

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

LOUISE THOMÉ CARDOSO

**NANOEMULSÕES CONTENDO CARVACROL: DESENVOLVIMENTO,  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA SANITIZAÇÃO DE ALFACES**

PORTO ALEGRE

2022

LOUISE THOMÉ CARDOSO

**NANOEMULSÕES CONTENDO CARVACROL: DESENVOLVIMENTO,  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA SANITIZAÇÃO DE ALFACES**

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

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Patrícia da Silva Malheiros

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Renata Vidor Contri

PORTO ALEGRE

2022

## CIP - Catalogação na Publicação

Thomé Cardoso, Louise

Nanoemulsões contendo carvacrol: desenvolvimento, caracterização e aplicação na sanitização de alfaces / Louise Thomé Cardoso. -- 2022.

144 f.

Orientadora: Patrícia da Silva Malheiros.

Coorientadora: Renata Vidor Contri.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. carvacrol. 2. nanoemulsão . 3. atividade antimicrobiana. 4. sanitização. 5. alface. I. da Silva Malheiros, Patrícia, orient. II. Vidor Contri, Renata, coorient. III. Título.

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

Autora: Louise Thomé Cardoso (Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia/Universidade Estadual do Rio Grande do Sul)

Título da Dissertação: Nanoemulsões contendo carvacrol: desenvolvimento, caracterização e aplicação na sanitização de alfaces

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

Aprovada em: 20/10/2022

**Comissão Examinadora**

---

Prof. Dr. Adriano Brandelli  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Luiza Abrahão Frank  
Centro Universitário Ritter dos Reis

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Susana de Oliveira Elias  
Centro Universitário Estácio

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Rosângela pelo amor, amizade, esperança e porto-seguro em situações difíceis, apoio emocional e financeiro e por todos os momentos de incentivo aos meus sonhos. À minha vó Bernadina (*in memoriam*) pelo amor, cuidados, disciplina e paciência. À minha irmã Aline pelo apoio, carinho e conselhos em diversas circunstâncias. À minha sobrinha Julia por todos os momentos de brincadeiras e de ternura.

À orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Malheiros pelo incentivo com o projeto, visão prática, disponibilidade, confiança e ensinamentos.

À coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Contri pela persistência durante a formulação das nanoemulsões, ensinamentos e disponibilidade.

Aos professores Dr. Eduardo Tondo e Dr. Adriano Brandelli pela disponibilidade de equipamentos, os quais foram essenciais para realização dos experimentos.

Ao professor Dr. Arthur Fett-Neto e a Dr.<sup>a</sup> Yve Magedans pela colaboração com a extração e gentil doação do extrato de saponina.

A todos técnicos do ICTA, em especial, Michelle, Ana, Priscilla e Jorge pelo auxílio com equipamentos durante análises e pela atenção. À colega Márcia pelas conversas e almoços no RU. Ao Diogo pela gentileza e auxílio com a manutenção de equipamentos.

Ao Danicler e a Karen pela amizade nos corredores do ICTA, sempre com sorrisos, gentilezas e companhia em dias que ficava até fechar a portaria.

Ao ICTA pela infraestrutura dos laboratórios e das salas de aulas.

Aos professores da banca avaliadora, os quais disponibilizaram tempo para leitura e avaliação deste trabalho. A todos os professores da UFRGS e do PPGCTA pelos conhecimentos e aulas enriquecedoras e motivadoras. Em especial, à professora Viviani Ruffo pela amizade e pelos momentos de incentivo ao longo do Mestrado.

Às bolsistas, em especial, Bibiana e Julia. À Fabíola, pelos conselhos e pela sua amizade. À Thaís pela sua motivação e organização. À Aline Bitello pela sua amizade e incentivo diário. À Giulia por todo entusiasmo e companheirismo ao longo do Mestrado. À pós-doutora Nyelle pelas suas dicas e coleguismo no laboratório. Aos pós-doutores sempre prestativos, Flávio, Cristian e Henrique. Aos amigos da UFRGS, que tiveram presentes em diversos momentos, principalmente Vera e Carolini.

Muito obrigada a todos pelas palavras e gentilezas ao longo desta jornada.

## RESUMO

Os compostos antimicrobianos naturais, como os ácidos orgânicos e os óleos essenciais, têm demonstrado ser promissores na sanitização de vegetais visando a segurança destes alimentos. Nanoemulsões podem aumentar a estabilidade e permitir a liberação controlada destes compostos, porém se tem pouco conhecimento sobre seus efeitos na sanitização de vegetais. Diante disso, foi realizada uma revisão bibliográfica utilizando artigos publicados em inglês, entre 2012 a 2022, com o objetivo de identificar fatores que influencia a aplicação de nanoemulsões (NE) antimicrobianas em vegetais. As publicações (17 no total) reportaram que a ação da NE em vegetais frescos depende da composição e dos métodos de produção, bem como da técnica de aplicação sob a superfície vegetal. Posteriormente, neste trabalho, foram desenvolvidas nanoemulsões de carvacrol por ultrassom de ponteira utilizando surfactante natural (saponina - NCS) ou sintético (polisorbato 80 - NCP) com quantidades variáveis de triglicerídeos de cadeia média (TCM): 5,50 mg/mL de TCM (NCP1 e NCS1) e 22,0 mg/mL de TCM (NCP2 e NCS2). Todas as formulações apresentaram diâmetros médios apropriados (de 74,7 nm a 168,2 nm) e alta eficiência de encapsulação do carvacrol (EE) (de 89,5% a 91,5%). As nanoemulsões de carvacrol com saponina (NCS1 e NCS2) demonstraram ter distribuição de gotas adequada (índice de PDI < 0,22) e apresentaram alta carga superficial (potencial zeta < -30 mV) em comparação com àquelas que continham polisorbato 80. A Concentração de Inativação Bacteriana (CIB) é uma metodologia adaptada da Concentração Bactericida Mínima (CBM). As nanoemulsões de carvacrol tiveram CIB contra o coquetel de *Salmonella* de 5,51 a 0,69 mg/mL e para o coquetel de *E. coli* de 1,84 a 0,69 mg/mL. As formulações com baixo teor de TCM (NCP1 e NCS1) tiveram efeito bactericida em baixas CIB (1,15 a 0,69 mg/mL). Entre todas as nanoemulsões testadas, NCS1 mostrou a menor CIB (0,69 mg/mL) contra ambos os coquetéis bacterianos. Na sanitização de alfaces, o NCS1 mostrou efeito semelhante ao do carvacrol não-encapsulado com uma alta redução bacteriana (> 3 log CFU/g) após a imersão da alface por 15 min a 2×CIB. A NCS1 demonstrou melhor eficácia na redução dos coquetéis bacterianos (> 3 log UFC/g) quando comparada com ácido acético e ácido cítrico (que reduziu < 3 log UFC/g para os dois coquetéis bacterianos). Enquanto isso, NCS1 (2×CIB), comparada à solução de hipoclorito de sódio (150 ppm), obteve reduções superiores para *Salmonella* (> 3 log CFU/g) e similares para *E. coli* ( $\cong$  3 log CFU/g) após a imersão da alface por 15 min. A imersão de alface em NCS1 durante 15 min, para ambas concentrações de carvacrol (CIB e 2×CIB) não teve impacto significativo na cor e na firmeza das amostras. Por outro lado, o tratamento das alfaces com carvacrol não-encapsulado na 2×CIB escureceu e reduziu a firmeza das alfaces tratadas. Conseqüentemente, a nanoemulsão de carvacrol-saponina (NCS1) provou ser um sanitizante potencial para a alface.

**Palavras-chave:** carvacrol; nanoemulsão; atividade antimicrobiana; sanitização; alface.

## ABSTRACT

Natural antimicrobial compounds, such as organic acids and essential oils, can be promising sanitizers for vegetables. Encapsulation of these compounds in nanoemulsions can increase their stability and allow controlled release of the bioactive compound. However, some factors may influence the antimicrobial activity of nanoemulsions applied on vegetables. For this reason, a review of articles published between 2012 and 2022 was conducted with the aim of investigating the application of antimicrobial nanoemulsions (NE) applied to vegetables. The publications (17 in total) reported that the action of NE on fresh vegetables depends on the composition and production methods, as well as, the technique of NE application on the vegetable surface. Subsequently, in this work, carvacrol nanoemulsions were developed by probe sonication using natural surfactant (saponin - CNS) or synthetic (polysorbate 80 - CNP) with varying amounts of medium-chain triglycerides (MCT): 5.50 mg/mL of MCT (CNP1 and CNS1) and 22.0 mg/mL of TCM (CNP2 and CNS2). All formulations showed appropriate droplet sizes (from 74.7 nm to 168.2 nm) and high encapsulation efficiency of carvacrol (EE) (from 89.5% to 91.5%). Carvacrol nanoemulsion with saponin (CNS1 and CNS2) demonstrated to have adequate droplet distribution (PDI index < 0.22) and presented high surface charge (zeta potential < -30 mV) compared to those containing polysorbate 80. The Bacterial Inactivation Concentration (BIC) is a methodology adapted from the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Carvacrol nanoemulsions had BIC against *Salmonella* cocktail from 5.51 to 0.69 mg/mL and for *E. coli* cocktail from 1.84 to 0.69 mg/mL. Formulations with low MCT content (CNP1 and CNS1) had bactericidal effect at low BIC (1.15 to 0.69 mg/mL). Among all tested nanoemulsions, CNS1 showed the lowest BIC (0.69 mg/mL) against both bacterial cocktails. For lettuce sanitization, CNS1 showed similar effect to unencapsulated carvacrol with a high bacterial reduction (> 3 log CFU/g) after lettuce immersion for 15 min at 2×BIC. The CNS1 demonstrated better efficacy in reducing both tested bacterial cocktails (> 3 log CFU/g) when compared to acetic and citric acids (that reduced < 3 log CFU/g for bacterial cocktails). Meanwhile, CNS1 (2×BIC), compared to sodium hypochlorite solution (150 ppm), achieved superior reductions for *Salmonella* (> 3 log CFU/g) and similar for *E. coli* ( $\cong$  3 log CFU/g) after immersion of lettuce for 15 min. Immersion of lettuce in CNS1 for 15 min for both concentrations of carvacrol (BIC and 2×BIC) had no significant impact on the color and firmness of the samples. On the other hand, treating lettuce with non-encapsulated carvacrol at 2×BIC darkened and reduced the firmness of the treated lettuce. Consequently, the carvacrol-saponin nanoemulsion (CNS1) proved to be a potential sanitizer for lettuce.

**Keywords:** carvacrol; nanoemulsion; antimicrobial activity; sanitization; lettuce.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1 – Revisão da literatura

Figura 1 – Diagrama de fluxo do processamento mínimo de frutas e vegetais.....	19
Figura 2 – Variedades de cultivares de alface.....	21
Figura 3 – Diagrama das rotas de contaminação de alfaces.....	23
Figura 4 – Estrutura química do carvacrol.....	30
Quadro 1– Principais propriedades de nanocarreadores contendo carvacrol em estudos realizados pelo grupo de pesquisa.....	33

### Capítulo 2 – Artigo 1

Figure 1 – Flowchart of the review of publications in databases on sanitizing nanoemulsions applied to fresh vegetables.....	44
Figure 2 – Main factors that influence the antimicrobial effectiveness of nanoemulsions as sanitizers applied to fresh vegetables.....	45
Figure 3 – High-energy approaches to nanoemulsion production.....	59
Figure 4 – Low-energy approaches to nanoemulsion production.....	61
Figure 5 – Nanoemulsion unstable processes.....	63
Figure 6 – Application techniques of antimicrobial nanoemulsions for vegetable decontamination.....	65

### Capítulo 2 – Artigo 2

Figure 1 – Carvacrol nanoemulsion (stable) and unencapsulated carvacrol (unstable) after 30 days.....	95
Figure 2 – Bacterial population on lettuce samples after treatments with carvacrol nanoemulsion (CNS1) and carvacrol emulsions (UCS1).....	100
Figure 3 – Comparison of the bacterial population on lettuce samples after rinsing with antimicrobial agents for 15 min.....	102
Figure 4 – Color differences in lettuce treated with carvacrol nanoemulsion (CNS1) and unencapsulated carvacrol (UCS1) after 15 min immersion.....	104



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2 – Artigo 1

Table 1 – Update (publications of 2012 to 2022) about application of antimicrobial nanoemulsions for fresh vegetable sanitization.....	46
Table 2 – Application of antimicrobial nanoemulsions (publications of 2012 to 2022) for fresh vegetable sanitization.....	51

### Capítulo 2 – Artigo 2

Table 1 – Composition of the developed nanoemulsion formulations.....	86
Table 2 – Droplet size, Polydispersity index (PDI), Zeta Potential (ZP) and Encapsulation Efficiency (EE%) of carvacrol nanoemulsions with saponin (CNS1 and CNS2) and with polysorbate 80 (CNP1 and CNP2) in the day of production.....	93
Table 3 – Droplet size, Polydispersity index (PDI) and Zeta Potential (ZP) of carvacrol nanoemulsions with polysorbate 80 (CNP1 and CNP2) and with saponin (CNS1 and CNS2) after 30 days in storage.....	95
Table 4 – Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Bactericidal Inactivation Concentration (BIC) of formulations against <i>Salmonella</i> and <i>E. coli</i> cocktails after 30 days of storage at 5 °C and 25 °C.....	97
Table 5 – Color parameters of lettuce samples treated with carvacrol nanoemulsions and unencapsulated carvacrol.....	103

### Apêndices

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração de Inativação Bacteriana (CIB) das formulações contra coquetéis de <i>Salmonella</i> e de <i>E. coli</i> no dia da produção.....	141
Tabela 2 – Contagem de células viáveis de <i>Salmonella</i> e de <i>E. coli</i> após imersão de alfaces artificialmente contaminadas com essas bactérias em nanoemulsão de carvacrol (NCS1) e em carvacrol não-encapsulado (CNES1).....	142
Tabela 3 – Contagem de células viáveis de <i>Salmonella</i> e <i>E. coli</i> após imersão de alfaces artificialmente contaminadas com essas bactérias em solução de hipoclorito de sódio (100 ppm e 150 ppm).....	143
Tabela 4 – Contagem de células viáveis de <i>Salmonella</i> e <i>E. coli</i> após imersão de alfaces artificialmente contaminadas com essas bactérias em ácido acético e ácido cítrico.....	143

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%</b>	percentual
<b>®</b>	marca registrada
<b>°C</b>	graus Celsius
<b>A/O</b>	emulsão de água em óleo
<b>µL</b>	microlitro
<b>µg</b>	micrograma
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>BIC</b>	<i>Bactericidal Inactivation Concentration</i>
<b>CFU</b>	<i>Colony Forming Unit</i>
<b>CIB</b>	Concentração de Inativação Bacteriana
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CN</b>	<i>Carvacrol Nanoemulsion</i>
<b>CE</b>	<i>Carvacrol Emulsion</i>
<b>CNE</b>	Carvacrol não-encapsulado
<b>EE</b>	Eficiência de Encapsulação
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GRAS</b>	<i>Generally Recognized as Safe</i>
<b>ICTA</b>	Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MIC</b>	<i>Minimum Inibitory Concentration</i>
<b>MCT</b>	<i>Medium-chain triglycerides</i>
<b>mV</b>	milivolt
<b>NC</b>	Nanoemulsão de Carvacrol
<b>nm</b>	nanômetro
<b>O/A</b>	emulsão de óleo em água
<b>PDI</b>	<i>Polydispersity Index</i>
<b>TCM</b>	Triglicerídeos de cadeia média
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>WHO</b>	<i>World and Health Organization</i>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
	<b>CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
3	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
3.1	ALIMENTOS VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS.....	18
3.1.1	<b>Alface</b> .....	21
3.2	MICROORGANISMOS CAUSADORES DE TOXINFECÇÕES ALIMENTARES RELACIONADOS A ALIMENTOS MINIMAMENTE PROCESSADOS.....	22
3.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	24
3.2.2	<i>Salmonella spp</i> .....	25
3.3	HIGIENIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE VEGETAIS.....	25
3.3.1	<b>Sanitizantes em alimentos vegetais</b> .....	26
3.3.2	<b>Conservação dos alimentos minimamente processados</b> .....	27
3.4	EFEITO ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA SANITIZAÇÃO DE VEGETAIS.....	28
3.4.1	<b>Carvacrol</b> .....	29
3.5	NANOMATERIAIS CARREADORES DE CARVACROL.....	31
3.5.1	<b>Nanoemulsões</b> .....	34
	<b>CAPÍTULO 2 – ARTIGOS</b> .....	37
4	<b>METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
4.1	ARTIGO 1	
	<b>PROPERTIES AND APPLICATIONS OF NATURAL ANTIMICROBIAL-LOADED NANOEMULSIONS AS AN ALTERNATIVE TO CONVENTIONAL SANITIZERS FOR FRESH VEGETABLES: A REVIEW</b> .....	39
	<b>ABSTRACT</b> .....	40
1	<b>INTRODUCTION</b> .....	41

