et al.*, 2007; ULTEE; KETS, E.; SMID, J., 1999).

O carvacrol é aprovado para uso em alimentos, pois é classificado como uma substância GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (SHRESTHA *et al.*, 2019). Porém, sua aplicação em alimentos é limitada devido a sua pouca solubilidade em água, baixa estabilidade, possível interação com a matriz alimentar reduzindo a atividade antimicrobiana, além de provocar mudança no sabor ou aroma do alimento (FELÍCIO *et al.*, 2020; SHRESTHA *et al.*, 2019). Neste contexto, uma estratégia para o uso de carvacrol como antimicrobiano em alimentos é a encapsulação.

3.3 Encapsulação

A encapsulação consiste em um processo de revestimento de partículas, que auxilia na sua estabilização, possibilitando assim a utilização de compostos hidrofóbicos, como os óleos essenciais, em alimentos com alto teor de umidade (SILVA *et al.*, 2019).

A técnica de encapsulação consiste no aprisionamento de compostos no interior de uma matriz inerte, proporcionando proteção do material encapsulado contra o calor, luz, oxigênio e umidade (TIMILSENA *et al.*, 2016). Além disso, ocorre aumento da solubilidade, redução de interações com os componentes alimentares,

diminuição de aromas indesejáveis e ainda liberação controlada do composto encapsulado (AZEREDO, 2005).

A encapsulação pode ser classificada conforme o tamanho da partícula como macro (maiores que 5000 μm), micro (entre 1 μm e 5000 μm) e nano (menor que 1 μm) (JAFARI, 2017).

3.3.1 Nanoencapsulação

A nanotecnologia consiste na fabricação e desenvolvimento de materiais em escala nanométrica, ou seja, estruturas com tamanhos muito pequenos. Pode-se ter uma noção desse tamanho comparando-o a um fio de cabelo, pois uma nanoestrutura possui um tamanho 100.000 vezes menor que o diâmetro do fio (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2014). Nanopartículas produzidas em áreas farmacêuticas e de biotecnologia podem possuir uma dimensão de até 999 nm, em razão do tamanho de algumas moléculas orgânicas (JEEVANANDAM *et al.*, 2018; SILVESTRE *et al.*, 2020).

A nanoencapsulação quando comparada a macro e microencapsulação apresenta vantagens como maior superfície de contato, aumento da estabilidade e solubilidade e ainda, liberação controlada do composto encapsulado (CAMPO *et al.*, 2017; MOZAFARI *et al.*, 2006). Estes materiais têm potencial para ser utilizados na indústria de alimentos para encapsular vitaminas, aditivos, corantes e antimicrobianos proporcionando redução de custo, pois muitas vezes pode-se utilizar uma menor concentração desses compostos ativos (BRANDELLI; LOPES; BOELTER, 2017; MARTINS *et al.*, 2015).

Devido a essas características a nanotecnologia pode ser empregada em diversas etapas da produção de alimentos, como na agricultura (pesticidas e fertilizantes), processamento de alimentos (encapsulação de compostos bioativos, agentes de textura e realçadores de odor e sabor) até o empacotamento (embalagens ativas ou mais resistentes) (DUNCAN, 2011).

Os nanomateriais podem se apresentar sob forma de nanoemulsões, nanocápsulas, nanopartículas lipídicas e poliméricas (MARTINS *et al.*, 2015). Entretanto, nanopartículas poliméricas têm atraído bastante interesse em estudos,

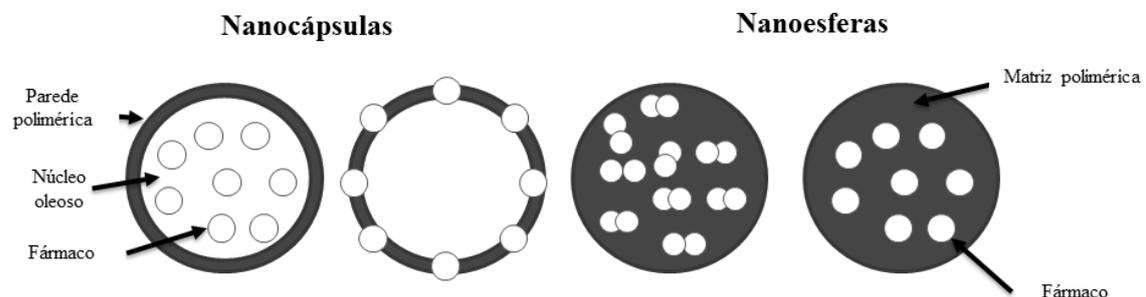
pois apresentam liberação lenta dos compostos encapsulados (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014; FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012).

3.3.2 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas se caracterizam como sistemas coloidais de polímeros sintéticos ou naturais. Seu mecanismo de ação e cinética dependem do tipo de polímero utilizado como material encapsulante, que podem ser sintéticos ou naturais (BRANDELLI; LOPES; BOELTER, 2017).

Geralmente as nanopartículas poliméricas são classificadas em dois grupos: nanocápsulas e nanoesferas (figura 1). As nanocápsulas possuem um núcleo oleoso revestido com um material polimérico, enquanto nas nanoesferas o material encapsulado pode estar presente no interior, superfície ou até mesmo dissolvido na matriz polimérica (BRANDELLI; LOPES; BOELTER, 2017; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Figura 1 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.



Fonte: SCHAFFAZICK *et al.*, 2003

Alguns estudos relatam que as nanopartículas poliméricas contendo óleos essenciais podem ser utilizadas para aplicação em alimentos ou medicamentos e cosméticos devido à liberação controlada dos compostos encapsulados e grande estabilidade em ambientes aquosos (CACCIATORE *et al.*, 2020; BRANDELLI; LOPES; BOELTER, 2017; MOHAMMADI *et al.*, 2017).

3.3.3 Nanocápsulas desenvolvidas com polímeros sintéticos e naturais

Nanocápsulas poliméricas podem ser desenvolvidas utilizando como material encapsulante polímeros sintéticos e polímeros naturais. Considerando a aplicação em alimentos os polímeros utilizados devem ser não-tóxicos além de apresentar grau alimentício (possuir status GRAS) (CAMPO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2016).