<b>2 NATURAL NANOEMULSIONS FOR FRESH VEGETABLE APPLICATION.....</b>	<b>43</b>
2.1 COMPOSITION OF ANTIMICROBIAL NANOEMULSIONS.....	56
2.2 NANOEMULSION PRODUCTION METHODS.....	58
2.3 NANOEMULSIONS PROPERTIES.....	62
2.4 APPLICATION TECHNIQUES IN FRESH VEGETABLE SANITIZATION.	64
<b>3 LIMITATIONS AND PERSPECTIVES.....</b>	<b>67</b>
<b>4 CONCLUSION.....</b>	<b>68</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>69</b>
4.2 ARTIGO 2	
<b>CARVACROL-LOADED NANOEMULSIONS PRODUCED WITH A NATURAL EMULSIFIER FOR LETTUCE SANITIZATION.....</b>	<b>81</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>82</b>
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>83</b>
<b>2 MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>85</b>
2.1 MATERIALS.....	85
2.2 PREPARATION OF CARVACROL NANOEMULSIONS.....	85
2.3 PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATIONS OF NANOEMULSIONS...	87
<b>2.3.1 Droplet size, polydispersity index and zeta potential.....</b>	<b>87</b>
<b>2.3.2 Encapsulation efficiency (EE).....</b>	<b>87</b>
<b>2.3.3 Storage stability.....</b>	<b>88</b>
2.4 EVALUATION OF THE NANOEMULSIONS' ANTIMICROBIAL ACTIVITY.....	88
<b>2.4.1 Bacterial cultures.....</b>	<b>88</b>
<b>2.4.2 MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and BIC (Bactericidal Inactivation Concentration).....</b>	<b>89</b>
2.5 LETTUCE SANITIZATION USING CARVACROL NANOEMULSION...	89
<b>2.5.1 Lettuce sample preparation and artificial bacterial contamination.....</b>	<b>89</b>
<b>2.5.2 Preparation of the antimicrobial solutions.....</b>	<b>90</b>
<b>2.5.3 Lettuce sanitization treatments.....</b>	<b>90</b>
2.6 COLOR AND TEXTURE ANALYSIS OF LETTUCE TREATED WITH CARVACROL.....	91
2.7 STATISTICAL ANALYSIS.....	92

<b>3 RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>92</b>
3.1 PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATIONS OF NANOEMULSIONS...	92
3.2 STORAGE STABILITY.....	94
3.3 <i>IN VITRO</i> ANTIMICROBIAL EFFECT OF CARVACROL LOADED NANOEMULSIONS AGAINST <i>Salmonella</i> AND <i>Escherichia coli</i> .....	96
3.4 EFFECTIVENESS OF CARVACROL NANOEMULSION IN THE SANITIZATION OF FRESH LETTUCE.....	99
3.5 COLOR AND TEXTURE CHANGES IN LETTUCE TREATED WITH NANOEMULSION AND CARVACROL EMULSION.....	103
<b>4 CONCLUSION.....</b>	<b>105</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>106</b>
<b>CAPÍTULO 3 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO.....</b>	<b>116</b>
<b>5 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>117</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>122</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>123</b>
<b>APÊNDICE A – DADOS SUPLEMENTARES DO EFEITO ANTIMICROBIANO <i>IN VITRO</i> DOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS...</b>	<b>141</b>
<b>APÊNDICE B – DADOS SUPLEMENTARES DA APLICAÇÃO DE NANOEMULSÃO DE CARVACROL E DE CARVACROL NÃO- ENCAPSULADO EM ALFACES.....</b>	<b>142</b>
<b>APÊNDICE C – DADOS SUPLEMENTARES DA APLICAÇÃO DE SANITIZANTES EM ALFACES.....</b>	<b>143</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, uma das hortaliças mais consumida é a alface (SHATILOV; RAZIN; IVANOVA, 2019). Popularmente, as folhas de alface são consumidas cruas, e atualmente, o setor demonstra crescente aceitabilidade por saladas verdes higienizadas prontas para o consumo (JASPER; ELMORE; WAGSTAFF, 2021). A alface é uma fonte de compostos bioativos benéficos à saúde, tais como folatos, carotenoides (principalmente  $\beta$ -caroteno) e compostos fenólicos, com variações nos teores entre os cultivares (KIM *et al.*, 2016). Além disso, essa hortaliça é uma fonte de fibras alimentares, as quais a ingestão regular está associada ao aumento do metabolismo de glicose e redução do colesterol e da pressão arterial (KIM *et al.*, 2016).

A contaminação microbiana pode acontecer por diferentes rotas durante o cultivo e a colheita de vegetais, bem como devido às operações pós-colheita por influência humana, animal e ambiental (STUART, 2011). Uma das fontes de contaminação mais recorrente é a água de irrigação, principalmente, contaminada por fezes e de baixa potabilidade (CEUPPENS *et al.*, 2014). Durante o cultivo, as folhas podem ser facilmente lesionadas por cortes, facilitando a colonização dos tecidos internos por microrganismos (YARON; RÖMLING, 2014). Sabe-se que alfaces são produtos frescos e minimamente processados que podem ser importantes veículos de microrganismos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (POTHAKOS *et al.*, 2014). Os estudos demonstram que patógenos, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* podem contaminar saladas embaladas (CDC, 2022; KHALIL, 2016). Em estudo sobre surtos de DTA relacionados a alfaces minimamente processadas no Brasil, *Salmonella* spp. foi o agente mais frequente, seguida por *E. coli* (ELIAS; NORONHA; TONDO, 2018a).

Visando a garantia da segurança microbiológica deste alimento, um dos agentes químicos mais utilizados como sanitizante são os liberadores de cloro, devido ao seu baixo custo e amplo espectro de ação antimicrobiana. A água clorada (50 a 200 ppm) é recomendada na sanitização de hortaliças, porém sua interação com matéria orgânica pode vir a formar subprodutos halogenados, como trihalometanos e ácidos haloacéticos (PAN; AKANO, 2014). Diversas alternativas ao cloro, tais como ozônio, ácidos orgânicos e óleos essenciais têm demonstrado potencial de uso em hortaliças nos últimos anos (CIMOWSKY *et al.*, 2022; MILLAN-SANGO *et al.*, 2016; MOUATCHO *et al.*, 2017; PARK; KANG; HA, 2016; SANTOS *et al.*, 2015).

Os óleos essenciais (OE) apresentam mecanismos de inativação bacteriana, devido a ação dos constituintes presentes, tais como terpenos, terpenoides e fenilpropenos (BHAVANIRAMYA; VISHNUPRIYA; AL-ABOODY, 2019; FALLEH *et al.*, 2020). Entre estes, o carvacrol é um monoterpenoide presente em vários OE de espécies de *Lamiaceae*, principalmente do orégano (*Origanum vulgare*) (SHARIFI-RAD *et al.*, 2018). O carvacrol apresenta ação antimicrobiana descrita devido, principalmente, aos seguintes mecanismos: a) alterações estruturais e funcionais da membrana bacteriana; b) interferência no transporte de íons através da membrana bacteriana; c) perturbações na síntese da flagelina que afeta a motilidade das bactérias (KHORSHIDIAN *et al.*, 2018; MARINELLI; DI STEFANO; CACCIATORE, 2018). Além disso, este composto pode ser aplicado a alimentos, visto que é reconhecido como seguro (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2019).

Apesar de vantajosas propriedades do carvacrol para aplicação em hortaliças, há limitações do seu uso, tais como: baixa solubilidade em água e estabilidade, alta volatilidade e fortes características organolépticas (CALO *et al.*, 2015). Uma solução é o uso promissor de nanocarreadores (BAJPAI *et al.*, 2018). As nanoemulsões são exemplos destes sistemas com dimensões de 20 nm a 500 nm, que são formadas por uma fase aquosa, uma fase orgânica e uma película interfacial de moléculas tensoativas (VAISHANAVI; PREETHA, 2020). Em virtude do pequeno tamanho de gotas, as nanoemulsões estabilizam o carvacrol e melhoram a sua solubilidade e estabilidade durante o armazenamento (GUPTA *et al.*, 2016). No entanto, as nanoemulsões são suscetíveis ao amadurecimento de Ostwald, que causa a separação gravitacional dos componentes (LIU *et al.*, 2019). Algumas estratégias podem ser utilizadas para evitar este fenômeno, tais como processamento em alta energia (ultrassom, alta-pressão, rotor-estator e microfluidização), a adição de uma fase orgânica com triglicerídeos de cadeia média e baixas concentrações de emulsificantes (entre 1 % a 3 %) (HENRY *et al.*, 2010; ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2020).

O emulsificante é o componente primordial na formação de nanoemulsões, pois reduz a tensão superficial entre a fase oleosa e a fase aquosa e aumenta a solubilidade de compostos ativos oleosos no sistema (LIU *et al.*, 2019). Entre eles, os mais utilizados em produtos farmacêuticos e alimentícios são os polisorbatos, os quais são surfactantes hidrofílicos não-iônicos (VAISHANAVI; PREETHA, 2020). Em estudos, a aplicação do polisorbato possibilitou a formação de nanoemulsões estáveis contendo carvacrol (TAŞTAN *et al.*, 2017; PRAKASH *et al.*, 2018; LEI *et al.*, 2019). Entretanto, a indústria de alimentos tem demonstrado interesse em alternativas naturais voltadas para a preferência do consumidor por produtos “*clean label*” (NOGUEROL *et al.*, 2021). Em alternativa, a saponina é um emulsificante

natural, extraída de *Quillaja*, planta nativa da América do Sul (FLECK *et al.*, 2019). Em razão da sua estrutura anfifílica, a saponina é um excelente emulsificante biodegradável para sistemas de encapsulamento de OE e seus componentes, e forma nanoemulsões com elevada estabilidade (temperatura, pH, condições salinas) durante o armazenamento (FLECK *et al.*, 2019).

Atualmente, ainda é um desafio o uso de carvacrol emulsionado com saponina em matriz vegetal (ZHANG; TAN; MCCLEMENTS, 2021). Até o presente momento não foi explorado nanoemulsões contendo carvacrol com saponina aplicadas na sanitização de alfaces. Além disso, há lacunas sobre os efeitos da aplicação do carvacrol sob a qualidade sensorial (cor e textura) de alfaces (CHENG *et al.*, 2017; SOW *et al.*, 2017; VIACAVA *et al.*, 2018; WIECZYŃSKA; CAVOSKI, 2018). Diante disso, neste trabalho foram produzidas pelo método de alta-energia (sonicação) nanoemulsões contendo carvacrol com emulsificante natural (saponina) em comparação ao sintético (polisorbato 80) e caracterizadas quanto às propriedades físico-químicas e ao efeito antimicrobiano *in vitro*. Estes sistemas também foram avaliados quanto a eficácia antimicrobiana na sanitização de alfaces, bem como se houve alterações nos parâmetros (cor e textura) das hortaliças tratadas.



## 2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho serão apresentados a seguir.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanoemulsões contendo carvacrol visando a inibição de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. na sanitização de alface.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- a. Fundamentar sobre as propriedades, os métodos de produção e as técnicas de aplicação de nanoemulsões antimicrobianas na sanitização de vegetais frescos através de uma revisão de artigos publicados;
- b. Desenvolver nanoemulsões contendo carvacrol com emulsificante natural (saponina) em comparação ao sintético (polisorbato 80);
- c. Caracterizar as propriedades físico-químicas das nanoemulsões contendo carvacrol em relação ao diâmetro médio, potencial zeta e índice de polidispersão, bem como sua estabilidade durante o armazenamento e a eficiência de encapsulação;
- d. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração de Inativação Bacteriana (CIB) das nanoemulsões contendo carvacrol contra coquetel de *E. coli* e coquetel de *Salmonella* spp.;
- e. Avaliar o efeito antimicrobiano da nanoemulsão contendo carvacrol contra coquetéis bacterianos (*E. coli* ou *Salmonella* spp.) inoculados artificialmente em alfaces;
- f. Comparar a ação antimicrobiana da nanoemulsão de carvacrol com o carvacrol não-encapsulado e também com outros sanitizantes (hipoclorito de sódio, ácido acético e ácido cítrico) em alfaces contaminadas artificialmente (*E. coli* ou *Salmonella* spp.);
- g. Avaliar cor e textura de alfaces tratadas com a nanoemulsão contendo carvacrol e com carvacrol não-encapsulado em comparação ao vegetal *in natura*.

## **CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA**

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Neste tópico serão revisados os conceitos teóricos, tais como: alimentos minimamente processados, higienização e conservação de vegetais frescos, microrganismos causadores de toxinfecções alimentares associados a alface, óleos essenciais com efeito antimicrobiano e nanomateriais carreadores de antimicrobianos.

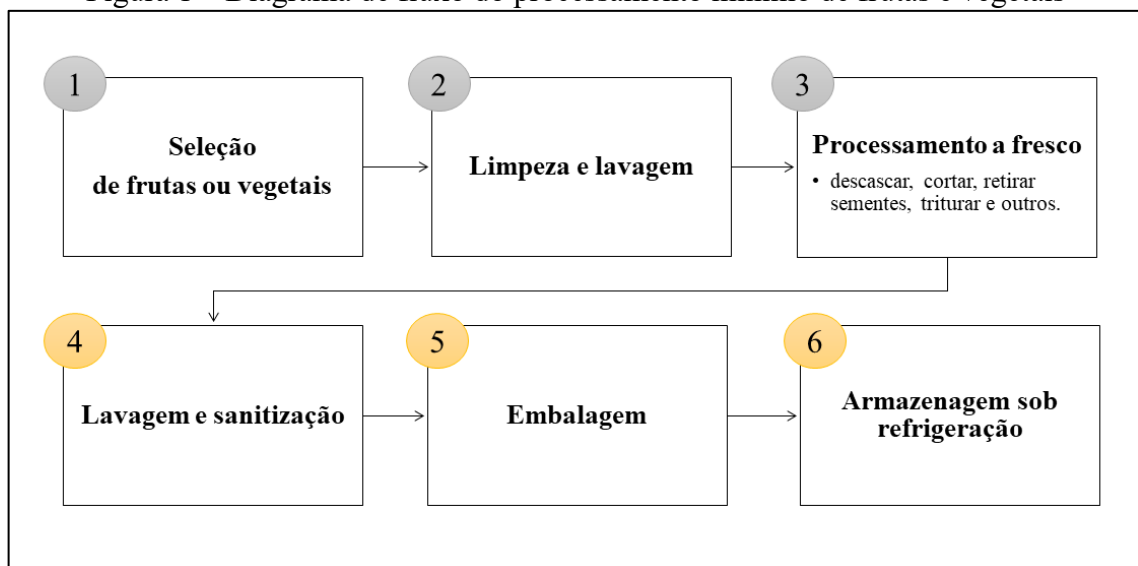
#### 3.1 ALIMENTOS VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS

Os alimentos são classificados, segundo a *Food Classification for public health*, em quatro grupos, sendo estes: ultraprocessados, processados, ingredientes culinários processados e minimamente processados (MONTEIRO *et al.*, 2016). Os produtos alimentícios ultraprocessados são formulações com cinco ou mais ingredientes adicionados de aditivos alimentares, por exemplo, refrigerantes e biscoitos recheados. Em contrapartida, os processados apresentam até três ingredientes com adição de açúcar, óleo, sal e são fabricados por métodos de cozimento e fermentação alcoólica, por exemplo, pães e queijos (MONTEIRO *et al.*, 2016; FARDET, 2018). Os ingredientes culinários processados consistem em substâncias obtidas diretamente das matérias-primas por processos como prensagem, refinação, moagem e secagem. Neste grupo estão inclusos: sal, açúcar, mel, óleos vegetais, manteiga e amidos (MONTEIRO *et al.*, 2016; FARDET, 2018).

Os alimentos minimamente processados compreendem àqueles que são obtidos de plantas ou de animais, sendo disponibilizados ao consumo com poucas modificações sobre os atributos de qualidade durante o seu processamento e armazenamento (ALZAMORA *et al.*, 2015). Estes são divididos em duas categorias gerais, tais como: a de fonte vegetal, que engloba frutas e vegetais; e a de origem animal, como carnes de aves, bovina, suína e pescados (BANSAL; SIDDIQUI; RAHMAN, 2015; DE CORATO, 2020). Os produtos minimamente processados de fonte vegetal recebem diferentes denominações, tais como: “prontos para comer”, “pré-cortados” e “frescos” (GROSS; WANG; SALTVEIT, 2016). Estes consistem em frutas e vegetais crus, os quais foram submetidos a algumas etapas de preparo mínimo, visando a substituição dos métodos térmicos e químicos de conservação (SIDDIQUI *et al.*, 2011). Este processamento deve manter os níveis de qualidade nutricional e sensorial dos alimentos e aumentar a vida útil do transporte até o consumo, cerca de 5 a 7 dias a 4 °C (RAMOS *et al.*, 2013; DE CORATO, 2020).

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA, 2008), as operações unitárias do processamento mínimo de frutas e vegetais incluem, conforme Figura 1, as seguintes etapas: seleção, limpeza, lavagem, processamento a fresco (corte, descascamento e outros), higienização, embalagem e armazenamento sob refrigeração (RAMOS *et al.*, 2013). No Brasil, as portarias SES/RS n° 90 de 2017 e SES/RS n° 635 de 2019, dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação e Procedimentos Operacionais Padronizados para a industrialização de frutas e vegetais minimamente processados. Segundo estas diretrizes, as frutas e vegetais são submetidos aos mesmos tratamentos elucidados pela FDA (2008), porém há a adição da enxágue, centrifugação, após o processamento a fresco (BRASIL 2017; BRASIL 2019).

Figura 1 – Diagrama de fluxo do processamento mínimo de frutas e vegetais



Fonte: Adaptado de Siddiqui *et al.* (2011).

Na etapa de seleção é realizada uma separação, normalmente manual, dos produtos aceitáveis, através da remoção de defeitos fisiológicos dos alimentos crus, como talos, sementes, folhas e frutos danificados (SIDDQUI *et al.*, 2011). A lavagem inicial com água potável é projetada para remover sujeiras, pesticidas e microrganismos não aderidos a superfície (BRASIL, 2019). A próxima etapa, o processamento a fresco, envolve várias etapas, sendo a principal o descascamento. Este é comum para frutas cítricas e tubérculos, em que se remove porções não comestíveis, como casca e sementes (SIDDQUI *et al.*, 2011). A operação de descascamento pode ser realizada das seguintes formas: manual (uso de faca e lâmina), mecânica (dispositivos abrasivos, roletes, facas e lâminas), química, enzimática e térmica (calor seco, calor úmido, jatos de vapor ou a vácuo) (BANSAL; SIDDQUI; RAHMAN, 2015-).

Durante as etapas de descascamento e corte, pode-se causar lesões ao tecido vegetal, as quais expõe o produto às enzimas oxidantes e aos microrganismos (ALLENDE; AGUAYO; ARTÉS, 2004). Além disso, vegetais crus apresentam contaminações microbianas provenientes do manuseio durante o pós-colheita (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Assim, sem a higienização adequada, vegetais e frutas minimamente processados podem causar doenças na população (RAMOS *et al.*, 2013; DE CORATO, 2020). Visando garantir a segurança microbiológica destes alimentos, realiza-se a etapa de lavagem e sanitização. Este processo envolve o uso de métodos físicos e/ou químicos na higienização dos alimentos, com o objetivo de reduzir a quantidade de microrganismos patogênicos e deteriorantes em níveis recomendados (BANSAL; SIDDIQUI; RAHMAN, 2015-). Após, utiliza-se o enxágue do sanitizante, normalmente, realizada com água gelada, de modo a resfriar os produtos antes da embalagem (SIDDIQUI *et al.*, 2011).

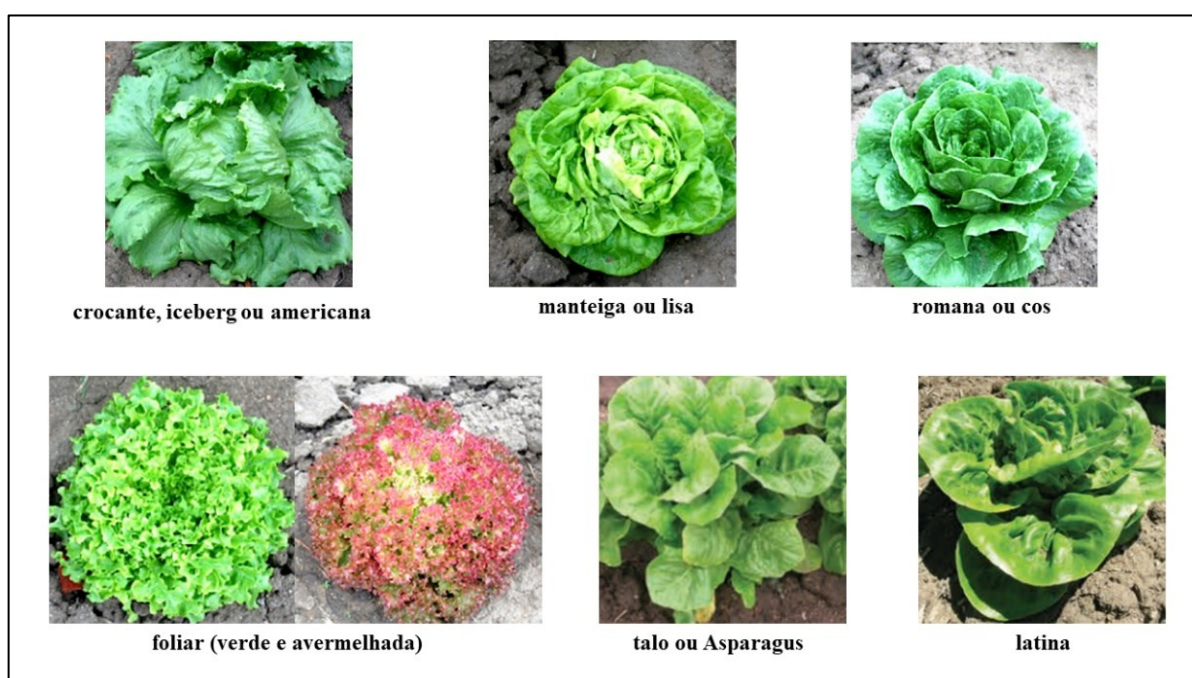
Recomenda-se que, após o enxágue, vegetais folhosos sejam submetidos a secagem manual ou em centrífugas, para evitar excesso de água no armazenamento (BRASIL, 2017). Após, os vegetais e frutas minimamente processados são embalados, visando garantir proteção contra contaminações microbianas e reduzir as taxas de respiração destes alimentos (RAMOS *et al.*, 2013). Considera-se que um sistema de embalagem eficaz é a garantia da vida útil prolongada, e para isso utiliza-se embalagens de polietileno rígido, bandejas de isopor com filme plástico, saco plásticos transparentes com atmosfera modificada ou controlada (DE CORATO, 2020). A última etapa é o armazenamento sob refrigeração, o qual é o principal meio de conservação destes alimentos. Este método envolve condições de baixa temperatura (faixa de 0 °C a 5 °C) pós-processamento e em pontos de varejo até o consumidor, com o objetivo de manter o frescor, o valor nutricional e o sabor por até 7 dias (DE CORATO, 2020).

A maioria dos vegetais frescos disponíveis aos consumidores é submetido a um processamento mínimo, principalmente, com a remoção de partes não comestíveis e a refrigeração, primordiais na conservação de alimentos (MUKHOPADHYAY; GORRIS, 2014). Os processamentos mínimos são cada vez mais aplicados em vegetais e em grãos, visto que a aquisição de alimentos *in natura*, disponíveis ao consumo sem nenhuma alteração, é limitada. Isto se deve a rápida deterioração por microrganismos, a perda de nutrientes e do frescor, a descoloração e possíveis danos mecânicos (GONZÁLEZ-AGUILAR *et al.*, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2016).

### 3.1.1 Alface

A espécie *Lactuca sativa* L., popularmente denominada de alface, é uma hortaliça com folhas dispostas em espiral e com roseta densa em um caule encurtado; segundo Figura 2, o cultivar apresenta uma ampla variedade de cores, formas, superfícies e texturas das folhas (MOU, 2008). Essas características morfológicas que as diferencia entre si, com coloração das folhas de amarelo a verde-escuro, e manchas avermelhadas devido à presença de antocianina (MOU, 2008). Em relação as margens das folhas, podem ser lisas, lobadas, onduladas e enrugadas (KŘÍSTKOVÁ *et al.*, 2008).

Figura 2 – Variedades de cultivares de alface



Fonte: Adaptado de Simko *et al.* (2015).

Segundo Mou (2008), com distintas formas de folha, tamanho, textura e tipo de haste, classifica-se em seis variedades de alface: crocante, *iceberg* ou americana (var. *capitata* L. *nidus jaggeri* Helm); manteiga ou lisa (var. *capitata* L. *nidus tenerrima* Helm); romana ou *cos* (var. *longifolia* Lam., var. *romana* Hort. in Bailey); foliar ou de corte (var. *acephala* Alef., syn. var. *secalina* Alef., syn. var. *crispa* L), talo ou Asparagus (var. *angustana* Irish ex Bremer, syn. var. *asparagina* Bailey, syn. L. *angustana* Hort. In Vilm.) e latina (sem denominação científica). No Brasil, segundo Sala e Da Costa (2012), a preferência de consumo é pela alface foliar (53%), seguida pela americana (34%), lisa (12%) e romana (1%). Entre estes tipos, a foliar é a que apresenta maiores variações de cor, tamanho, margem e textura (Figura 2). A

preferência de consumo por primeiras folhas ou mudas de alfaces minimamente processadas, como saladas verdes prontas ao consumo, tem possibilitado o surgimento de diferenciações no seu tamanho e na sua forma (BRUG *et al.*, 2008; STUART, 2011). Apesar da tendência de consumo por saladas embaladas, este alimento ainda é considerado pouco nutritivo pelos consumidores (XIAO *et al.*, 2012).

Segundo Kim *et al.* (2016), este vegetal apresenta baixo teor calórico, de gorduras e de sódio, porém é uma fonte de compostos bioativos benéficos à saúde. Em alfaces foram identificados folato (vitamina B9), carotenoides (principalmente  $\beta$ -caroteno), compostos fenólicos, minerais e fibras (LLORACH *et al.*, 2008; LÓPEZ *et al.*, 2014). Há variações nos teores destes compostos entre os tipos de cultivares, majoritariamente, com maior conteúdo de compostos fenólicos em alface vermelha (MULABAGAL *et al.*, 2010); por outro lado, mais relevante o teor de vitamina C em alface verde (KIM *et al.*, 2016). Em relação às fibras, tanto as alfaces verdes como vermelhas, apresentam elevado teor, sendo associado ao aumento do metabolismo de glicose e redução do colesterol e da pressão arterial (KIM *et al.*, 2016). Estes efeitos estão relacionados à insolubilidade das fibras, a qual é responsável por adicionar volume às fezes, acelerar a passagem de alimentos pelo sistema digestivo e estimular a microbiota intestinal (DHINGRA *et al.*, 2012).

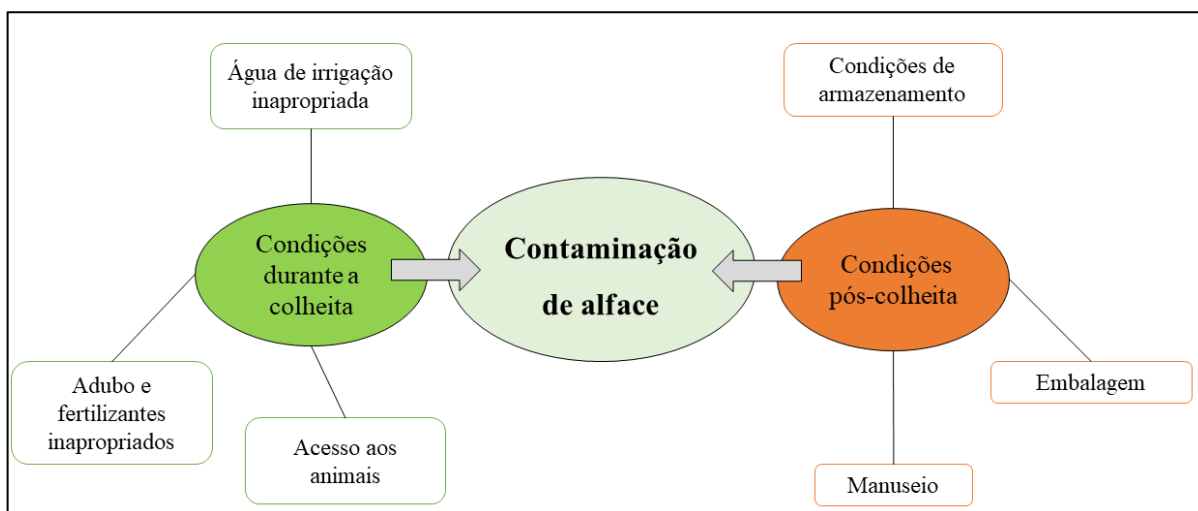
Por ser um cultivar de baixo custo e de versátil produção – em campo, em estufa (hidropônico) ou em cultura vertical interna – tem impulsionado pesquisas sobre os benefícios à saúde associados aos compostos bioativos (DAI; MUMPER, 2010; DONKENA; KARNES; YOUNG, 2010). Existem alguns estudos relacionando o consumo da alface com ação anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antidiabéticos e anticancerígenas (BRENNAN *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2009; CHENG *et al.*, 2014; BANSAL; SIDDIQUI; RAHMAN, 2015; PEPE *et al.*, 2015).

### 3.2 MICRORGANISMOS CAUSADORES DE TOXINFECÇÕES ALIMENTARES RELACIONANDOS A ALIMENTOS MINIMAMENTE PROCESSADOS

Com a adesão do consumidor por saladas prontas, a segurança microbiológica destes alimentos torna-se uma preocupação, visto que são consumidas cruas e passíveis de práticas de descontaminação inadequadas (OLIVEIRA *et al.*, 2011). As alfaces frescas podem ser contaminadas por diferentes fontes (humanas, animais e ambientais) durante o cultivo ou em operações pós-colheita, conforme ilustrado na Figura 3 (STUART, 2011). No processamento pós-colheita pode acontecer a contaminação cruzada (Figura 3). Isto se deve ao uso de embalagens e de utensílios contaminados e a condições inadequadas de armazenamento (MIR

*et al.*, 2018). Diante das condições durante a colheita e pós-colheita, os vegetais frescos são suscetíveis a presença de microrganismos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (CAMPOS *et al.*, 2013; POTHAKOS *et al.*, 2014).

Figura 3 – Diagrama das rotas de contaminação de alfaces



Fonte: Adaptado de Mir *et al.* (2018).

Diante da importância da segurança de alimentos, surtos de DTA associados às frutas e vegetais minimamente processados foram motivos de investigações. Estudos realizados em diferentes pontos do processo demonstram que patógenos de origem alimentar, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* podem contaminar saladas prontas ao consumo (CDC, 2022). Relatou-se surtos em vários locais dos EUA envolvendo *Salmonella* em vegetais minimamente processados (KRISHNASAMY *et al.*, 2020). No Brasil, segundo dados recentes do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (BRASIL, 2022), entre 2012 a 2021, do total de 6347 surtos de DTA em alimentos, o principal agente etiológico identificado foi *Escherichia coli* (29,6%), seguido de *Salmonella* spp. (11,2%) e *Staphylococcus aureus* (12,9%). Além disso, neste mesmo período, registrou-se que 25,2% dos surtos foram associados à amostras de água, 2,4% de hortaliças e 3,1% de frutas, produtos de frutas e similares (BRASIL, 2022).

Em relação a hortaliças, pesquisas também foram desenvolvidas com o objetivo de identificar os agentes causadores de DTA. Fröder *et al.* (2007) investigaram 181 amostras de saladas verdes minimamente processadas em São Paulo, e apontaram a predominância de coliformes totais (97,7%), coliformes fecais (73,0%), e a presença de *Salmonella* spp. (3,0%) e *L. monocytogenes* (0,6%). Oliveira *et al.*, (2011), analisaram 162 amostras de hortaliças minimamente processadas comercializadas em Ribeirão Preto, e detectaram *E. coli* (53,1%),



*Salmonella* spp. (1,2%) e *L. monocytogenes* (1,2%). Especificamente em alfaces, um estudo de meta-análise foi desenvolvido no Brasil por Elias, Noronha e Tondo (2019). Os resultados demonstram prevalência de *Salmonella* spp. (4,1%) e de *E. coli* (4,1%).

Deste modo, segundo a Instrução Normativa nº 161 de 2022, para garantir a segurança microbiológica de hortaliças frescas e preparadas por processamento mínimo, estes produtos devem apresentar limites abaixo de  $10^2$  UFC/g para *E. coli* e ausência em 25 g para *Salmonella* spp. (ANVISA, 2022). Além disso, hortaliças minimamente processadas devem atender aos padrões microbiológicos para *L. monocytogenes* (abaixo de  $10^2$  UFC/g), segundo o Art. 4º item VI (ANVISA, 2022).

### 3.2.1 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* é pertencente à família *Enterobacteriaceae*, com as seguintes características: bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não-esporulados, capazes de fermentar glicose e lactose com produção de ácido e gás (PERCIVAL; WILLIAMS, 2013). A multiplicação é favorecida na faixa de 25 °C a 37 °C, com temperatura ideal de 37 °C a 40 °C (VALILIS *et al.*, 2018). As linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas ao ser humano causam sintomas de gravidade variável, sendo os principais: diarreia, diarreia sanguinolenta, vômitos e febre (RAMACHANDRAN, 2014). As bactérias desta espécie causadoras de DTA são divididas em seis categorias: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (VALILIS *et al.*, 2018). Por outro lado, as cepas de *E. coli* que causam infecções do trato urinário são conhecidas por *E. coli* uropatogênica (UPEC), enquanto a *E. coli* K1 costuma ser responsável por casos de meningite ou sepse (PERCIVAL; WILLIAMS, 2013).