A utilização de polímero sintético ou natural depende das características desejadas para a nanocápsula a ser produzida. Normalmente os polímeros naturais, quando comparados aos polímeros sintéticos, apresentam uma capacidade de liberação mais rápida do material encapsulado (RIEUX *et al.*, 2006; SCHAFFAZIK *et al.*, 2003; TORCHILIN, 2012).

Atualmente existe uma maior busca pela utilização de mucilagens para aplicações em alimentos devido a características como ausência de toxicidade, estabilidade e baixo custo, quando comparados aos polímeros naturais comumente usados (SILVA, *et al.*, 2019), tais como goma arábica, goma carragena e goma xantana (TAHERI; JAFARI, 2019).

As mucilagens são hidrocolóides naturais que devido a presença de moléculas hidrofílicas formam soluções viscosas quando em combinação com a água, sendo capazes de absorver mais de cem vezes o seu peso (JANI *et al.*, 2009), possuindo potencial para aplicações em alimentos, conforme mostrado no Quadro 1. Além disso, estudos comprovam que mucilagens apresentam biocompatibilidade e possibilidade de modificações químicas conforme aplicação desejada (CAMPO *et al.*, 2017).

Quadro 1: Comparação entre mucilagem de chia e mucilagem de linhaça

Itens para comparação	Composição principal	Rendimento	Aplicações	Referencias
Mucilagem chia	Polissacarídeos compostos por xilose e glicose, como β - D -xilopiranosose e α - D- glucopiranosose	7% por extração da semente	- Produção de filmes comestíveis biodegradáveis - Produção de nanopartículas poliméricas	(TIMILSENA <i>et al.</i> , 2015) (MUÑOZ; COBOS; <i>et al.</i> , 2012) (MUÑOZ; AGUILERA; <i>et al.</i> , 2012) (CAMPO <i>et al.</i> , 2017)

Mucilagem linhaça	Heteropolissacarídeos de alto peso molecular. Principalmente arabinosilanos, ácido galacturônico e rhamnose	6,5 % da semente	- Espessante, emulsificante, estabilizante e substituto de gordura. - Produção de nanopartículas	(CUI; MAZZA; BILIADERIS, 1994; KAEWMANEE <i>et al.</i> , 2014; QIAN <i>et al.</i> , 2012). (KAUR, M.; KAUR, R.; PUNIA, 2018) (KAUR, M.; KAUR, R.; PUNIA, 2018)
--------------------------	---	------------------	---	--

As mucilagens de chia e linhaça possuem potencial para serem utilizadas como polímeros naturais para a produção de nanopartículas com aplicação na indústria de alimentos, porém, são necessários mais estudos para que seja garantida sua segurança e seu uso possa ser autorizado pelos órgãos reguladores para aplicações alimentares (TAHERI; JAFARI, 2019).

3.3.3.1 Chia

Chia (*Salvia hispanica L.*) é uma planta pertencente à família *Lamiaceae* nativa da Guatemala e México. Suas sementes apresentam altos teores de ácidos graxos, proteínas, fibras e compostos fenólicos. Podem ser utilizadas inteiras, sob forma de mucilagem, óleo ou farinha (MARINELI *et al.*, 2014; SEGURA-CAMPOS *et al.*, 2014).

A semente de chia, desde 1996, é considerada pela FAO (*Food and Agricultural Organization*) como uma potencial fonte de goma de polissacarídeo, devido à propriedade de formar mucilagem até mesmo em baixas concentrações (MUÑOZ; AGUILERA; *et al.*, 2012).

Ao entrar em contato com a água a semente de chia forma um gel mucilaginoso transparente, apresentando viscosidade máxima após duas horas de hidratação (CAMPO *et al.*, 2017; MUÑOZ; COBOS; *et al.*, 2012). A mucilagem de chia é composta principalmente por xilose e glicose, mas a composição pode ser um pouco diferente devido a condições de plantio e variedade de sementes de chia (TIMILSENA *et al.*, 2015). A extração de mucilagem a partir das sementes de chia apresenta rendimento de 7%, esse gel possui característica de alta capacidade de retenção de água (MUÑOZ; COBOS; *et al.*, 2012) já tendo sido aplicada como polímero na produção de filmes comestíveis biodegradáveis (MUÑOZ; AGUILERA; *et al.*, 2012) e produção de nanopartículas poliméricas (CAMPO *et al.*, 2017).

3.3.3.2 Linhaça

A linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é pertencente à família *Linaceae* sendo nativa do Oriente Médio. Existem dois tipos de cultivares diferente: de um se extrai fibras para utilização em produtos têxteis e do outro as sementes, que são muito utilizadas para fins alimentares (POPA *et al.*, 2012; ZUK *et al.*, 2015).

A linhaça possui cerca de 20 – 28 % de fibra alimentar em sua composição, divididas em fibra insolúvel e fibra solúvel. A fração de fibra insolúvel (polissacarídeos) é constituída principalmente por celulose e lignina enquanto a fração de fibra solúvel tem como principais constituintes goma e mucilagem (KAUR, M.; KAUR, R.; PUNIA, 2018).

Na epiderme mucosa da linhaça está presente a mucilagem, representando cerca de 6,5% do peso da semente, que é facilmente extraída quando a semente é mergulhada em água. Devido sua composição química a mucilagem de linhaça pode ser considerada um hidrocolóide alimentar com características como alta capacidade de retenção de água, formação de soluções aquosas viscosas e estabilizantes de emulsões óleo em água. Pode ser aplicada em indústrias alimentícias como espessante, gelificante, emulsificante, estabilizadores e substituto de gordura (KAUR, M.; KAUR, R.; PUNIA, 2018; ZIOLKOVSKA, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Carvacrol (98% de pureza) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). As mucilagens de chia e linhaça foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Compostos Bioativos (ICTA/UFRGS). Utilizou-se também Etanol e Tween 80 adquiridos da Dinâmica (São Paulo, Brasil).