Estes microrganismos estão presentes no trato gastrointestinal animal e humano (RAMACHANDRAN, 2014). Portanto, a presença desta bactéria em um alimento pode indicar a contaminação microbiana de origem fecal e, conseqüentemente, condições higiênicas insatisfatórias (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Esta bactéria tem sido relatada em alimentos com pH na faixa de 4,5 a 9,0 e atividade de água entre 0,96 a 0,99, tais como: água de consumo, leite pasteurizado, carne moída, hortaliças, tomate e linguiça toscana (DA SILVA *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2010; GÓMEZ-ALDAPA *et al.*, 2013; OTERO *et al.*, 2013).

### 3.2.2 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* é um dos agentes etiológicos de origem alimentar mais comuns, sendo as infecções uma grande preocupação para a saúde pública (JAJERE, 2019). Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, compreende bacilos Gram-negativos não produtores de esporos, sendo, portanto, termossensíveis (morte celular a 60 °C), anaeróbicos facultativos, bem como capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono (BOYLE *et al.*, 2007). A multiplicação deste patógeno, encontra-se na faixa de 5 °C a 46 °C, com temperatura ideal entre 35 °C a 37°C, dependendo do sorovar estudado (LEWIS; MELENDREZ; FINK, 2019).

Apesar de apresentar apenas duas espécies (*S. enterica* e *S. bongori*), pode englobar mais de 2600 sorovares (ANDINO; HANNING, 2015). É responsável por infecções na mucosa do intestino delgado e do cólon, com sintomas que incluem diarreia, náusea, dor abdominal, febre branda e calafrios (BOYLE *et al.*, 2007). A sua ocorrência é associada a uma ampla variedade de alimentos, com pH na faixa de 3,9 a 9,2 e atividade de água de 0,94 a 0,99 (ANDINO; HANNING, 2015). Nos últimos anos tem se observado o aumento da incidência de Salmonelose causada pelo sorovar *S. Enteritidis* associada a ovos, carne bovina crua, leite e derivados de peixes crus (ANDINO; HANNING, 2015).

Um dos fatores de contaminação por *Salmonella* spp. em vegetais minimamente processados se deve a contaminação cruzada, isto é, através de alimentos de origem animal ou o uso de utensílios contaminados no preparo destes alimentos (JAJERE, 2019). Observa-se que, devido ao processamento mínimo não envolver tratamentos térmicos de inativação dessas bactérias, a etapa mais importante é a higienização de vegetais frescos (ALLENDE; TOMÁS-BARBERÁN; GIL, 2006).

### 3.3 HIGIENIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE VEGETAIS

Atualmente, sabe-se que uma comunidade microbiana, incluindo membros de bactérias patogênicas e deteriorantes, compõe a microbiota de produtos frescos (GU *et al.*, 2019). Portanto, a higienização é um procedimento imprescindível para a indústria de alimentos e serviços de alimentação, visando a segurança e a qualidade de alimentos. A principal importância da higienização adequada é a redução ou eliminação de fontes de contaminação em diferentes pontos do processamento de alimentos (MARRIOTT; SCHILLING; GRAVANI, 2018). Segundo a RDC n° 216 de 2004, sobre as Boas Práticas para Serviços de Alimentação (ANVISA, 2004), a higienização compreende duas etapas: a limpeza e a sanitização. A limpeza

consiste na remoção de substâncias minerais e/ou orgânicas indesejáveis (terra, poeira, gordura e outros). Por outro lado, a sanitização visa a redução de microrganismos a nível aceitável pela qualidade higiênico-sanitária do alimento, com o uso de método físico ou agente químico (ANVISA, 2004).

### 3.3.1 Sanitizantes em alimentos vegetais

As principais propriedades de agentes sanitizantes são, visando à higienização de vegetais, apresentar nível suficiente de ação antimicrobiana em amplo espectro, efeito negligenciável na qualidade organoléptica do alimento, baixa toxicidade, ser estável nas condições de uso e ser aprovado por órgãos governamentais, como *Food and Drug Administration* e Ministério da Saúde (PARISH *et al.*, 2003; ALLENDE *et al.*, 2008; MARRIOTT; SCHILLING; GRAVANI, 2018). Um dos agentes químicos mais utilizados como sanitizante são os liberadores de cloro, devido ao seu baixo custo, amplo espectro de ação antimicrobiana e a disponibilidade, bem como o reduzido impacto sobre a qualidade nutricional (LÍGIA *et al.*, 2013; GOMES NETO *et al.*, 2012; LEE; HUANG, 2019).

O sanitizante contendo cloro mais aplicado na indústria de alimentos é o hipoclorito de sódio (NaOCl), em virtude do baixo custo e boa eficácia na sanitização tanto de ambientes como de alimentos (FAO, 2009). A aplicação do cloro em vegetais frescos ocorre com o uso de água clorada em concentrações variáveis de 50 ppm a 200 ppm de cloro livre e são utilizados tempos típicos de contato inferiores a 5 minutos (RICO *et al.*, 2007). Por outro lado, segundo a Portaria SES n° 78/2009, recomenda-se imersão em solução clorada com 100 ppm a 250 ppm de cloro livre, por 15 minutos e enxágue com água potável. Estas variações na faixa de concentração de cloro livre exemplificam a necessidade de avaliar a ação do produto na higienização de alimentos, sendo considerada como concentração eficaz àquela responsável por uma redução mínima de 2 ciclos logarítmicos da população microbiana (GONZALEZ *et al.*, 2004). Deste modo, a água clorada com o uso de hipoclorito de sódio foi avaliada em estudos, visando determinar a concentração de cloro livre necessária na sanitização de alfaces.

Pan e Akano (2014) analisaram concentração de cloro livre na sanitização de alfaces minimamente processadas inoculadas com *E. coli* O157:H7 e observaram redução de 1 log UFC/g no tratamento a 50 ppm e de 2 log UFC/g a 100 ppm por 5 minutos. Oliveira *et al.* (2012), preconizou métodos para redução de coliformes totais em vegetais minimamente processados, sendo o mais eficiente (2,35 log UFC.g<sup>-1</sup>) a concentração de 200 ppm de hipoclorito de sódio por 15 minutos, seguida de imersão em solução de 20% de ácido acético

por 15 minutos e enxágue com água. Silveira, Hessel e Tondo (2017) avaliaram condições de lavagem e desinfecção em indústrias de vegetais minimamente processados no Brasil, em relação a inativação de *Salmonella* Enteritidis. Os autores obtiveram melhores resultados na lavagem com água potável seguida por higienização com hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 minutos e enxágue, alcançando redução de 5,83 log UFC/g (SILVEIRA; HESSEL; TONDO, 2017).

Diante destes estudos apresentados, observa-se que a faixa de concentração de hipoclorito aconselhada, para uma eficaz higienização de vegetais, é a indicada pela diretriz brasileira, com 100 a 250 ppm de cloro livre (BRASIL, 2009). Além disso, os estudos de Oliveira *et al.* (2012) e Silveira, Hessel e Tondo (2017), demonstraram que concentrações de 150 ppm a 200 ppm são recomendadas no tratamento de alfaces minimamente processadas. Apesar do potencial do cloro para inibir microrganismos, sua interação com componentes presentes em alimentos, como a matéria orgânica, pode acarretar à formação de subprodutos halogenados indesejáveis, como trihalometanos e ácidos haloacéticos (PAN; AKANO, 2014).

Neste contexto, alternativas ao cloro, como ácidos orgânicos, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ozônio e água eletrolisada têm demonstrado potencial para aplicação na sanitização de vegetais minimamente processados de acordo com pesquisas publicadas nos últimos anos (SHAH *et al.*, 2019; SINGH; HUNG; QI, 2018; SOUZA; SPINOSA; OLIVEIRA, 2018). Além disso, tecnologias emergentes não-térmicas podem ser combinadas com agentes químicos visando a descontaminação de vegetais, tais como ultrassom, ultravioleta, alta-pressão e plasma frio (HAO *et al.*, 2015; SHAH *et al.*, 2019; FAN *et al.*, 2019; SAGONG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2020).

### **3.3.2 Conservação dos alimentos minimamente processados**

As frutas e os vegetais estão entre os alimentos mais perecíveis do mercado, apresentando alto teor de carboidratos, pH entre 4,0 e 7,0 e alta atividade de água (>0,97) (ALZAMORA *et al.*, 2015). Estas condições são propícias para a sobrevivência e o desenvolvimento de bactérias, leveduras e bolores (RAMOS *et al.*, 2013). Em alfaces, o elevado teor de atividade de água (0,99) e pH na faixa de 6 até 7 são características que propiciam a multiplicação de bactérias (ALLENDE; AGUAYO; ARTÉS, 2004). Em virtude disso, a etapa de lavagem e sanitização (Figura 1) é fundamental para redução da carga microbiana, enquanto que a manutenção da cadeia de frio em temperaturas apropriadas para cada produto é importante

para reduzir os processos enzimáticos, desacelerar a senescência e evitar a multiplicação de microrganismos (ALLENDE; TOMÁS-BARBERÁN; GIL, 2006).

Esta redução da temperatura de armazenamento proporciona uma lenta taxa de respiração e de metabolismo celular em vegetais frescos, como hortaliças, após serem cortadas e embaladas em saladas prontas para o consumo (MIR *et al.*, 2018). A redução da temperatura diminui a deterioração microbiana e fisiológica de alfaces, sendo recomendado o armazenamento a 5 °C por até 15 dias (PATIL *et al.*, 2017). Em relação a agentes de DTA em alfaces, segundo Elias, Noronha e Tondo (2018b), as bactérias *E. coli* e *Salmonella* spp. não apresentavam crescimento significativo no armazenamento a 5 °C, sendo a refrigeração um método viável para conservação. Além disso, estudos com novas tecnológicas – tais como filmes com antimicrobianos nanoencapsulados, embalagens com atmosfera modificada e nanossensores para detecção de deterioração – viabilizam a permanência das qualidades sensoriais e a manutenção da segurança microbiológica de alimentos minimamente processados (CIOLACU; NICOLAU; HOORFAR, 2014; AL-TAYYAR; YOUSSEF; AL-HINDI, 2020).

#### 3.4 EFEITO ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA SANITIZAÇÃO DE VEGETAIS

Em alternativa aos sanitizantes convencionais e aos tratamentos térmicos, substâncias antimicrobianas naturais têm demonstrado ser promissoras na preservação de alimentos minimamente processados (DONSÌ; FERRARI, 2016; OZOGUL *et al.*, 2020). Alguns compostos naturais têm a capacidade de garantir a segurança contra patógenos de origem alimentar e de reduzir as perdas dos vegetais causada por microrganismos deteriorantes (QUINTO *et al.*, 2019).

Um antimicrobiano ideal apresenta como características ser eficaz em baixas concentrações, ser econômico, não causar alterações sensoriais no produto, inibir um amplo espectro de microrganismos patogênicos e deteriorantes e ser atóxico (DAVIDSON; CRITZER; TAYLOR, 2013). O composto pode ser identificado e isolado de fontes naturais (animais, vegetais e microbianas), e deve ser amplamente estudado em relação às suas propriedades e aos seus mecanismos de ação (BURT, 2004; DAVIDSON *et al.*, 2015; PISOSCHI *et al.*, 2018).

As plantas são fontes ricas em substâncias com ação antimicrobiana, sendo muitos destes compostos presentes em folhas, sementes e flores (DAVIDSON *et al.*, 2015). Um destes

compostos são os óleos essenciais, que são constituídos por substâncias aromáticas, hidrofóbicas e voláteis (OZOGUL *et al.*, 2020). Os óleos essenciais podem ser obtidos, principalmente, por destilação a vapor, sendo constituídos de uma mistura complexa de compostos, incluindo terpenos, álcoois, cetonas, fenóis, aldeídos e ésteres (PISOSCHI *et al.*, 2018; FALLEH *et al.*, 2020). Aproximadamente 90% a 95% dos óleos essenciais compreende monoterpenos, hidrocarbonetos, aldeídos alifáticos, álcoois e ésteres. Por outro lado, cerca de 5% a 10%, inclui ácidos graxos, esteróis, carotenoides, ceras e flavonoides (VILLALOBOS-DELGADO *et al.*, 2019).

Os mecanismos antimicrobianos dos óleos essenciais na célula bacteriana ocorre pela degradação da parede celular, dano à membrana citoplasmática e proteínas de membrana, vazamento do conteúdo para fora da célula, coagulação do citoplasma e esgotamento da força próton-motriz (BOR *et al.*, 2016). Entre as substâncias presentes nos óleos essenciais, o efeito antimicrobiano tem sido associado aos terpenos, terpenoides, fenilpropenos e outros compostos como licina ou isotiocinatos. Estes constituintes são elucidados como responsáveis pela atividade antimicrobiana contra bactérias (RAYBAUDI-MASSILIA *et al.*, 2009). Em estudos, observou-se que a eficácia antimicrobiana está associada a hidroxila do grupo fenol presente nestes compostos (BURT, 2004). Os representantes mais relevantes do grupo são os monoterpenoides, como eugenol, timol e carvacrol (FALLEH *et al.*, 2020).

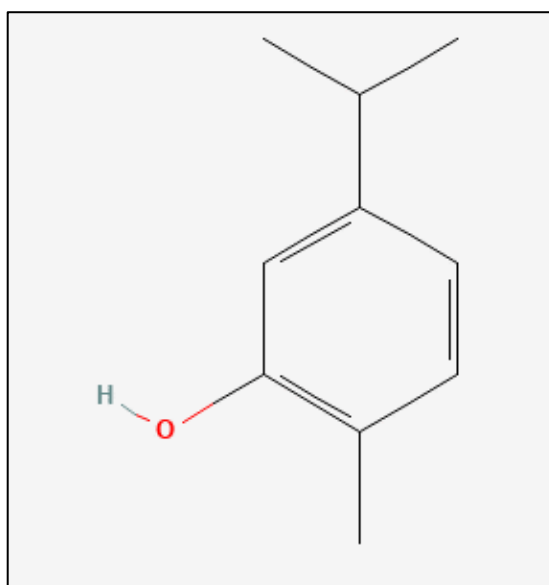
### 3.4.1 Carvacrol

O carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil) fenol) é um monoterpenoide (Figura 4) presente em vários óleos essenciais de espécies de *Lamiaceae*, utilizadas como especiarias na culinária, incluindo orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), pimenta (*Lepidium flavum*), cominho preto (*Nigella sativa*) e outras plantas (SHARIFI-RAD *et al.*, 2018). A maior concentração natural de carvacrol, cerca de 80 % da composição do óleo essencial, encontra-se no orégano (BURT, 2004). Por outro lado, o carvacrol também pode ser sintetizado por métodos químicos e biotecnológicos (APROTOSOAIIE *et al.*, 2018).

O carvacrol apresenta promissoras propriedades biológicas, principalmente, efeito antimicrobiano associado a suas características hidrofóbicas do anel aromático e hidrofílicas do grupo hidroxila (MEMAR *et al.*, 2017). O composto proporciona ação antimicrobiana devido ao aumento da permeabilidade e fluidez da membrana plasmática bacteriana que pode acarretar na coagulação do citoplasma e no extravasamento de constituintes vitais à manutenção celular (BURT, 2004; SHARIFI-RAD *et al.*, 2018). A hidroxila (OH) do carvacrol é associada ao efeito

no transportador transmembrana de cátions monovalentes responsável por processos como perturbações na força motriz para a síntese de ATP e na síntese da flagelina (MARINELLI; DI STEFANO; CACCIATORE, 2018; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

Figura 4 – Estrutura química do carvacrol



Fonte: Adaptado de National Center for Biotechnology Information (2022).

O composto é reconhecido como seguro como aditivo em alimentos, do inglês *Generally Recognized as Safe* (GRAS), pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2019). Alguns estudos elucidam a aplicação do carvacrol em alimentos minimamente processados com efeito antibacteriano. Landry *et al.* (2015) demonstraram a eficácia de carvacrol em nanoemulsões contra *S. Enteritidis* e *E. coli* O157: H7 na brotação de sementes de brócolis e rabanete. Siroli *et al.* (2015) pesquisaram a eficácia de carvacrol em comparação com o cloro para descontaminação da alface, sem afetar a qualidade da microbiota e propriedades sensoriais dos produtos.

Apesar da aplicação direta do carvacrol em alimentos ser possível, a sua eficácia antimicrobiana em matrizes alimentares pode ser reduzida devido a algumas características deste monoterprenoide, tais como: elevada volatilidade e baixa solubilidade do composto em água (1,25 mg/mL a 25 °C), aroma e sabor pronunciados (CALO *et al.*, 2015; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2022)). Uma solução é o uso de nanocarreadores, com o objetivo de melhorar a distribuição na matriz alimentar e aumentar a estabilidade deste antimicrobiano (VILLALOBOS-DELGADO *et al.*, 2019).