4.2 Culturas Bacterianas

Foram utilizados 2 *pools* compostos por 3 cepas bacterianas cada, todas pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS). (1) *pool* de *Salmonella enterica*: *S. Heidelberg* 22295, *S. Enteritidis* SE86 e *S. Minnesota* 731007, (2) *pool* de *Staphylococcus aureus*: *S. aureus* S6, *S. aureus* S8 e *S. aureus* ATCC 2993.

Todas as cepas foram cultivadas separadamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia), a 37 °C por 18-24h. A concentração de cada cepa foi ajustada para aproximadamente 10^8 UFC/mL, utilizando o equipamento espectrofotômetro Ultrospec™ 3100 pro (Amersham Biosciences, UK), onde foi realizada a diluição com caldo BHI até a obtenção de uma absorbância de 0,5 (DO_{630nm}). Logo após o ajuste, em um único tubo foram reunidos 3 mL de cada cepa, formando um *pool* com volume final de 9 mL.

4.3 Encapsulação de carvacrol em nanocápsulas de mucilagem de chia e linhaça

As nanocápsulas foram produzidas de acordo com a metodologia descrita em Campo et al. (2017) conforme mostrado na figura 2. Para avaliar a influência da concentração do óleo no tamanho da partícula foram preparadas 2 formulações com diferentes concentrações de carvacrol (40 mg ou 80 mg) e 2 polímeros diferentes (mucilagens de chia e linhaça).

Figura 2 - Encapsulação de carvacrol em nanocápsulas de mucilagem de chia ou linhaça



Fonte: do autor (2021)

Para a formação das nanopartículas foram utilizadas uma fase orgânica e uma fase aquosa. A fase orgânica foi composta por 13,5 g de Tween 80 e carvacrol (40 mg ou 80 mg) diluídos em 4 mL de etanol, mantidos sob agitação magnética (Fisatom, modelo 752A, São Paulo, Brasil) durante 15 minutos. Já a fase aquosa consistia na mucilagem de chia ou linhaça hidratada em água destilada (0,1% m/v). Em seguida, a fase orgânica foi adicionada gota a gota em 20 mL da fase aquosa com o auxílio de uma pipeta Pasteur, durante homogeneização com velocidade de 8000 rpm por 15 minutos em Ultra Turrax (IKA Ultra Turrax® digital, modelo T25, Staufen, Alemanha). As diferentes formulações de nanocápsulas (carvacrol: 40 mg ou 80 mg) foram avaliadas imediatamente após a preparação em relação ao tamanho e Concentração Bactericida (CBM) – descritas nos item 4.4 e 4.6, respectivamente – para escolher a formulação. As nanocápsulas foram denominadas NMC (nanocápsulas produzidas com mucilagem de chia) e NML (nanocápsulas produzidas com mucilagem de linhaça). Nanocápsulas branco de chia (BNMC) e de linhaça (BNML) também foram produzidas, substituindo carvacrol por óleo caprílico (óleo sem ação antimicrobiana).

4.4 Caracterização físico-química das nanocápsulas contendo carvacrol

Foram determinados tamanho médio, Span e potencial zeta das nanopartículas. Todas as análises foram realizadas após diluição na proporção de 1:10 em água ultrapura, imediatamente após a encapsulação (dia 0) e semanalmente até o dia 21 (dia 7, dia 14 e dia 21). Essas análises foram realizadas no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O diâmetro médio e o Span foram determinados por difração a laser (Mastersizer 2000® 5.61, Malvern Instruments, Reino Unido) utilizando índices de refração de 1,335 e 1,330 para as nanocápsulas e para água, respectivamente. As medidas de potencial zeta foram realizadas no equipamento ZetaPALS modelo 31450 (Brookhaven Instruments, Estados Unidos). O Span indica o tamanho de partículas de uma porcentagem da amostra e pode ser relacionado com o índice de polidispersidade (PDI), através da equação 1 (FDA, 2020).

$$PDI = 0,152(Span^2) \quad (1)$$

4.5 Eficiência de encapsulação

Para determinar a eficiência de encapsulação foi utilizado o método descrito em Cacciatore et al. (2020). Resumidamente, as amostras de nanocápsulas de chia ou linhaça com carvacrol foram centrifugadas, logo após uma alíquota do sobrenadante foi diluída em etanol 95% e sua absorbância lida a 297 nm em espectrofotômetro UV-vis (Amersham Biosciences, Ultrospec 3100 pro). A concentração de cada amostra foi calculada utilizando a equação da reta, determinada por Cacciatore (2020), $y = 0,3431x + 0,1305$ ($R^2 = 0,9835$), onde x representa a concentração da amostra (mg/mL) e y a absorbância (nm). Para calcular a eficiência de encapsulação utilizou-se a equação 2.

$$EE (\%) = \frac{(conc. \text{ inicial} - conc. \text{ sobrenadante})}{conc. \text{ inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Concentração inicial é a quantidade de carvacrol encapsulada em NMC e NML (de acordo com o item 4.3) e a concentração do sobrenadante é a quantidade de carvacrol em suspensão após centrifugação.

4.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Determinou-se a CBM das nanocápsulas contendo carvacrol para cada um dos 2 *pools*, utilizando microplacas de titulação com 96 poços conforme metodologia descrita por *Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2008) com modificações. Inicialmente adicionou-se caldo BHI (100 µL) em cada poço. Logo após, 100 µL da solução contendo as nanocápsulas (ou carvacrol livre) foram adicionadas no primeiro poço e homogeneizadas, depois de homogeneizadas 100 µL do primeiro poço foi transferido para o segundo poço, que depois de homogeneizado, foi transferido para o terceiro poço, e assim respectivamente até o último poço. Por fim, adicionou-se 100 µL do *pool* de bactérias (com 8 log UFC/mL de concentração) até o penúltimo poço. No último poço não foi adicionado microrganismo, sendo esse o controle negativo. Após as diluições a microplaca foi incubada a 37 °C por 24 horas. Essa técnica foi repetida para os 2 *pools* de microrganismos diferentes. Após esse período foram inoculados 20 µL de cada poço em placas contendo meio seletivo para cada microrganismo, ou seja, Agar *Paired Parker* (BP) (Merck, Darmstadt) para *S. aureus* e Agar *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD) (Merck, Darmstadt) para *Salmonella enterica*. Após a incubação a 37 °C por 18-24 horas, foi observado o crescimento ou não de colônias. Com isso, considerou-se como CBM a menor concentração de antimicrobiano necessária para inativar os microrganismos testados.

4.7 Análise estatística

Os dados referentes a contagens bacterianas e caracterizações físico-químicas das nanopartículas foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA), fator único, aplicando o teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o *software* SAS Studio online (Versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da melhor formulação de nanocápsulas

A formulação das nanocápsulas foi escolhida conforme resultados apresentados na análise da Concentração Bactericida Mínima (Tabela 1) seguida da análise de tamanho e polidispersidade (Tabela 2).

Tabela 1: Concentração Bactericida Mínima de nanocápsulas de mucilagem de chia contendo carvacrol (NMC) e nanocápsulas de mucilagem de linhaça contendo carvacrol (NML) contra os *pools* de *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*

Microrganismos		Tipo de nanopartículas			
		NMC		NML	
		40 mg	80 mg	40 mg	80 mg
MBC (mg/mL)	<i>Salmonella</i>	0,42 ± 0 ^a	0,42 ± 0,32 ^a	0,42 ± 0 ^a	0,83 ± 0,64 ^a
	<i>S. aureus</i>	**	1,67 ± 0,48 ^b	**	1,25 ± 0,59 ^a

** Sem efeito bactericida

NMC: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de chia

NML: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de linhaça

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

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

Em relação à *Salmonella*, tanto as nanocápsulas de chia (NMC) como as de linhaça (NML) com as duas concentrações de carvacrol (40 mg e 80 mg) foram eficazes para inibir a multiplicação deste microrganismo, sem diferenças significativas entre elas ($p < 0.05$).

Já em relação ao *S. aureus*, a única concentração de carvacrol capaz de inibir seu crescimento foi a de 80 mg, tanto para nanocápsulas de chia (NMC) como de linhaça (NML).

O próximo passo foi analisar se as formulações possuíam características físico-químicas adequadas. Estes dados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Avaliação do tamanho das nanocápsulas de chia (NMC) e de linhaça (NML) com diferentes concentrações de carvacrol

Tamanho	NMC		NML	
	40 mg	80 mg	40 mg	80mg
Diâmetro médio (nm)	179,0 ± 2,3 ^c	344,0 ± 3,94 ^a	165,3 ± 1,20 ^d	281,0 ± 3,11 ^b
PDI	0,17 ± 0,02 ^b	4,28 ± 0,1 ^a	0,25 ± 0,06 ^b	3,57 ± 0,08 ^a

NMC: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de chia

NML: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de linhaça

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

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

Através da análise de tamanho (Tabela 2) foi possível observar que as quatro amostras (NMC 40 mg, NMC 80 mg, NML 40 mg e NML 80 mg) apresentaram diâmetro médio menor que 999 nm, portanto, possuem tamanho adequado para serem consideradas nanopartículas orgânicas (JEEVANANDAM *et al.*, 2018; SILVESTRE *et al.*, 2020). Além disso, verificou-se que a quantidade de carvacrol influenciou no tamanho médio das nanopartículas, ou seja, as formulações com 80 mg de carvacrol apresentaram tamanho médio superior às formulações que utilizaram 40 mg de carvacrol, tanto para as nanocápsulas de chia (NMC) como para as de linhaça (NML). Este mesmo comportamento foi observado por Lertsutthiwong *et al.* (2008) (LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2008), que verificaram que o aumento da concentração de óleo de cúrcuma acarretou em um aumento de tamanho das partículas de alginato de sódio, ou seja, para concentração de 2% e 4% de óleo de cúrcuma obteve-se tamanhos aproximados de 300 e 400 nm, respectivamente.

É importante ressaltar que o tamanho é um dos critérios utilizados para selecionar a melhor formulação de nanopartículas visando à aplicação como antimicrobiano, pois quanto menor o diâmetro médio maior será a possibilidade das nanocápsulas penetrarem através da membrana plasmática dos microrganismos (MORONES *et al.*, 2005).

Outro critério importante para ser analisado é a variação de tamanho das nanocápsulas presentes em suspensão, ou seja, a polidispersidade (PDI). Neste trabalho (Tabela 2), verificou-se que houve diferenças significativas da PDI entre as formulações contendo 40 mg e 80 mg de carvacrol ($p > 0,05$). As nanocápsulas de mucilagem de chia (PDI NMC: 0,17) e linhaça (PDI NML: 0,25) com 40 mg de carvacrol apresentaram valores de PDI menores do que as formulações com 80 mg

de carvacrol (PDI NMC: 4,28 e PDI NML: 3,57). Alguns artigos sugerem que valores de polidispersidade próximos a 0,2 são o ideal, pois indicam que na solução existe homogeneidade de tamanho das partículas, ocorrendo menor agregação dessas partículas e conseqüentemente aumento da estabilidade das soluções (KLANG *et al.*, 2012; KLANG; VALENTA, 2011). Assim, foi concluído que as formulações contendo a maior concentração de carvacrol (80 mg) não apresentaram resultados adequados de PDI, pois os valores obtidos são muito maiores do que o valor ideal de 0,2.

Considerando os resultados das Tabelas 1 e 2 conclui-se que a quantidade de carvacrol mais adequada para a produção de nanocápsulas de chia e linhaça foi de 40 mg, sendo então produzidas nanocápsulas somente com esta concentração (40 mg de carvacrol) para os demais experimentos.