### 3.5 NANOMATERIAIS CARREADORES DE CARVACROL

A aplicação da nanotecnologia tem demonstrado ser promissora em formulações de materiais visando sistemas de entrega de compostos bioativos e aditivos alimentares (DASGUPTA; RANJAN, 2014). Apesar das dimensões entre 1 nm a 100 nm, padronizadas pela *International Organization of Standardization* (ISO) e pela *American Society for Testing Materials*, os materiais com até 1000 nm são considerados na escala nanométrica desde que apresentem alta proporção entre área superficial e volume (LEE; YUN; PARK, 2015; BAJPAI *et al.*, 2018). Esta característica dos nanomateriais é responsável por alta reatividade em comparação a materiais na macroescala e por melhoramento de propriedades físico-químicas como solubilidade e difusividade (GUPTA *et al.*, 2016; DONSI, 2018).

Assim, o uso de nanocarreadores para o encapsulamento de antimicrobianos naturais apresenta vantagens como o aumento da solubilidade, a redução do odor e do sabor e a liberação controlada destas substâncias em alimentos (HU *et al.*, 2017). Segundo Singh *et al.* (2017), um sistema nanocarreador deve atender alguns atributos, tais como: garantir a entrega do composto ativo no local alvo; aprimorar a disponibilidade e a estabilidade; e manter os compostos em níveis adequados por longos períodos em condições de armazenamento. Todas estas características podem ser atendidas pelos nanomateriais em diferentes configurações (nanocápsulas, nanoemulsões, nanolipossomas, nanopartículas e outros) (HE; HWANG, 2016; JAFARI *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2017).

A incorporação do carvacrol em nanocarreadores foi explorada através de nanolipossomas e nanocápsulas em estudos realizados pelo grupo de pesquisa visando à aplicação na indústria de alimentos (ENGEL *et al.*, 2017; HECKLER *et al.*, 2020 CACCIATORE *et al.*, 2020; CACCIATORE *et al.*, 2022). Os estudos analisaram o potencial antimicrobiano de carvacrol nanoencapsulado na sanitização de superfícies (vidro e aço inoxidável) usadas pela indústria de alimentos.

Os nanolipossomas (NLCT) contendo carvacrol e timol (ambos a 10,6 mg/mL) foram desenvolvidos através da hidratação do filme lipídico seguida pelo processamento em ultrassom de ponteira (MALHEIROS *et al.*, 2010; ENGEL *et al.*, 2017). Os NLCT apresentaram diâmetro médio apropriado (270,20 nm) e também inibiram coquetéis de *Salmonella* spp. e *S. aureus* em baixas concentrações de carvacrol (0,331 mg/mL e 0,662 mg/mL, respectivamente). Além disso, simulando condições da indústria de processamento de leite, NLCT foi capaz de inativar as populações de *Salmonella* e *S. aureus* aderidas ao aço inoxidável (6 log UFC/cm<sup>2</sup>) após curto período de contato (10 min) (ENGEL *et al.*, 2017). Em estudo posterior, nanolipossomas



contendo somente carvacrol (NLC) foram produzidos pela técnica de alta energia (ultrassom de ponteira) e demonstraram diâmetro médio de partícula igual a 230,9 nm (HECKLER *et al.*, 2020). Além disso, NLC inativou o coquetel de *Salmonella* spp. em baixa concentração de carvacrol (0,663 mg/mL) no teste *in vitro*. A formulação NLC, na concentração de 0,663 mg/mL, apresentou capacidade de reduzir em 3,9 log UFC/cm<sup>2</sup> a adesão de *Salmonella* spp. ao vidro em curto período de contato (1 min). Enquanto que, durante o mesmo tempo de contato (1 min), NLC na concentração de 1,325 mg/mL inativou a população de *Salmonella* spp aderida ao vidro (HECKLER *et al.*, 2020).

As nanocápsulas de carvacrol (10,6 mg/mL) revestidas por Eudragit<sup>®</sup> RS 100 foram produzidas pelo método de baixa energia (precipitação e complexação) e apresentaram tamanho médio de partícula de 159,3 nm (CACCIATORE *et al.*, 2020). Além disso, as nanocápsulas (NCC) demonstraram inativar *in vitro* coquetéis de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp em baixas concentrações de carvacrol (3,31 mg/mL a 4,42 mg/mL) (CACCIATORE *et al.*, 2020). Nos tratamentos de cupons de aço inoxidável, a NCC demonstrou inativar as populações de *Salmonella* e de *E. coli* (contagens abaixo de 1,69 log UFC/cm<sup>2</sup>) aderidas à superfície (população inicial 6,5 UFC/cm<sup>2</sup>) após o contato de 1 min. Contudo, nas mesmas condições, NCC reduziu *L. monocytogenes* e *S. aureus* em 4 log UFC/cm<sup>2</sup> e 3,5 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente (CACCIATORE *et al.*, 2020).

As nanopartículas de carvacrol (1,67 mg/mL) com mucilagem de chia (NPMC) e com mucilagem de linhaça (NPML) foram produzidas pela técnica de alta energia (homogeneização por rotor-estator de alta velocidade – Ultraturrax<sup>®</sup>) e apresentaram diâmetro médio de partícula de 179 nm e de 165,3 nm, respectivamente (CACCIATORE *et al.* 2022). A formulação NPMC inativou *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em concentrações mais baixas de carvacrol (0,42 mg/mL e 0,83 mg/mL, respectivamente) do que a NPML (0,83 mg/mL contra ambos microrganismos). Além disso, carvacrol em solução (não-encapsulado) necessitou de maiores concentrações (1,77 mg/mL) para inativar as bactérias. Na avaliação da cinética de crescimento dos microrganismos na presença das nanopartículas, NPMC nas concentrações testadas (0,42 mg/mL e 0,83 mg/mL) foi capaz de reduzir a contagem de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* para níveis abaixo do limite de detecção (1,69 log UFC/mL) após curto tempo de contato (2 h) com o antimicrobiano, e manteve este efeito por 48 h. Enquanto que NPML demonstrou recuperação da população de *Salmonella* após 24 h de contato com contagens atingindo 2,8 log UFC/mL em 48 h (CACCIATORE *et al.* 2022).

Conforme Quadro 1, com base nos trabalhos prévios, a eficácia do carvacrol encapsulado foi promissora e/ou melhorada em comparação ao carvacrol em solução (não-

encapsulado). A ação antimicrobiana do carvacrol foi testada *in vitro* e na sanitização de superfícies de alimentos. Contudo, o uso de carvacrol encapsulado ainda não foi explorado em vegetais frescos. Diante disso, neste trabalho foram desenvolvidas nanoemulsões contendo carvacrol pelo método de alta energia (ultrassom de ponteira) visando a sanitização de alfaces.

Quadro 1 – Principais propriedades de nanocarreadores contendo carvacrol em estudos realizados pelo grupo de pesquisa

Nanocarreador	Diâmetro médio	Método de produção	Concentração inicial de carvacrol	Efeito antimicrobiano	Aplicação	Referência
Nanolipossomas	270,2 nm	Alta energia (ultrassom de ponteira)	10,6 mg/mL	Inibição de <i>Salmonella</i> e <i>S. aureus</i>	Sanitização de aço inoxidável na indústria de processamento de leite	(ENGEL <i>et al.</i> , 2017)
Nanolipossomas	230,9 nm	Alta energia (ultrassom de ponteira)	10,6 mg/mL	Inativação de <i>Salmonella</i> spp.	Sanitização de vidro em curto período de tempo (1 min)	(HECKLER <i>et al.</i> , 2020)
Nanocápsulas de Eudragit® RS 100	159,3 nm	Baixa energia (precipitação e complexação)	10,6 mg/mL	Inativação de <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i>	Sanitização de aço inoxidável na indústria de alimentos	(CACCIATORE <i>et al.</i> , 2020)
Nanopartículas de mucilagem de chia e de linhaça	179 nm e 165,3 nm	Alta energia (rotor-estator/ Ultraturrax®)	1,67 mg/mL	Redução na contagem de <i>Salmonella</i> spp e <i>L. monocytogenes</i> após contato com nanopartículas.	Análise <i>in vitro</i> por cinética de inativação	(CACCIATORE <i>et al.</i> , 2022)

Fonte: Autora (2022).

### 3.5.1 Nanoemulsões

As nanoemulsões consistem de dispersões cineticamente estáveis, enquanto que as emulsões são cineticamente instáveis e demonstram separação de fases durante o armazenamento (DASGUPTA; RANJAN, 2014; DONSI, 2018). As nanoemulsões apresentam tamanho de gotas na faixa de 20 a 500 nm (GUPTA *et al.*, 2016). Assim, devido às pequenas dimensões, as nanoemulsões apresentam propriedades aprimoradas em relação as emulsões convencionais, sendo as principais: alta área superficial e estabilidade das propriedades reológicas durante o armazenamento (JAFARI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2019). Em razão disto, há diversas aplicações de nanoemulsões em alimentos com foco na dispersão controlada de antimicrobianos naturais, tais como: carvacrol, timol, cinamaldeído e limoneno (BRANCO; SEN; RINALDI, 2020; DEMISLI *et al.*, 2020; SARHEED *et al.*, 2020; ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2020).

A formulação da nanoemulsão envolve a formação de um sistema bifásico composto por uma fase aquosa, uma fase orgânica e uma película de moléculas tensoativas (LIU *et al.*, 2019). Classifica-se em nanoemulsão de óleo em água (O/A) com pequenas gotículas de óleo em um meio aquoso e de água em óleo (A/O) com gotículas de água distribuídas em meio oleoso (ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2020). Já os surfactantes utilizados são moléculas anfipáticas que podem ser iônicas, não-iônicas e anfóteras (DASGUPTA; RANJAN, 2014). Os tensoativos iônicos consistem em aniônicos (grupo hidrofílico se dissocia em ânions em soluções aquosa) e catiônicos (dissociam em cátions). Por outro lado, os não-iônicos são aqueles que não se dissociam em íons (NAKAMA, 2017). O tipo anfótero, dependendo do pH, pode apresentar características iônicas ou não-iônicas (DASGUPTA; RANJAN, 2014).

O polisorbato 80, denominado comercialmente como *Tween 80*, é um surfactante hidrofílico não-iônico amplamente utilizado como emulsificante e dispersante de substâncias em produtos farmacêuticos e alimentícios (VAISHANAVI; PREETHA, 2020). Este surfactante é reconhecido como seguro (GRAS) pela *Food and Drug Administration*, com ingestão segura de 25 mg por quilo corpóreo (FDA, 2019). Apresenta equilíbrio hidrofílico-lipofílico igual a 15, sendo aplicável a nanoemulsões do tipo O/A (DINARVAND *et al.*, 2005). A aplicação do polisorbato 80 foi elucidada em estudos, sendo vantajosa em nanoemulsões contendo carvacrol (TAŞTAN *et al.*, 2017; PRAKASH *et al.*, 2018; LEI *et al.*, 2019).

Apesar de amplo uso do polisorbato em nanoemulsões, uma alternativa aos tensoativos sintéticos é o uso de biosurfactantes. Nanoemulsões de óleo em água podem ser formadas com o uso de saponinas de extrato de *Quillaja*, planta nativa do sul do Brasil (RYU *et al.*, 2018). A

estrutura anfifílica das saponinas se deve a presença de gliconas e cadeiras laterais de sacarídeos hidrídicos (FLECK *et al.*, 2019). É um emulsificante natural aplicável para emulsões de O/A, devido ao seu alto valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico de 13,2 (SALMINEN; BISCHOFF; WEISS, 2020). O carvacrol nanoemulsionado com saponina foi investigado por alguns autores (RYU *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2013). Yang *et al.* (2013) observaram que concentrações entre 0,8 a 1,1% de saponina de *Quillaja*, as nanoemulsões de carvacrol foram estáveis a coalescência ( $d < 200$  nm) em faixas amplas de pH (2 a 8), de concentração de sal (0–500 mM NaCl) e temperaturas (20 a 90 °C). Ryu *et al.* (2018) estudaram a atividade antimicrobiana de nanoemulsões de carvacrol com saponina de *Quillaja* fabricadas por emulsificação espontânea e obtiveram melhor atividade antimicrobiana em relação às nanoemulsões de carvacrol com polisorbato 80.

A produção de nanoemulsões é realizada por duas abordagens distintas, sendo estas: baixa energia e alta energia. O método de baixa energia baseia-se em mudanças nas condições do meio, como composição das fases ou temperatura, para a quebra das interações intermoleculares entre as moléculas que compõe o sistema, formando assim gotículas nanométricas (DASGUPTA; RANJAN, 2014). Frequentemente, as técnicas deste tipo são emulsão espontânea e inversão de fases. Em contrapartida, no procedimento de alta energia rompe-se as gotas com o uso de energia (50 a 400 MPa) para formar gotículas nanométricas (LIU *et al.*, 2019). Para isso, emprega-se a homogeneização por meio de rotor-estator, ultrassom, alta-pressão e/ou microfluidização (ESPITIA; FUENMAYOR; OTONI, 2019). Entre estas, a homogeneização por ultrassom é método recorrente na fabricação de nanoemulsões de óleos essenciais.

A homogeneização por ultrassom consiste no uso de onda de alta frequência (>20 kHz) que geram forças disruptivas capazes de quebrar e misturar as fases de óleo e água (ABBAS *et al.*, 2013). Este método é relatado na formação de nanoemulsões com óleos essenciais, tais como eugenol (SHAO *et al.*, 2018), carvacrol (KHAN *et al.*, 2018), citral (LOU *et al.*, 2017) e limoneno (LU *et al.*, 2014). As vantagens do ultrassom são a produção de nanoemulsões usando baixos volumes de materiais e o gasto de energia é menor em relação aos outros métodos de alta energia (ESPITIA; FUENMAYOR; OTONI, 2019).

Contudo, as nanoemulsões podem apresentar instabilidade, devido à separação gravitacional, floculação, coalescência e amadurecimento de Ostwald (LIU *et al.*, 2019). Estes processos comprometem a comercialização e o armazenamento por longos períodos (PAGAR; DAREKAR, 2019). O fenômeno de coalescência envolve a colisão de gotículas para formar uma única gotícula maior (KARTHIK; EZHILARASI; ANANDHARAMAKRISHNAN,

2015). Por outro lado, a flocculação é a atração entre gotículas que formam um agregado, mas cada gotícula mantém sua integridade (PATHAK, 2017). A coalescência é um processo irreversível enquanto que a flocculação é reversível (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018). As emulsões são mais suscetíveis aos processos de coalescência e de flocculação do que as nanoemulsões (GUPTA *et al.*, 2016; SHETH *et al.*, 2020). Além disso, o aumento da concentração do emulsificante pode aumentar as forças atraentes entre gota e resultar na coalescência (JAFARI *et al.*, 2017). Para evitar isto, pode-se utilizar a homogeneização por ultrassom (MAHDI JAFARI; HE; BHANDARI, 2006) e concentrações ajustadas de surfactantes entre 1 % a 3 % (ANJALI *et al.*, 2012) e adição de estabilizantes (HENRY *et al.*, 2010).

O amadurecimento de Ostwald consiste na difusão de gotículas menores para maiores, sendo causador do aumento do tamanho das gotículas em emulsões de óleos essenciais (LIU *et al.*, 2019). Esta instabilidade pode ser evitada com adição de uma fase orgânica com triglicerídeos de cadeia média e longa, que se comportam como barreira cinética ao efeito Ostwald (ROSSO *et al.*, 2020). Os altos níveis de ácidos graxos monoinsaturados são inibidores de maturação por serem apolares, como é o caso do óleo de girassol, de milho e de soja (ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2020). A colisão entre as gotas resulta na formação de creme e separação das fases (GUPTA *et al.*, 2016). Contudo, esses processos são relatados com maior frequência para emulsões do que para nanoemulsões, devido ao maior tamanho (>1000 nm) e maior concentração de emulsificante (em torno de 20%) (ARTIGA-ARTIGAS *et al.*, 2019; DASGUPTA; RANJAN, 2018).

## **CAPÍTULO 2 – ARTIGOS**

## **4 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO**

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

### **4.1 ARTIGO 1**

Properties and applications of natural antimicrobial-loaded nanoemulsions as an alternative to conventional sanitizers for fresh vegetables: A review.

Artigo a ser submetido no periódico *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

### **4.2 ARTIGO 2**

Carvacrol-loaded nanoemulsions produced with a natural emulsifier for lettuce sanitization.

Artigo submetido no periódico *Food Research International*.

## 4.1 ARTIGO 1

**PROPERTIES AND APPLICATIONS OF NATURAL ANTIMICROBIAL-LOADED NANOEMULSIONS AS AN ALTERNATIVE TO CONVENTIONAL SANITIZERS FOR FRESH VEGETABLES: A REVIEW**

Louise Thomé Cardoso<sup>a</sup>, Júlia Capp Zilles<sup>b</sup>, Renata Vidor Contri<sup>b</sup>, Patrícia da Silva Malheiros<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Microbiologia e Higiene de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil; <sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

\*Corresponding author: P. Malheiros, ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brazil. Tel number +5551 3308 7861; fax number: +5551 3308 7048; e-mail: [patricia.malheiros@ufrgs.br](mailto:patricia.malheiros@ufrgs.br).



## 4.2 ARTIGO 2

**CARVACROL-LOADED NANOEMULSIONS PRODUCED WITH A NATURAL EMULSIFIER FOR LETTUCE SANITIZATION**

Louise Thomé Cardoso<sup>a</sup>, Bibiana Alexandre<sup>a</sup>, Fabiola Ayres Cacciatore<sup>a</sup>, Yve Verônica da Sila Magedans<sup>b</sup>, Arthur Germano Fett-Neto<sup>b</sup>, Renata Vidor Contri<sup>c</sup>, Patrícia da Silva Malheiros<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Microbiologia e Higiene dos Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil, <sup>b</sup> Laboratório de Fisiologia Vegetal, Centro de Biotecnologia e Instituto de Biociências (Departamento de Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil and <sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.

\* Corresponding author: P. Malheiros, ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brazil. Tel number +5551 3308 7861; fax number: +5551 3308 7048; e-mail: [patricia.malheiros@ufrgs.br](mailto:patricia.malheiros@ufrgs.br).

### **CAPÍTULO 3 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO**

## 5 DISCUSSÃO GERAL

As nanoemulsões contendo carvacrol e polisorbato 80 são promissores antimicrobianos para sanitização de vegetais, conforme elucidado em algumas pesquisas (LANDRY *et al.*, 2014, 2015, 2016; SOW *et al.*, 2017). No entanto, a aplicação de nanoemulsões de carvacrol e de outros compostos antimicrobianos naturais em vegetais frescos foi pouco explorada nos últimos anos. Conforme demonstrado no artigo de revisão, apresentado no capítulo 2 da presente dissertação, entre pesquisas publicadas no período de 2012 a 2022, somente 17 trabalhos exploraram o uso de nanoemulsões antimicrobianas para a higienização de vegetais frescos. Destas 17 pesquisas, três analisaram carvacrol nanoemulsionado na sanitização de repolho (SOW *et al.*, 2017), de brócolis (SEVERINO *et al.*, 2014a) e de vagem (SEVERINO *et al.*, 2015). Diante disso, este trabalho avaliou a ação de nanoemulsões contendo carvacrol na descontaminação de alfaces inoculadas artificialmente com importantes patógenos alimentares.

Na área de antimicrobianos naturais, a substituição do emulsificante sintético (polisorbato 80) por um biossurfactante é uma abordagem interessante. Alguns estudos já demonstraram que a saponina melhora a ação antimicrobiana de nanoemulsões de carvacrol (NC) (RYU *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2013). Contudo, até o presente momento, ainda não foi explorado a ação de NC com saponina na sanitização de alfaces. Assim, neste estudo foi analisado o efeito antimicrobiano de NC com saponina em relação a NC com polisorbato 80 visando a redução de *Salmonella* e *E. coli* em alfaces.

Em pesquisas anteriores do grupo, conforme Quadro 1 (ver tópico 3.5.1), carvacrol foi encapsulado em nanolipossomas por método de alta energia (hidratação do filme lipídico e processamento por ultrassom), em nanocápsulas de Eudragit® RS 100 por técnica de baixa energia (precipitação e complexação) e em nanocápsulas de mucilagem de chia e de linhaça por técnica de alta energia (homogeneização por rotor-estator de alta velocidade) (ENGEL *et al.*, 2017; HECKLER *et al.*, 2020; CACCIATORE *et al.*, 2020; CACCIATORE *et al.*, 2022). Diante disso, inicialmente, no presente estudo foi testado o uso do método de homogeneização por rotor-estator de alta velocidade (Ultraturrax®) em diferentes velocidades (6.000 rpm, 8.000 rpm, 10.000 rpm, 12.000 rpm, 14.000 rpm e 30.000 rpm) durante diferentes tempos de processamento (5 a 10 ciclos de 5 min cada) na formação de nanoemulsões de carvacrol. No entanto, através desta abordagem, não foi possível obter nanoemulsões de carvacrol com diâmetro médio de gotas adequado (< 200 nm), e também as formulações demonstraram

comportamento de instabilidade com separação da fase aquosa (água ultrapura e tensoativo) e da fase orgânica (carvacrol) após 2 dias em armazenamento refrigerado (5 °C).

A partir deste estudo inicial de pré-formulação, as nanoemulsões de carvacrol (NC) foram produzidas pela tecnologia de homogeneização por sonicação, um método de alta-energia conforme parâmetros elucidados por Khan *et al.* (2018). Contudo, observou-se que NC com saponina foram fabricadas somente pelo método de baixa-energia (Emulsificação Espontânea) em pesquisas realizadas anteriormente (CHANG; MCLANDBOROUGH; MCCLEMENTS, 2013; RYU *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2013). Neste trabalho, foi investigado o uso da tecnologia de alta-energia (sonicação) para formação de NC com saponina. Além disso, foi testado o efeito da adição de triglicerídeos de cadeia média (TCM) para formação de NC estáveis e sem separação de fases durante o armazenamento refrigerado (5 °C) e em temperatura ambiente controlada (25 °C) por 30 dias.

Assim, foram desenvolvidas quatro formulações contendo carvacrol nas seguintes concentrações: NCP1 (11 mg/mL de carvacrol, 5,5 mg/mL de TCM e 16,5 mg/mL de polisorbato 80), NCP2 (11 mg/mL de carvacrol, 22 mg/mL de TCM e 33 mg/mL de polisorbato 80), NCS1 (11 mg/mL de carvacrol, 5,5 mg/mL de TCM e 16,5 mg/mL de saponina) e NCS2 (11 mg/mL de carvacrol, 22 mg/mL de TCM e 33 mg/mL de saponina). A concentração inicial do carvacrol foi selecionada com base em trabalhos anteriores do grupo (CACCIATORE *et al.*, 2020; CACCIATORE *et al.*, 2022). Em ensaios preliminares, foi testado o número de ciclos de 1 min cada (3, 5 e 10 ciclos) no processamento da nanoemulsão. De modo que, o mais adequado, sem separação de fases após o processamento e com diâmetro médio de gotas apropriado (< 200 nm) foi o processamento por 10 ciclos de 1 min cada.

A adição de maior conteúdo de TCM influenciou na redução do tamanho médio das gotas (86,0 nm para 74,7 nm) das nanoemulsões com polisorbato 80 (NCP1 e NCP2). Enquanto que o maior teor de TCM aumentou o tamanho das gotas (139,6 nm para 168,2 nm) para nanoemulsões com saponina (NCS1 e NCS2). Os outros parâmetros físico-químicos (índice de PDI e potencial zeta) não foram influenciados pela adição do TCM. Por outro lado, a atividade antimicrobiana foi substancialmente afetada pela adição do TCM. As nanoemulsões com baixo teor de TCM apresentaram menores valores para Concentração de Inativação Bactericida (CIB), sendo: 1,15 mg/mL (para NCP1) e 0,69 mg/mL (para NCS1) contra o coquetel de *Salmonella* e 0,92 mg/mL (para NCP1) e 0,69 mg/mL (para NCS1) contra o coquetel de *E. coli*. Enquanto que, a formulação com alto teor de TCM apresentou elevados valores de CIB, com: 5,51 mg/mL (para NCP2) e 1,84 mg/mL (para NCS2) para o coquetel de *Salmonella* e 1,84 mg/mL (NCP2) e 1,38 mg/mL (para NCS2) para o coquetel de *E. coli*.

O aumento da CIB em maiores teores de TCM foi um fator decisivo em relação ao efeito antimicrobiano. As nanoemulsões com baixos teores de TCM (5,5 mg/mL), provavelmente, não tiveram impactos na liberação do carvacrol e, conseqüentemente, por isso o efeito bactericida foi alcançado em baixas concentrações do ativo. Além disso, em baixo teor de TCM (formulações NCP1 e NCS1) foi possível obter nanoemulsões de carvacrol estáveis por até 30 dias, independentemente da temperatura de armazenamento (5 °C ou 25 °C), e mantiveram tamanhos de gotas adequados (140,8 nm para NCS1 e 84,2 nm para NCP1). Ainda, parâmetros físico-químicos (índice de PDI e potencial zeta) também permaneceram estáveis por 30 dias nas formulações com menor teor de TCM (0,19 e -29,7 mV para NCS1 e 0,24 e -4.90 mV para NCP1).

As eficiências de encapsulação do carvacrol nos sistemas nanoemulsionados foram elevadas (de 89,5 % a 91,5 %). Em outros estudos, nanoemulsões carregadas de carvacrol produzidas por sonicação tiveram encapsulamento de 83,97 % (DANTAS *et al.*, 2021) e de 80% (HUSSEIN *et al.*, 2017). A substituição do polisorbato 80 pela saponina e a adição de TCM não influenciou a eficiência de encapsulação do carvacrol em nanoemulsões. Um sistema com elevada eficiência de encapsulamento é vantajoso para a entrega de compostos com baixa solubilidade em água, como é o caso do carvacrol (BHARGAVA *et al.*, 2015). Contudo, neste trabalho, a encapsulação do carvacrol em nanoemulsão demonstrou aumentar as concentrações necessárias para inativar as bactérias (*Salmonella* e *E.coli*), com exceção da NCS1 que manteve a mesma eficácia (0,69 mg/mL) que o carvacrol não-encapsulado (CNES1).

As nanoemulsões mantiveram distribuição homogênea de tamanho de gotas ( $PDI \leq 0,27$ ) para ambas formulações com saponina (NCS1 e NCS2) e com polisorbato 80 (NCP1 e NCP2). Os valores de PDI estão de acordo com os dados anteriormente descritos para nanoemulsões de carvacrol (RYU *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2013; ZHANG; TAN; MCCLEMENTS, 2021). Por outro lado, o potencial zeta foi influenciado com a substituição do polisorbato 80 (NCP1 e NCP2) pela saponina (NCS1 e NCS2). As formulações NCP1 e NCP2 tiveram baixos valores negativos (-5,3 mV e -3,4 mV, respectivamente) enquanto que NCS1 e NCS2 tiveram elevados valores negativos (-33,7 mV e -41,4 mV, respectivamente). Possivelmente, o baixo potencial zeta das formulações contendo polisorbato 80 se deve ao caráter não-iônico deste emulsificante (KHAN *et al.*, 2019); enquanto que, a forte carga superficial de NCS1 e NCS2 pode ser atribuída aos grupos de ácidos carboxílicos presentes nas moléculas de saponina (FLECK *et al.*, 2019).

Observou-se que a substituição do polisorbato 80 por saponina melhorou a atividade antimicrobiana das nanoemulsões de carvacrol. Foram necessárias menores CIB para carvacrol

nanoemulsionado com saponina (0,69 mg/mL e 1,84 mg/mL) do que com polisorbato 80 (1,15 mg/mL e 5,51 mg/mL). Em pesquisas anteriores, a saponina é associada a atividade antimicrobiana contra bactérias (ARABSKI *et al.*, 2012; SEWLIKAR; D'SOUZA, 2017). No entanto, neste trabalho, foram testadas nanoemulsões com saponina sem a adição do carvacrol (NUS1 e NUS2), e estas não inibiram as bactérias testadas em alta concentração (33 mg/mL) de saponina. Assim, uma possível explicação para mais eficaz ação antimicrobiana da NCS1 e da NCS2 pode ser devido ao seu elevado valor de potencial zeta (- 33,7 mV) associado a saponina. A elevada carga superficial de nanoemulsões é responsável por alterações na permeabilidade da membrana bacteriana, fato que pode potencializar a ação do carvacrol (MAILLARD *et al.*, 2021; RADULOVIC *et al.*, 2013).

Para aplicar uma nanoemulsão em alimentos, esta deve ter a quantidade adequada de antimicrobiano, a mínima quantidade de emulsificante, conter compostos naturais e manter a sua estabilidade durante o armazenamento (ESPITIA; FUENMAYOR; OTONI, 2019; KARTHIK; EZHILARASI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015). Entre as formulações elaboradas neste trabalho, NCS1 apresentou a menor concentração (0,69 mg/mL) para inativar os coquetéis bacterianos em testes *in vitro*, como também a menor quantidade de emulsificante (16,5 mg/mL de saponina). Além disso, em comparação a outros compostos (ácido acético e ácido cítrico), a concentração bactericida de NCS1 foi baixa (0,69 mg/mL) para ambas bactérias testadas. Assim, devido às suas propriedades, a NCS1 foi a formulação escolhida para aplicação em alfaces.

A sanitização de alfaces com NCS1 demonstrou eficiência contra ambos os coquetéis testados a partir de 0,5 min de imersão (ver Artigo 2 no Capítulo 2), com redução de 2,40 log UFC/g para *Salmonella* e 2,50 log UFC/g para *E. coli* na concentração BIC (0,69 mg/mL) de carvacrol. Este efeito rápido do carvacrol também é observado em outros estudos, em que tratamentos com apenas 1 minuto já foram eficazes na redução de bactérias na superfície de vegetais frescos (BHARGAVA *et al.*, 2015; SOW *et al.*, 2017). O tempo de tratamento mais eficaz foi de 15 min, em que se atingiu reduções de 3,50 log UFC/g para o coquetel de *Salmonella* e 3,29 log UFC/g para o coquetel de *E. coli* na concentração BIC (0,69 mg/mL) de carvacrol.

No entanto, as interações de diversos antimicrobianos com a matriz alimentar podem afetar a inibição bacteriana, sendo necessário aumentar a CIB para obter reduções significativas dos patógenos (BEHRENS-KNEIP, 2010). Esse efeito foi observado neste trabalho quando CIB foi dobrada (2×CIB). Imergindo as alfaces contaminadas em 2×CIB de NCS1 por 15 min ocorreu redução de *Salmonella* para níveis abaixo do limite de detecção (< 2 log UFC/g) e 3,34

log UFC/g para *E. coli*. Outros estudos foram conduzidos com óleo de orégano em nanoemulsões aplicado em alfaces, mas nenhum deles usou o carvacrol (BHARGAVA *et al.*, 2015; SIROLI *et al.*, 2015). Por exemplo, Bhargava *et al.* (2015) demonstrou reduções de até 2,31 log UFC/g de *S. Typhimurium* com aplicação de nanoemulsão contendo óleo de orégano em alfaces.

Em comparação aos ácidos orgânicos testados neste trabalho (Apêndice C), a nanoemulsão de carvacrol desenvolvida foi mais eficaz, independentemente da concentração (CIB ou 2×CIB), com reduções superiores a 3 log UFC/g, para ambos coquetéis. Enquanto que, a nanoemulsão de carvacrol (2×CIB), em comparação a solução comercial de hipoclorito de sódio (150 ppm), atingiu reduções superiores para *Salmonella* (> 3 log UFC/g) e similares para *E. coli* ( $\cong$  3 log UFC/g) após a imersão de alface por 15 min.

Ademais, nos testes de textura e de cor, a nanoemulsão de carvacrol (NCS1) mostrou-se vantajosa em relação ao carvacrol não-encapsulado (CNES1). Houve impactos negativos na cor das alfaces (escurecimento e menos esverdeadas) com a aplicação de CNES1, enquanto que o uso de NCS1 não afetou a cor das alfaces tratadas. O carvacrol tem elevados impactos negativos na cor de vegetais após tratamento, conforme estudos anteriores (CIMOWSKY *et al.*, 2022; YUAN; TEO; YUK, 2019; ZHANG; TAN; MCCLEMENTS, 2021). Além disso, NCS1 não influenciou na textura da alface tratada enquanto que o CNES1 em concentrações elevadas (2×BIC) reduziu a firmeza do vegetal. Assim, possivelmente, a vantagem da nanoemulsão (NCS1) em comparação com o carvacrol não-encapsulado (CNES1) foi a entrega controlada do carvacrol sem danificar o tecido vegetal.

Portanto, este estudo demonstrou que a NCS1 apresentou excelente ação antimicrobiana contra *Salmonella* e *E. coli in vitro* e aderidas a alfaces, demonstrando potencial para ser utilizada na sanitização deste alimento. Mais estudos devem ser realizados para o escalonamento de nanoemulsões de carvacrol formuladas com saponina visando a sanitização de alfaces. Além disso, é promissor mais testes do efeito antimicrobiano da NCS1 em alfaces e outras hortaliças minimamente processadas simulando a vida de prateleira de até 10 dias em condições refrigeradas.