5.2 Caracterização físico-química e determinação da eficiência de encapsulação das nanocápsulas contendo carvacrol

Conforme demonstrado na Tabela 2, verificou-se que NMC (179 nm) e NML (165,3 nm) apresentaram diferenças significativas ($p > 0.05$) em relação ao tamanho. NML possui tamanho menor do que NMC, devido a isso, NML pode apresentar maior facilidade para penetrar através da membrana plasmática dos microrganismos (MORONES *et al.*, 2005), além de que quanto menor for o tamanho da nanopartículas maior será sua área de superfície, permitindo maior interação com o ambiente circundante (SEIL; WEBSTER, 2012). Em outros estudos com mucilagens sendo usadas como material encapsulante o tamanho médio das nanopartículas foi semelhante aos resultados encontrados neste trabalho. Campo *et al.* (2017), ao encapsularem óleo de chia em mucilagem de chia obtiveram nanopartículas com tamanhos variando entre 163 e 212 nm. Já no estudo de Nasrabadi *et al.* (2019), as nanocápsulas de mucilagem de linhaça carregadas com óleo de linhaça apresentaram tamanho de 369 nm.

Tabela 3: Potencial zeta e eficiência de encapsulação das nanocápsulas de mucilagem de chia (NMC) e nanocápsulas de mucilagem de linhaça (NML) contendo carvacrol

	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)
NMC	-11,4 ± 1,4 ^b	98,65 ± 0,06 ^a
NML	-12,6 ± 0,3 ^a	98,02 ± 0,04 ^a

NMC: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de chia

NML: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de linhaça

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

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

O potencial zeta indica a diferença de cargas da camada iônica e da solução ao redor da partícula, ou seja, determina as cargas superficiais das nanocápsulas em suspensão (LU; CHIU, 2006). Este parâmetro, a partir das forças eletrostáticas, avalia a estabilidade da solução. Quanto maior o valor absoluto do potencial zeta maiores são as interações repulsivas entre as nanopartículas e conseqüentemente menor a frequência das colisões e agregações (ARIAS *et al.*, 2008). No presente trabalho, conforme demonstrado na Tabela 3, ambas as nanocápsulas apresentaram valores negativos (NMC: -11,4 mV e NML: -12,6 mV) e diferenças significativas ($p > 0.05$) entre si. Geralmente considera-se que a solução apresenta estabilidade eletrostática quando o potencial zeta apresentar valores na faixa localizada abaixo de -30 ou acima de +30 mv, porém, nanopartículas que possuem moléculas de tensoativos em sua superfície podem apresentar estabilização estérica (WASHINGTON, 1996), evitando a agregação das nanopartículas por longos períodos de armazenamento (WU; ZHANG; WATANABE, 2011). Provavelmente este foi o motivo de, neste trabalho, as nanopartículas demonstrarem estabilidade durante 21 dias de armazenamento (Tabela 4). Em seu estudo Lertsutthiwong *et al.* (2008) demonstraram que a utilização de Tween 80 resultou em um potencial zeta menos negativo (-17,4 mV) quando comparado com a formulação sem Tween 80 (-41,2 mV), sugerindo que com a utilização deste tensoativo houve a formação de uma micela em torno das gotículas de óleo, acarretando redução na densidade da carga de superfície das nanocápsulas.

Campo *et al.* (2017) também relataram valores negativos de potencial zeta (-11,58 mV), quando utilizaram mucilagem de chia para encapsular óleo de chia. Os valores negativos de potencial zeta dos trabalhos acima citados podem ser

explicados pela presença de grupos de ácidos carboxílicos na forma carboxilada ($-\text{COO}^-$) nos polissacarídeos de mucilagem de chia (SILVA *et al.*, 2009).

A eficiência de encapsulação (EE) indica a quantidade de óleo que está aprisionada nas nanopartículas. As características físico-químicas e interação dos compostos envolvidos influenciam demasiadamente a EE (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996). Altos valores de EE são esperados quando o material encapsulante é hidrofílico e composto encapsulado é hidrofóbico (KHAYATA *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2016), como no caso desse estudo, onde as mucilagens são hidrofílicas e o carvacrol hidrofóbico.

Nesse trabalho as duas formulações apresentaram alta eficiência de encapsulação, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre elas. Quando mucilagem de chia foi utilizada para encapsular óleo de chia também foi obtido alta EE (82,8%) (CAMPO *et al.*, 2017) e 94% EE foram relatados por Timilsena *et al.* (2016), quando realizaram a encapsulação de óleo de semente de chia em microcápsulas de complexos de isolado de proteína e goma de semente de chia.

É importante destacar que, até onde sabemos o uso de mucilagens como material encapsulante para a produção de nanopartículas contendo carvacrol ainda não foi realizada. Por outro lado, foram encontrados diversos trabalhos mostrando o potencial das mucilagens, para encapsulação de compostos bioativos como vitaminas, minerais, ácidos graxos e saborizantes (TAHERI; JAFARI, 2019).

A avaliação da estabilidade é importante, pois permite determinar o período em que as nanopartículas manterão suas características físico-químicas inalteradas, ou seja, com menor possibilidade de precipitação devido à aglomeração das partículas. Para esse trabalho foi realizado estudo da estabilidade das duas formulações de nanocápsulas desenvolvidas (NMC e NML) ao longo de 21 dias e armazenadas a 4 °C, cujos resultados são apresentados na Tabela 4. Verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em nenhuma das características físico-químicas avaliadas (tamanho, PDI e potencial zeta), portanto, pode-se considerar que ambas as formulações são estáveis durante o tempo avaliado quando mantidas sob refrigeração adequada. Campo *et al.* (2017) relataram que as nanocápsulas de mucilagem de chia carregadas com óleo de chia mantiveram estabilidade em relação aos mesmos parâmetros ao longo de 28 dias em condições aceleradas de armazenamento a 40 °C. Em estudo de Nasrabadi *et al.* (2019)

também foi relatado que as nanocápsulas produzidas mantiveram estabilidade físico-química ao longo de 28 dias quando foram utilizadas proteína e mucilagem de linhaça para encapsular óleo de linhaça.

Tabela 4: Estabilidade das nanocápsulas produzidas com mucilagem de chia (NMC) e das nanocápsulas produzidas com mucilagem de linhaça (NML)

	Diâmetro médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Dias		NMC	
0	179,0 ± 2,3 ^a	0,17 ± 0,02 ^a	-11,4 ± 1,4 ^a
7	181,1 ± 1,9 ^a	0,22 ± 0,04 ^a	-10,9 ± 0,9 ^a
14	182,5 ± 1,7 ^a	0,17 ± 0,07 ^a	-10,8 ± 1,1 ^a
21	184,6 ± 2,1 ^a	0,30 ± 0,01 ^a	-10,6 ± 1,2 ^a
		NML	
0	165,3 ± 1,20 ^b	0,25 ± 0,06 ^a	-12,6 ± 0,3 ^b
7	167,4 ± 1,6 ^b	0,20 ± 0,03 ^a	-12,7 ± 0,6 ^b
14	175,1 ± 2,1 ^b	0,17 ± 0,07 ^a	-12,3 ± 0,5 ^b
21	181,3 ± 1,9 ^b	0,21 ± 0,06 ^a	-11,9 ± 0,9 ^b

NMC: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de chia

NML: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de linhaça

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

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

5.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das nanocápsulas branco (BNMC e BNML) e do carvacrol livre e encapsulado em nanocápsulas de mucilagem de chia e linhaça

Os valores de CBM para as nanocápsulas de mucilagem de chia (NMC) ou linhaça (NML) contendo carvacrol, carvacrol livre e para as nanocápsulas branco de chia (BNMC) e de linhaça (BNML) contra os *pools* de *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* podem ser observados na Tabela 5. As nanocápsulas branco (BNMC e BNML), como esperado, não demonstraram ação bactericida contra nenhum dos *pools* testados, comprovando que o efeito antimicrobiano das nanocápsulas é proveniente do carvacrol.

Tabela 5: Concentração bactericida mínima (CBM) de carvacrol livre, nanocápsulas branco (BNMC e BNML), nanocápsulas de mucilagem contendo 40 mg de carvacrol (NMC e NML) contra *pools* bacterianos de *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*

CBM (mg/mL)		
Amostra	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>
NMC	0,42 ± 0 ^b	**
BNMC	**	**
Carvacrol livre	1,77 ± 0,76 ^a	1,33 ± 0 ^a
NML	0,42 ± 0 ^b	**
BNML	**	**

** : Sem efeito bactericida

NMC: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de chia

NML: Nanocápsulas produzidas com mucilagem de linhaça

BNMC: Nanocápsulas branco produzidas com mucilagem de chia

BNML: Nanocápsulas branco produzidas com mucilagem de linhaça

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

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

Analisando os resultados de CBM, observa-se que foi necessária uma maior concentração de carvacrol livre, quando comparado com o carvacrol encapsulado, para inativar a *Salmonella*. Este resultado foi bastante promissor, pois a maior parte dos estudos mostram que geralmente é necessária maior concentração de carvacrol encapsulado em comparação com carvacrol livre para ocorrer ação bactericida. Em estudo em que o carvacrol foi encapsulado em nanopartículas poliméricas produzidas com Eudragit a CBM necessária foi de 3,31 mg/mL para o composto encapsulado e 1,77 mg/mL para o composto livre (CACCIATORE *et al.*, 2020). Quando o mesmo composto foi encapsulado em lipossomas os resultados foram de 1,325 mg/mL para lipossomas e 0,331 mg/mL para carvacrol em solução alcoólica (20%) (HECKLER *et al.*, 2020). Por outro lado, Granata *et al.* (2018) verificaram que nanopartículas de PCL - nanocápsulas poliméricas de poli (ϵ -caprolactona) - carregadas com 2 óleos essenciais (*Thymus capitatus* e *Origanum vulgare*) apresentaram maior atividade antimicrobiana em comparação com os óleos essenciais livres contra patógenos de origem alimentar.

Com relação ao *S. aureus*, nenhuma das nanocápsulas produzidas foram eficientes para inibir seu crescimento, entretanto o carvacrol livre (CBM de 1,33 mg/mL) apresentou ação bactericida contra esse microrganismo. Conforme revisão

escrita por Felício et al. (2020) este resultado possivelmente ocorreu pois carvacrol somente tem efeito bactericida contra *Staphylococcus aureus* quando presente em uma concentração superior a 1000 µg/mL. Corroborando a afirmação anterior, em estudo em que carvacrol foi encapsulado em nanopartículas de quitosana foi necessário CBM de 4,1 mg/mL para inibir o crescimento de *S. aureus* (KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011). A resistência apresentada por *S. aureus* neste trabalho pode ser devido à grande capacidade deste microrganismo em desenvolver resistência a antimicrobianos, devido, principalmente, à presença de plasmídeos de resistência (CUSSOLIM *et al.*, 2021). Plasmídeos de resistência são pequenos fragmentos de DNA contendo genes produtores de enzimas que neutralizam a ação de um antimicrobiano, tornando a bactéria resistente a ele. A transferência destes plasmídeos de uma bactéria para outra pode ocorrer durante a conjugação, tornando uma população bacteriana resistente a um determinado antimicrobiano (Cussolim et al., 2021, Mayer, 2016).

Ao comparar os resultados do presente trabalho com uma pesquisa anterior de nosso grupo, onde foram testadas nanocápsulas de Eudragit carregadas com carvacrol contra patógenos de origem alimentar (CACCIATORE et al., 2020), pode-se verificar que a CBM para inativar *Salmonella* foi maior (3,31 mg/mL em CACCIATORE et al., 2020) do que a encontrada nesse estudo (0,42 mg/mL para NMC e NML). Esse comportamento pode ser explicado pela maior velocidade de liberação do composto encapsulado em polímeros naturais em comparação com polímeros sintéticos (RIEUX *et al.*, 2006; SCHAFFAZIK et al., 2003; TORCHILIN, 2012). Mais estudos devem ser realizados para avaliar se a composição química das mucilagens ou a conformação espacial das nanocápsulas produzidas podem ser responsáveis pelos ótimos resultados de inativação de *Salmonella* alcançados, mesmo quando usadas pequenas concentrações de carvacrol.