## 6 CONCLUSÃO

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

- a. Composição, método de produção e técnicas de aplicação das nanoemulsões antimicrobianas influenciam o efeito destas formulações na sanitização de vegetais frescos, conforme fatores estabelecidos pela revisão de artigos publicados;
- b. Nanoemulsões de carvacrol foram eficientemente desenvolvidas através do método de alta energia (sonicação) e utilizando dois emulsificantes, sendo um de origem natural (saponina) e outro sintético (polisorbato 80).
- c. Nanoemulsões de carvacrol, com saponina e com polisorbato 80, tiveram parâmetros adequados em diâmetro médio de gota, índice de polidispersão e potencial zeta. Ambas formulações tiveram elevada eficiência de encapsulação.
- d. Nanoemulsões de carvacrol com saponina (NCS) tiveram melhor efeito antimicrobiano do que as formulações com polisorbato 80 (NCP), possivelmente, em razão da elevada carga superficial (potencial zeta).
- e. Foram necessárias maiores concentrações de NCP para a inativação de coquetel de *Salmonella* ou *E. coli*, em relação ao carvacrol não-encapsulado. Por outro lado, em menores concentrações de NCS foi possível inativar ambos coquetéis bacterianos.
- f. O alto teor de TCM nas nanoemulsões aumentou a concentração necessária para inativar os coquetéis bacterianos testados *in vitro*.
- g. Imersão de alfaces contaminadas em NCS atingiu reduções superiores a 3 log UFC/g para ambos coquetéis bacterianos testados.
- h. Em comparação aos outros tratamentos (hipoclorito de sódio a 100 ppm e 150 ppm, ácido acético a BIC e 2×BIC e ácido cítrico a BIC e 2×BIC), a NCS demonstrou ser eficaz na sanitização de alfaces.
- i. Carvacrol emulsificado apresentou impactos negativos na cor (escurecimento e menos esverdeadas) e na textura (redução da firmeza) das alfaces tratadas; enquanto que, nanoemulsões de carvacrol mantiveram a qualidade (cor e textura) da hortaliça após sanitização.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Shabbar; HAYAT, Khizar; KARANGWA, Eric; BASHARI, Mohanad; ZHANG, Xiaoming. An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 3, p. 139–157, 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Instrução Normativa nº161, de 1 de julho de 2022. **Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília: Anvisa, 2022. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN\\_161\\_2022\\_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2). Acesso em: 30 nov. 2022.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº 216, de 15 de setembro de 2004. **Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação**. Brasília: Anvisa, 2004. Disponível em: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0216\\_15\\_09\\_2004.html](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0216_15_09_2004.html). Acesso em: 15 jun. 2020.
- AL-TAYYAR, Nasser A.; YOUSSEF, Ahmed M.; AL-HINDI, Rashad. Antimicrobial food packaging based on sustainable Bio-based materials for reducing foodborne Pathogens: A review. **Food Chemistry**, v. 310, n. 10, 2019, p. 125915, 2020.
- ALLENDE, Ana; SELMA, María V.; LÓPEZ-GÁLVEZ, Francisco. Microbial and sensory quality of commercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 109–117, 2004.
- ALLENDE, Ana; SELMA, María V.; LÓPEZ-GÁLVEZ, Francisco; VILLAESCUSA, Raquel; GIL, María I. Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 1, p. 155–163, 2008.
- ALLENDE, Ana; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.; GIL, María I. Minimal processing for healthy traditional foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 513–519, 2006.
- ALZAMORA, S. M.; LÓPEZ-MALO, A.; TAPIA, M. S.; WELTI-CHANES, J. Minimally Processed Foods. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 767–771, 2015.
- ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. **Scientific World Journal**, v. 2015, n. 3, 2015.
- ANJALI, Ch; SHARMA, Yamini; MUKHERJEE, Amitava; CHANDRASEKARAN, Natarajan. Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion-a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. **Pest Management Science**, v. 68, n. 2, p. 158–163, 2012.
- APROTOSOAIÉ, Ana Clara; LUCA, Vlad Simon; TRIFAN, Adriana; MIRON, Anca. Antigenotoxic Potential of Some Dietary Non-phenolic Phytochemicals. *In: Studies in Natural Products Chemistry*. 1. ed. Cambridge: Elsevier B.V., 2018. v. 60p. 223–297.

ARABSKI, Michał; WĘGIEREK-CIUK, Aneta; CZERWONKA, Grzegorz; LANKOFF, Anna; KACA, Wiesław. Effects of Saponins against Clinical *E. coli* Strains and Eukaryotic Cell Line. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

ARTIGA-ARTIGAS, María; MONTOLIU-BONEU, Júlia; SALVIA-TRUJILLO, Laura; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Factors affecting the formation of highly concentrated emulsions and nanoemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 578, p. 123577, 2019.

BAJPAI, Vivek K.; KAMLE, Madhu; SHUKLA, Shruti; MAHATO, Dipendra Kumar; CHANDRA, Pranjal; HWANG, Seung Kyu; KUMAR, Pradeep; HUH, Yun Suk; HAN, Young Kyu. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 4, p. 1201–1214, 2018.

BANSAL, Vasudha; SIDDIQUI, Mohammed Wasim; RAHMAN, Mohammad Shafiur. **Minimally processed foods: Overview**. Nova York: Springer, 2015.

BEHRENS-KNEIP, Susanne. The role of SurA factor in outer membrane protein transport and virulence. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 7, p. 421–428, 2010.

BHARGAVA, Kanika; CONTI, Denise S.; DA ROCHA, Sandro R. P.; ZHANG, Yifan. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, v. 47, p. 69–73, 2015.

BHAVANIRAMYA, Sundaresan; VISHNUPRIYA, Selvaraju; AL-ABOODY, Mohammad Saleh. Grain & Oil Science and Technology Role of essential oils in food safety : Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 49–55, 2019.

BOR, Tarik; ALJALOUD, Sulaiman O.; GYAWALI, Rabin; IBRAHIM, Salam A. Antimicrobials from herbs, spices, and plants. *In*: **Fruits, Vegetables, and Herbs: Bioactive Foods in Health Promotion**. Londres: Elsevier Inc., 2016. p. 551–578.

BOYLE, Erin C.; BISHOP, Jennifer L.; GRASSL, Guntram A.; FINLAY, B. Brett. *Salmonella*: From pathogenesis to therapeutics. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 5, p. 1489–1495, 2007.

BRANCO, Ivanise Guilherme; SEN, Kacoli; RINALDI, Carlos. Effect of sodium alginate and different types of oil on the physical properties of ultrasound-assisted nanoemulsions. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 153, n. 5, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia Alimentar para a População Brasileira Guia Alimentar para a População Brasileira**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_alimentar\\_populacao\\_brasileira\\_2ed.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf). Acesso em: 7 jun. 2020.

BRASIL. Secretaria da Saúde. **Portaria SES nº 78 de 18 de janeiro de 2009**. Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Porto Alegre: SES, 2009.

Disponível em: <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201612/26090340-portaria-ses-rs-nu-78-de-2009.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2020.

BRASIL. Secretaria da Saúde. **Portaria SES nº 90 de 13 de fevereiro de 2017**. Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação e de Procedimentos Operacionais Padronizados para a industrialização de frutas e vegetais minimamente processados. Porto Alegre: SES, 2017. Disponível em: <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201706/28135002-13053734-1489756663-90-cevs.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2020.

BRASIL. Secretaria da Saúde. **Portaria SES nº 635 de 22 de novembro de 2019**. Altera a redação e acresce definição no Anexo I, itens 2 e 3, da Portaria SES nº 90/2017, que dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação e de Procedimentos Operacionais Padronizados para a industrialização de frutas e vegetais minimamente processados. Porto Alegre: SES, 2019. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=383845>. Acesso em: 9 jun. 2020.

BRASIL. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil**. Ministério da Saúde. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/arquivos/apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2022.

BRENNAN, Paul; FORTES, Cristina; BUTLER, Joel; AGUDO, Antonio; BENHAMOU, Simone; DARBY, Sarah; GERKEN, Michael; JÖCKEL, Karl Heinz; KREUZER, Michaela; MALLONE, Sandra; NYBERG, Fredrik; POHLABELN, Hermann; FERRO, Gilles; BOFFETTA, Paolo. A multicenter case-control study of diet and lung cancer among non-smokers. **Cancer Causes and Control**, v. 11, n. 1, p. 49–58, 2000.

BRUG, Johannes; KREMERS, Stef P.; LENTHE, Frank Van; BALL, Kylie; CRAWFORD, David. Environmental determinants of healthy eating: In need of theory and evidence. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, n. 3, p. 307–316, 2008.

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

CACCIATORE, Fabíola Ayres; DALMÁS, Michelle; MADERS, Caroline; ATAÍDE ISAÍÁ, Henrique; BRANDELLI, Adriano; MALHEIROS, Patrícia da Silva. Carvacrol encapsulation into nanostructures: Characterization and antimicrobial activity against foodborne pathogens adhered to stainless steel. **Food Research International**, v. 133, n. 3, p. 109143, 2020.

CACCIATORE, Fabiola; MADERS, Caroline; ALEXANDRE, Bibiana; PINILLA, Cristian; BRANDELLI, Adriano; MALHEIROS, Patrícia. Carvacrol encapsulation into nanoparticles produced from chia and flaxseed mucilage : Characterization , stability and antimicrobial activity against *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 108, n. 8, p. 104116, 2022.

CALO, Julianny Rivera; CRANDALL, Philip G.; O'BRYAN, Corliss A.; RICKE, Steven C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.

CAMPOS, Joana; MOURÃO, Joana; PESTANA, Nazaré; PEIXE, Luísa; NOVAIS, Carla; ANTUNES, Patrícia. Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated

vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 3, p. 464–470, 2013.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **List of Multistate Foodborne Outbreak Notices**. 2022. Disponível em: [https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/lists/outbreaks-list.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffoodsafety%2Foutbreaks%2Fmultistate-outbreaks%2Foutbreaks-list.html](https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/lists/outbreaks-list.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffoodsafety%2Foutbreaks%2Fmultistate-outbreaks%2Foutbreaks-list.html). Acesso em: 5 set. 2022.

CHANG, Yuhua; MCLANDSBOROUGH, Lynne; MCCLEMENTS, David Julian. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 37, p. 8906–8913, 2013.

CHENG, Diana M.; POGREBNYAK, Natalia; KUHN, Peter; POULEV, Alexander; WATERMAN, Carrie; ROJAS-SILVA, Patricio; JOHNSON, William D.; RASKIN, Ilya. Polyphenol-rich Rutgers Scarlet Lettuce improves glucose metabolism and liver lipid accumulation in diet-induced obese C57BL/6 mice. **Nutrition**, v. 30, n. 7- 8 SUPPL., p. S52–S58, 2014.

CHENG, Li; TIRTAWINATA, Felisa; YANG, Hongshun; SHAO, Qingsong. Carvacrol nanoemulsion combined with acid electrolysed water to inactivate bacteria , yeast in vitro and native micro fl ora on shredded cabbages. **Food Control**, v. 76, p. 88–95, 2017.

CIMOWSKY, Samuel; KUMAR, Govindaraj Dev; BISCAIA RIBEIRO DA SILVA, Andre Luiz; WHITE, Elizabeth; KERR, William L.; RODRIGUES, Camila; JUNEJA, Vijay K.; DUNN, Laurel L. Postharvest control of *Escherichia coli* O157:H7 on romaine lettuce using a novel pelargonic acid sanitizer. **Lwt**, v. 154, n. 7, 2021, p. 112168, 2022.

CIOLACU, L.; NICOLAU, A. I.; JOS, Dunarea De. Edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *In: Global safety of fresh produce: A handbook of best practice, innovative commercial solutions and case studies*. 1. ed. [s.l.] : Woodhead Publishing Limited, 2013. p. 233–244.

DA SILVA, Z. N.; DA CUNHA, A. S.; LINS, M. C.; L.DEA.M. CARNEIRO; ALMEIDA, A. C. d. F.; QUEIROZ, M. L. P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 35, n. 4, p. 375–379, 2001.

DAI, Jin; MUMPER, Russell J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.

DANTAS, Amanda Gabrielle Barros; DE SOUZA, Rafael Limongi; DE ALMEIDA, Anderson Rodrigues; XAVIER JÚNIOR, Francisco Humberto; PITTA, Maira Galdino da Rocha; RÉGO, Moacyr Jesus Barreto de Melo; OLIVEIRA, Elquio Eleamen. Development, Characterization, and Immunomodulatory Evaluation of Carvacrol-loaded Nanoemulsion. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3899, 2021.

DASGUPTA, Nandita; RANJAN, Shivendu. **An Introduction to Food Grade Nanoemulsions**. Singapura: Springer, 2014. v. 1

DAVIDSON, P. M.; CEKMER, H. Bozkurt; MONU, E. A.; TECHATHUVANAN, C. The use of natural antimicrobials in food: an overview. *In: Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Cambridge: Elsevier, 2015. p. 1–27.

DAVIDSON, P. Michael; CRITZER, Faith J.; MATTHEW TAYLOR, T. Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 163–190, 2013.

DE CORATO, Ugo. Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 6, p. 940–975, 2020.

DE OLIVEIRA, Erick Falcão; TIKEKAR, Rohan; NITIN, Nitin. Combination of aerosolized curcumin and UV-A light for the inactivation of bacteria on fresh produce surfaces. **Food Research International**, v. 114, n. 5, p. 133–139, 2018.

DEMISLI, S.; THEOCHARI, I.; CHRISTODOULOU, P.; ZERVOU, M.; XENAKIS, A.; PAPADIMITRIOU, V. Structure, activity and dynamics of extra virgin olive oil-in-water nanoemulsions loaded with vitamin D3 and calcium citrate. **Journal of Molecular Liquids**, v. 306, p. 112908, 2020.

DHINGRA, Devinder; MICHAEL, Mona; RAJPUT, Hradesh; PATIL, R. T. Dietary fibre in foods: A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 255–266, 2012.

DINARVAND, Rassoul; MOGHADAM, S. H.; SHEIKHI, A.; ATYABI, F. Effect of surfactant HLB and different formulation variables on the properties of poly-D,L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 2, p. 139–151, 2005.

DOAN, Hung K.; ANTEQUERA-GÓMEZ, María L.; PARIKH, Atul N.; LEVEAU, Johan H. J. Leaf Surface Topography Contributes to the Ability of *Escherichia coli* on Leafy Greens to Resist Removal by Washing, Escape Disinfection With Chlorine, and Disperse Through Splash. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

DONKENA, Krishna Vanaja; KARNES, R. Jeffrey; YOUNG, Charles Y. F. Vitamins and prostate cancer risk. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1762–1783, 2010.

DONSÌ, Francesco. Applications of Nanoemulsions in Foods. *In: Nanoemulsions*. 1. ed. Londres: Elsevier, 2018. p. 349–377.

DONSÌ, Francesco; FERRARI, Giovanna. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106–120, 2016.

ELIAS, Susana de Oliveira; DECOL, Luana Tombini; TONDO, Eduardo Cesar. Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008 through 2014. **Food Quality and Safety**, v. 2, n. 4, p. 173–181, 2018a.

ELIAS, Susana de Oliveira; NORONHA, Tiago Baptista; TONDO, Eduardo Cesar.

Assessment of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 growth on lettuce exposed to isothermal and non-isothermal conditions. **Food Microbiology**, v. 72, p. 206–213, 2018b.

ELIAS, Susana de Oliveira; NORONHA, Tiago Baptista; TONDO, Eduardo Cesar. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence and levels on lettuce: A systematic review and meta-analysis. **Food Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 103217, 2019.

ENGEL, Juliana Both; HECKLER, Caroline; TONDO, Eduardo Cesar; DAROIT, Daniel Joner; DA SILVA MALHEIROS, Patrícia. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 252, n.3, p. 18–23, 2017.

ESPITIA, Paula J. P.; FUENMAYOR, Carlos A.; OTONI, Caio G. Nanoemulsions: Synthesis, Characterization, and Application in Bio-Based Active Food Packaging. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 1, p. 264–285, 2019a.

ESPITIA, Paula J. P.; FUENMAYOR, Carlos A.; OTONI, Caio G. Nanoemulsions: Synthesis, Characterization, and Application in Bio-Based Active Food Packaging. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 1, p. 264–285, 2019b.

FALLEH, Hanen; JEMAA, Mariem Ben; SAADA, Mariem; KSOURI, Riadh. Essential oils : A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**, v. 330, n. 1, p. 127268, 2020.

FAN, Kai; ZHANG, Min; BHANDARI, Bhesh; JIANG, Fangjun. A combination treatment of ultrasound and  $\epsilon$ -polylysine to improve microorganisms and storage quality of fresh-cut lettuce. **Lwt**, v. 113, n. 2, p. 108315, 2019.

FAO/WHO. **Fruit and Veg etables for Health Fruit and Vegetables**. Japão: FAO/WHO, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/%0Afruit/en/index1.html>.

FAO. **Benefits and Risks of the Use of Chlorine-containing Disinfectants in Food Production and Food Processing** Ann Arbor: FAO and WHO, 2009.

FARDET, Anthony. Characterization of the Degree of Food Processing in Relation With Its Health Potential and Effects. *In: Advances in Food and Nutrition Research*. 1. ed. [s.l.]: Elsevier Inc., 2018. v. 85p. 79–129.

FATHI, Milad; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 13–27, 2012.

FDA. **Code of Federal Regulations**. 2019. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.515&SearchTerm=thymol>. Acesso em: 15 set. 2020.

FLECK, Juliane Deise; BETTI, Andresa Heemann; PEREIRA DA SILVA, Francini; TROIAN, Eduardo Artur; OLIVARO, Cristina; FERREIRA, Fernando; VERZA, Simone Gasparin. Saponins from *Quillaja saponaria* and *Quillaja brasiliensis*: Particular chemical characteristics and biological activities. **Molecules**, v. 24, n. 1, 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: Guide to Minimize Food Safety Hazards for Fresh-cut Fruits and Vegetables**. Rockville. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-guide-minimize-microbial-food-safety-hazards-fresh-cut-fruits-and-vegetables>.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Gras Notice for the Use of *Quillaia* Extract Type 2 in Food., v. 33, n. 903, 2020.