6. CONCLUSÕES

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

- Mucilagem de chia e mucilagem de linhaça mostraram características adequadas para uso como materiais de parede para o desenvolvimento de nanocápsulas contendo carvacrol.
- As nanocápsulas de mucilagem de chia contendo carvacrol (NMC) e nanocápsulas de mucilagem de linhaça contendo carvacrol (NML) apresentaram tamanho adequado, índice de polidispersidade baixo, potencial zeta negativo e alta eficiência de encapsulação.
- Ambas nanocápsulas permaneceram estáveis por 21 dias, mantidas em temperatura de 4 °C.
- As duas nanocápsulas contendo carvacrol (NMC e NML) não foram eficientes contra *S. aureus*.
- As duas nanocápsulas contendo carvacrol (NMC e NML) inativaram o *pool* de *Salmonella* em concentração menor (0,42 mg/mL) quando comparadas ao carvacrol livre (1,77 mg/mL).
- A encapsulação de carvacrol em nanocápsulas produzidas com mucilagem de chia e mucilagem de linhaça representa uma tecnologia promissora para o controle de *Salmonella*, sendo necessários mais estudos para a aplicação dessas nanocápsulas em alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, F. **Ação antibacteriana de associações de antimicrobianos: nisina, óleos essenciais e compostos majoritários.** [S.l.]: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 2014.
- ARFA, A. BEN *et al.* Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, 2006. v. 43, n. 2, p. 149–154.
- ARIAS, J. L. *et al.* Stability of fenbendazole suspensions for veterinary use. Correlation between zeta potential and sedimentation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008. v. 34, n. 4–5, p. 257–262.
- ASBAHANI, A. El *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, 2015. v. 483, p. 220–243.
- AZEREDO, H. M. C. De. Encapsulação: Aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, 2005. v. 16, n. 1, p. 89–97.
- BARROS, D. De M. *et al.* Potencial Utilização de Sistemas Antimicrobianos Naturais como Conservantes Alimentares. **Brazilian Journal of Development**, 2020. v. 6, n. 6, p. 40476–40491.
- BHARGAVA, K. *et al.* Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, 2015. v. 47, p. 69–73. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.007>>.
- BLANCO-PADILLA, A. *et al.* Food antimicrobials nanocarriers. **Scientific World Journal**, 2014. v. 2014, p. 1–11.
- BORGES, M. De F.; ANDRADE, A. P. C. De; MACHADO, T. F. Salmonelose associada ao consumo de leite e produtos lácteos. **Embrapa Agroindústria Tropical Fortaleza**, 2010. Disponível em: <www.cnpat.embrapa.br>.
- BRANDELLI, A.; LOPES, N. A.; BOELTER, J. F. **Food applications of nanostructured antimicrobials.** London: Academic Press, 2017.
- BRASIL. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças**

Transmitidas por Alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

_____. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** Brasília: [s.n.], 2019.

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

CACCIATORE, F. A. *et al.* Carvacrol encapsulation into nanostructures: Characterization and antimicrobial activity against foodborne pathogens adhered to stainless steel. **Food Research International**, 2020. v. 133, n. December 2019, p. 109143. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109143>>.

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

CAMPO, C. *et al.* Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, 2017. v. 234, p. 1–9. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.153>>.

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

CUI, W.; MAZZA, G.; BILIADERIS, C. G. Chemical structure, molecular size distributions, and rheological properties of flaxseed gum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1994. v. 42, n. 9, p. 1891–1895.

CUSSOLIM, P. A. *et al.* Mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus* a antibióticos. **Revista Faculdades do Saber**, 2021. v. 6, n. 12, p. 831–43.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2011. v. 363, n. 1, p. 1–24. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017>>.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL [ECDC] & EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY [EFSA]. The European Union Summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**, 2018. v. 12, n. 2, p. 1–312. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2090.htm?WT.mc_id=EFSAHL01&mt=1>.

FATHI, M.; MOZAFARI, M.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, 2012. v. 23, n. 1, p. 13–27. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>>.

FELÍCIO, I. M. *et al.* Development and characterization of a carvacrol nanoemulsion and evaluation of its antimicrobial activity against selected food-related pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, 2020. p. 0–2.

FLORES, A. M. P.; MELO, C. B. De. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 2015. v. 37, n. 1, p. 65–72.

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

GRANATA, G. *et al.* Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. **Food Chemistry**, 2018. v. 269, n. June, p. 286–292.

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

HECKLER, C. *et al.* Thymol and carvacrol in nanoliposomes: Characterization and a comparison with free counterparts against planktonic and glass-adhered Salmonella.

Lwt, 2020. v. 127, n. January, p. 109382. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109382>>.

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

JANI, G. K. *et al.* Gums and mucilages : Versatile excipients for pharmaceutical formulations Gums and mucilages : versatile excipients for pharmaceutical formulations. 2009. v. 4, n. October 2009, p. 308–322.

JEEVANANDAM, J. *et al.* Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, 2018. v. 9, n. 1, p. 1050–1074.

KAEWMANEE, T. *et al.* Characterisation of mucilages extracted from seven Italian cultivars of flax. **Food Chemistry**, 2014. v. 148, p. 60–69. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.022>>.

KAUR, M.; KAUR, R.; PUNIA, S. Characterization of mucilages extracted from different flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) cultivars: A heteropolysaccharide with desirable functional and rheological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018. v. 117, p. 919–927. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.010>>.

KHAYATA, N. *et al.* Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method : From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, 2012. v. 423, n. 2, p. 419–427. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.016>>.

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

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

- KUMAR, D. D. *et al.* Function Formulation and characterization of nanoencapsulated curcumin using sodium caseinate and its incorporation in ice cream. **Food & Function**, 2016. v. 7, p. 417–424.
- LEE, B.; YUN, Y.; PARK, K. Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. **Chemical Engineering Science**, 2015. v. 125, p. 158–164. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2014.06.042>>.
- LERTSUTTHIWONG, P. *et al.* Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydrate Polymers**, 2008. v. 74, n. 2, p. 209–214. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.02.009>>.
- LU, C.; CHIU, H. Adsorption of zinc(II) from water with purified carbon nanotubes. **Chemical Engineering Science**, 2006. v. 61, n. 4, p. 1138–1145.
- MACHADO, B. A. S.; RIBEIRO, D. S.; DRUZIAN, J. I. Estudo prospectivo relativo à atividade antimicrobiana de algumas plantas aromáticas. **Cadernos de Prospecção**, 2013. v. 6, n. 1, p. 97–105.
- MAGI, G.; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. **Frontiers in Microbiology**, 2015. v. 6, n. MAR, p. 1–7.
- MALHEIROS, P. S. *et al.* Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, 2010. v. 27, n. 1, p. 175–178.
- MARINELI, R. Da S. *et al.* Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **LWT - Food Science and Technology**, 2014. v. 59, n. 2P2, p. 1304–1310. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.014>>.
- MARTINS, V. De C. *et al.* Nanotecnologia em Alimentos: Uma breve revisão. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, 2015. v. 7, n. 2, p. 25–42.
- Mayer, G. (2016). Exchange of genetic information. In: *Microbiology and Immunology On-line*, Hunt, R.C. editor. Disponível em: <<http://www.microbiologybook.org/mayer/genetic%20ex.htm>>

MOHAMMADI, G. *et al.* Preparation, physicochemical characterization and anti-fungal evaluation of the Nystatin-loaded Eudragit RS100/PLGA nanoparticles.

Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2017. v. 38, p. 90–96.

MORONES, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles.

Nanotechnology, 2005. v. 16, n. 10, p. 2346–2353.

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**, 2006. p. 2038–2045.

MUÑOZ, L. A.; COBOS, A.; *et al.* Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. **Journal of Food Engineering**, 2012. v. 108, n. 1, p. 216–224.

_____; AGUILERA, J. M.; *et al.* Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, 2012. v. 111, n. 3, p. 511–518.

NASRABADI, M. N. *et al.* Bioparticles of flaxseed protein and mucilage enhance the physical and oxidative stability of flaxseed oil emulsions as a potential natural alternative for synthetic surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2019.

v. 184, n. September, p. 110489. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110489>>.

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

NOTERMANS, S.; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A. Existing and emerging

foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, 1992. v. 15, n. 3–4, p. 197–205.

OLAIMAT, A. *et al.* Survival and inhibition of *Staphylococcus aureus* in commercial and hydrated tahini using acetic and citric acids. **Food Control**, 2017.

PASQUA, R. DI *et al.* Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007. v. 55, n. 12, p. 4863–4870.

POPA, V.-M. *et al.* Fatty acids composition and oil characteristics of linseed (*Linum*

Usitatissimum L.) from Romania. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, 2012. v. 18, n. 2, p. 136–140. Disponível em: <http://>.

QIAN, K. Y. *et al.* Flaxseed gum from flaxseed hulls: Extraction, fractionation, and characterization. **Food Hydrocolloids**, 2012. v. 28, n. 2, p. 275–283.

RADDI, M. S. G.; LEITE, C. Q. F.; MENDONÇA, C. P. Staphylococcus aureus: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, 1988. v. 22, n. 1, p. 36–40.

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

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

SANTOS, A. L. *et al.* Staphylococcus aureus: Visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2007. v. 43, n. 6, p. 413–423.

SANTOS, P. P. *et al.* Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends in Food Science and Technology**, 2016. v. 53, p. 23–33.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: Nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2003. v. 56, n. 3, p. 501–505.

SEGURA-CAMPOS, M. *et al.* Physicochemical characterization of chia (*Salvia hispanica*) seed oil from Yucatán, México. **Agricultural Sciences**, 2014. v. 5, n. 3, p. 220–226.

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

SEOW, Y. X. *et al.* Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2014. v. 54, n. 5, p. 625–644.

SHARIFI-RAD, M. *et al.* Carvacrol and human health: A comprehensive review.

Phytotherapy Research, 2018. v. 32, n. 9, p. 1675–1687.

SHINOHARA, N. *et al.* Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, 2008. v. 13, p. 1675–1683.

SHRESTHA, S. *et al.* Carvacrol antimicrobial wash treatments reduce *Campylobacter jejuni* and aerobic bacteria on broiler chicken skin. **Poultry Science**, 2019. v. 98, n. 9, p. 4073–4083.

SILVA, D. A. DA *et al.* Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, 2009. v. 29, n. 2, p. 437–441. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.029>>.

SILVA, S. *et al.* Nanoencapsulation of linseed oil with chia mucilage as structuring material: Characterization, stability and enrichment of orange juice. **Food Research International**, 2019. v. 120, n. July 2018, p. 872–879. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.052>>.

SILVESTRE, A. *et al.* Current applications of drug delivery nanosystems associated with antimicrobial photodynamic therapy for oral infections. **International Journal of Pharmaceutics**, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120078>>.

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

TAHERI, A.; JAFARI, S. M. Gum-based nanocarriers for the protection and delivery of food bioactive compounds. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2019. v. 269, p. 277–295. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.04.009>>.

TIMILSENA, Y. P. *et al.* Rheological and microstructural properties of the chia seed polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015. v. 81, p. 991–999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.040>>.

_____ *et al.* Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016. v. 91, p. 347–357. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.058>>.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999. v. 65, n. 10, p. 4606–4610.

_____; KETS, E.; SMID, J. Mecanismos of action of carvacrol on the Food-Borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999. v. 65, n. 10, p. 4606–4610.

VELDHUIZEN, E. J. A. *et al.* Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006. v. 54, n. 5, p. 1874–1879.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 1996. v. 20, p. 131–145.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2011. v. 63, n. 6, p. 456–469. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.001>>.

YADAV, G. D.; KAMBLE, S. B. Synthesis of carvacrol by Friedel-Crafts alkylation of o-cresol with isopropanol using superacidic catalyst UDCaT-5. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2009. v. 84, n. 10, p. 1499–1508.

ZIOLKOVSKA, A. Laws of flaxseed mucilage extraction. **Food Hydrocolloids**, 2012. v. 26, n. 1, p. 197–204. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.022>>.

ZUK, M. *et al.* Linseed, the multipurpose plant. **Industrial Crops and Products**, 2015. v. 75, p. 165–177. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.005>>.