FRÖDER, Hans; MARTINS, Cecília Geraldês; DE SOUZA, Katia Leani Oliveira; LANDGRAF, Mariza; FRANCO, Bernadette D. G. M.; DESTRO, Maria Teresa. Minimally processed vegetable salads: Microbial quality evaluation. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 5, p. 1277–1280, 2007.

GOMES NETO, Nelson Justino; LUCENA PESSOA, Renata Maynart; BARBOSA NUNES QUEIROGA, Inês Maria; MAGNANI, Marciane; DE SOUSA FREITAS, Francisca Inês; DE SOUZA, Evandro Leite; MACIEL, Janeeyre Ferreira. Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 47–51, 2012.

GÓMEZ-ALDAPA, Carlos A.; DEL REFUGIO TORRES-VITELA, M.; ACEVEDO-SANDOVAL, Otilio A.; RANGEL-VARGAS, Esmeralda; VILLARRUEL-LÓPEZ, Angélica; CASTRO-ROSAS, Javier. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Enteroinvasive *E. coli*, Enteropathogenic *E. coli*, and Enterotoxigenic *E. coli* on tomatoes from public markets in Mexico. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 9, p. 1621–1625, 2013.

GONZÁLEZ-AGUILAR, Gustavo Adolfo; AYALA-ZAVALA, J. F.; OLIVAS, G. I.; DE LA ROSA, L. A.; ÁLVAREZ-PARRILLA, E. Preserving quality of fresh-cut products using safe technologies. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 5, n. 1, p. 65–72, 2010.

GONZALEZ, Rolando J.; LUO, Yaguang; RUIZ-CRUZ, Saul; MCEVOY, James L. Efficacy of sanitizers to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut carrot shreds under simulated process water conditions. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 11, p. 2375–2380, 2004.

GROSS, Kenneth C.; WANG, Chien Y.; SALTVEIT, Mikal E. The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. **Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture**, n. 66, p. 68–70, 2016.

GU, Ganyu; YIN, Hsin Bai; OTTESEN, Andrea; BOLTEN, Samantha; PATEL, Jitendra; RIDEOUT, Steve; NOU, Xiangwu. Microbiomes in ground water and alternative irrigation water, and spinach microbiomes impacted by irrigation with different types of water. **Phytobiomes Journal**, v. 3, n. 2, p. 137–147, 2019.

GUPTA, Ankur; ERAL, H. Burak; HATTON, T. Alan; DOYLE, Patrick S. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. **Soft Matter**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 2016.

HAO, Jianxiong; LI, Huiying; WAN, Yangfang; LIU, Haijie. Effect of Slightly Acidic Electrolyzed Water (SAEW) Treatment on the Microbial Reduction and Storage Quality of Fresh-Cut Cilantro. **Journal of Food Processing and Preservation**, [S. l.], v. 39, n. 6, p.

559–566, 2015.

HARAPAS, Dean; PREMIER, Robert; TOMKINS, Bruce; FRANZ, Peter; AJLOUNI, Said. Persistence of *Escherichia coli* on injured vegetable plants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 3, p. 232–237, 2010.

HAUTE, Sam Van; SAMPERS, Imca; HOLVOET, Kevin; UYTTENDAELE, Mieke. Physicochemical Quality and Chemical Safety of Chlorine as a Reconditioning Agent and Wash Water Disinfectant for Fresh-Cut. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 2850–2861, 2013.

HE, Xiaojia; HWANG, Huey Min. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 4, p. 671–681, 2016.

HECKLER, Caroline; MARQUES MADERS SILVA, Caroline; AYRES CACCIATORE, Fabiola; DAROIT, Daniel Joner; DA SILVA MALHEIROS, Patrícia. Thymol and carvacrol in nanoliposomes: Characterization and a comparison with free counterparts against planktonic and glass-adhered *Salmonella*. **LWT**, v. 127, n. 3, p. 109382, 2020.

HENRY, John V. L.; FRYER, Peter J.; FRITH, William J.; NORTON, Ian T. The influence of phospholipids and food proteins on the size and stability of model sub-micron emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 1, p. 66–71, 2010.

HOU, Zhe; FINK, Ryan C.; RADTKE, Christie; SADOWSKY, Michael J.; DIEZ-GONZALEZ, Francisco. Incidence of naturally internalized bacteria in lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 3, p. 260–265, 2013.

HU, Bing; LIU, Xixia; ZHANG, Chunlan; ZENG, Xiaoxiong. Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 3–15, 2017.

HUSSEIN, Jihan; EL-BANNA, Mona; MAHMOUD, Khaled F.; MORSY, Safaa; ABDEL LATIF, Yasmin; MEDHAT, Dalia; REFAAT, Eman; FARRAG, Abdel Razik; EL-DALY, Sherien M. The therapeutic effect of nano-encapsulated and nano-emulsion forms of carvacrol on experimental liver fibrosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 880–887, 2017.

JAFARI, Seid Mahdi; PAXIMADA, Paraskevi; MANDALA, Ioanna; ASSADPOUR, Elham; MEHRNIA, Mohammad A. **Encapsulation by nanoemulsions**. Londres: Elsevier Inc., 2017.

JAJERE, Saleh Mohammed. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary World**, v. 12, n. 4, p. 504–521, 2019.

JASPER, Jake; ELMORE, J. Stephen; WAGSTAFF, Carol. Determining the quality of leafy salads: Past, present and future. **Postharvest Biology and Technology**, [S. l.], v. 180, p. 111630, 2021.

KALMPOURTZIDOU, Alik; EILANDER, Ans; TALSMA, Elise F. Global vegetable intake and supply compared to recommendations: A systematic review. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 22–



29, 2020.

KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

KARTHIK, P.; EZHILARASI, P. N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 7, p. 1435–1450, 2015.

KENTISH, S.; WOOSTER, T. J.; ASHOKKUMAR, M.; BALACHANDRAN, S.; MAWSON, R.; SIMONS, L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 170–175, 2008.

KESKINEN, Lindsey A.; BURKE, Angela; ANNOUS, Bassam A. Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 2–3, p. 134–140, 2009.

KHAN, Imran; BAHUGUNA, Ashutosh; KUMAR, Pradeep; BAJPAI, Vivek K.; KANG, Sun Chul. In vitro and in vivo antitumor potential of carvacrol nanoemulsion against human lung adenocarcinoma A549 cells via mitochondrial mediated apoptosis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 712–714, 2018.

KHAN, Imran; BHARDWAJ, Monika; SHUKLA, Shruti; LEE, Hoomin; OH, Mi Wah; BAJPAI, Vivek K.; HUH, Yun Suk; KANG, Sun Chul. Carvacrol encapsulated nanocarrier/nanoemulsion abrogates angiogenesis by downregulating COX-2, VEGF and CD31 in vitro and in vivo in a lung adenocarcinoma model. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. January, p. 612–622, 2019.

KHORSHIDIAN, Nasim; YOUSEFI, Mojtaba; KHANNIRI, Elham; MORTAZAVIAN, Amir Mohammad. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, n. August 2017, p. 62–72, 2018.

KIM, Moo Jung; MOON, Youyou; TOU, Janet C.; MOU, Beiquan; WATERLAND, Nicole L. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 49, p. 19–34, 2016.

KISLUK, Guy; YARON, Sima. Presence and Persistence of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium in the Phyllosphere and Rhizosphere of Spray-Irrigated Parsley. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 11, p. 4030–4036, 2012.

KRISHNASAMY, Vikram P.; MARSHALL, Kate; DEWEY-MATTIA, Daniel; WISE, Matt. Outbreak Characteristics and Epidemic Curves for Multistate Outbreaks of *Salmonella* Infections Associated with Produce: United States, 2009–2015. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 1, p. 15–22, 2020.

KŘÍSTKOVÁ, E.; DOLEŽALOVÁ, I.; LEBEDA, Aleš; VINTER, V.; NOVOTNÁ, A. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. **Horticultural Science**, v. 35, n. 3, p. 113–129, 2008.

- LANDRY, Kyle S.; CHANG, Yuhua; MCCLEMENTS, David Julian; MCLANDBOROUGH, Lynne. Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 15–21, 2014.
- LANDRY, Kyle S.; KOMAIKO, Jennifer; WONG, Dana E.; XU, Ting; MCCLEMENTS, DAVID JULIAN; MCLANDBOROUGH, LYNNE. Inactivation of *Salmonella* on Sprouting Seeds Using a Spontaneous Carvacrol Nanoemulsion Acidified with Organic Acids. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 7, p. 1115–1126, 2016.
- LANDRY, Kyle S.; MICHELI, Sean; MCCLEMENTS, David Julian; MCLANDBOROUGH, Lynne. Effectiveness of a spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated broccoli and radish seeds. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 51, p. 10–17, 2015.
- LEE, Byung Kook; YUN, Yeon Hee; PARK, Kinam. Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 158–164, 2015.
- LEE, Jeung Hee; FELIPE, Penelope; YANG, Yoon Hyung; KIM, Mi Yeon; OH, Yoon Kwon; SOK, Dai Eun; KIM, Hyoung Chin; KIM, Mee Ree. Effects of dietary supplementation with red-pigmented leafy lettuce (*Lactuca sativa*) on lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high-fat high-cholesterol diet. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 8, p. 1246–1254, 2009.
- LEE, Wan Ning; HUANG, Ching Hua. Formation of disinfection byproducts in wash water and lettuce by washing with sodium hypochlorite and peracetic acid sanitizers. **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 1, n. 10, 2018, p. 100003, 2019.
- LEI, Kai; WANG, Xinran; LI, Xiaozhou; WANG, Lin. The innovative fabrication and applications of carvacrol nanoemulsions, carboxymethyl chitosan microgels and their composite films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, n. December 2018, p. 688–696, 2019.
- LEWIS, April M.; MELENDREZ, Melanie C.; FINK, Ryan C. *Salmonella*. In: **Food Microbiology**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2019. p. 225–262.
- LÍGIA, Mara; BACHELLI, Biazotto; DARLA, Rívia; AMARAL, Álvares; BENEDETTI, Benedito Carlos. Alternative sanitization methods for minimally processed lettuce in comparison to sodium hypochlorite. **Brazilian Journal of Microbiology** 44, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 673–678, 2013.
- LIU, Qingqing; HUANG, He; CHEN, Honghong; LIN, Junfan; WANG, Qin. Food-grade nanoemulsions: Preparation, stability and application in encapsulation of bioactive compounds. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 23, p. 1–37, 2019.
- LIU, Xiaozhen; DIARRA, Moussa S.; ZHANG, Yonggang; WANG, Qi; YU, Hai; XIE, Ming-yong; GONG, Joshua. Effect of encapsulated carvacrol on the incidence of necrotic enteritis in broiler chickens. **Avian Pathology ISSN**:, v. 9457, n. June, 2016.

LLORACH, Rafael; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, Ascensión; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.; GIL, María I.; FERRERES, Federico. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1028–1038, 2008.

LOPEZ-GALVEZ, Francisco; RAGAERT, Peter; PALERMO, Ladie Anne; ERIKSSON, Markus; DEVLIEGHERE, Frank. Effect of new sanitizing formulations on quality of fresh-cut iceberg lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 85, p. 102–108, 2013.

LÓPEZ, Alicia; JAVIER, García Alonso; FENOLL, Jose; HELLÍN, Pilar; FLORES, Pilar. Chemical composition and antioxidant capacity of lettuce: Comparative study of regular-sized (Romaine) and baby-sized (Little Gem and Mini Romaine) types. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 39–48, 2014.

LOU, Zaixiang; CHEN, Jie; YU, Fuhao; WANG, Hongxin; KOU, Xingran; MA, Chaoyang; ZHU, Song. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. **LWT**, v. 80, p. 371–377, 2017.

LU, Wen-Chien; ZHANG, Ting-Jie; HUANG, Da-Wei; LI, Po-Hsien. Nanoemulsion of D-limonene in water system prepared by ultrasonic emulsification. **Journal of cosmetic science**, v. 65, n. 4, p. 245–52, 2014.

MAHDI JAFARI, Seid; HE, Yinghe; BHANDARI, Bhesh. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 3, p. 475–485, 2006.

MAILLARD, Anike P. V. Ferreyra; ESPECHE, Juan Carlos; MATURANA, Patricia; CUTRO, Andrea C.; HOLLMANN, Axel. Zeta potential beyond materials science: Applications to bacterial systems and to the development of novel antimicrobials. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1863, n. 6, p. 183597, 2021.

MARINELLI, Lisa; DI STEFANO, Antonio; CACCIATORE, Ivana. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 4, p. 903–921, 2018.

MARRIOTT, Norman G.; SCHILLING, M. Wes; GRAVANI, Robert B. The Role of HACCP in Sanitation. *In*: **PRINCIPLES OF FOOD SANITATION**. 6. ed. Londres: Springer, 2018. p. 109–124.

MARTINS, André Gustavo Lima de Almeida; NASCIMENTO, Adenilde Ribeiro; MOUCHREK FILHO, João Elias; MENDES FILHO, Nestor Everton; SOUZA, Antonio Gouveia; ARAGÃO, Natanael Eudes; SILVA, Diôgo Sérgio Vieira Da. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alfaces. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1791–1796, 2010.

MCCLEMENTS, David J.; JAFARI, Seid Mahdi. General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. **Nanoemulsions**. [s. l.]: Elsevier, 2018. p. 3–20.

MEMAR, Mohammad Y.; RAEI, Parisa; ALIZADEH, Naser; AGHDAM, Masoud Akbari; KAFIL, Hossein Samadi. Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant

isolates. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 63–68, 2017.

MILLAN-SANGO, D.; GARRONI, E.; FARRUGIA, C.; VAN IMPE, J. F. M.; VALDRAMIDIS, V. P. Determination of the efficacy of ultrasound combined with essential oils on the decontamination of *Salmonella* inoculated lettuce leaves. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 80–87, 2016.

MIR, Shabir Ahmad; SHAH, Manzoor Ahmad; MIR, Mohammad Maqbool; DAR, B. N.; GREINER, Ralf; ROOHINEJAD, Shahin. Microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salads in developing countries and potential solutions in the supply chain to control microbial pathogens. **Food Control**, v. 85, p. 235–244, 2018.

MONTEIRO, Carlos A.; CANNON, Geoffrey; LEVY, Renata; MOUBARAC, Jean-Claude; JAIME, Patricia; MARTINS, Ana Paula; CANELLA, Daniela; LOUZADA, Maria; PARRA, Diana. NOVA. The star shines bright (Food classification. Public health). **World Nutrition**, v. 7, n. 1–3, p. 28–38, 2016.

MOU, Beiquan. Lettuce. *In: Vegetables I*. Nova York: Springer, 2008. p. 75–116.

MOUATCHO, Joel Claude; TZORTZAKIS, Nikolaos; SOUNDY, Puffy; SIVAKUMAR, Dharini. Bio-sanitation treatment using essential oils against *E. coli* O157:H7 on fresh lettuce. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 45, n. 3, p. 165–174, 2017.

MULABAGAL, Vanisree; NGOUAJIO, Mathieu; NAIR, Ajay; ZHANG, Yanjun; GOTTUMUKKALA, Aditya L.; NAIR, Muraleedharan G. In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 300–306, 2010.

NAKAMA, Y. Surfactants. *In: Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. [s.l.]:Elsevier Inc., 2017. p. 231–244.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2022). **PubChem Compound Summary for CID 10364, Carvacrol**. 2022. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carvacrol>. Acesso em: 20 nov. 2022.

NOGUEROL, Ana Teresa; PAGÁN, M. Jesús; GARCÍA-SEGOVIA, Purificación; VARELA, Paula. Green or clean? Perception of clean label plant-based products by omnivorous, vegan, vegetarian and flexitarian consumers. **Food Research International**, v. 149, p. 110652, 2021.

OLIVEIRA, Ana Beatriz Almeida De; RITTER, Ana Carolina; TONDO, Eduardo Cesar; CARDOSO, Marisa Itapema. Comparison of Different Washing and Disinfection Protocols Used by Food Services in Southern Brazil for Lettuce (*Lactuca sativa*). **Food and Nutrition Sciences**, v. 03, n. 01, p. 28–33, 2012.

OLIVEIRA, Maria Aparecida De; MACIEL DE SOUZA, Vanessa; MORATO BERGAMINI, Alzira Maria; DE MARTINIS, Elaine Cristina Pereira. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1400–1403, 2011.

OTERO, Verónica; RODRÍGUEZ-CALLEJA, José María; OTERO, Andrés; GARCÍA-LÓPEZ, María Luisa; SANTOS, Jesús A. Genetic characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from ewes' milk, sheep farm environments, and humans by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 5864–5869, 2013.

OTONI, Caio G.; AVENA-BUSTILLOS, Roberto J.; OLSEN, Carl W.; BILBAO-SÁINZ, Cristina; MCHUGH, Tara H. Mechanical and water barrier properties of isolated soy protein composite edible films as affected by carvacrol and cinnamaldehyde micro and nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 72–79, 2016.

OZOGUL, Yesim; KULEY BOĞA, Esmeray; AKYOL, Ismail; DURMUS, Mustafa; UCAR, Yılmaz; REGENSTEIN, Joe M.; KÖŞKER, Ali Rıza. Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. **Food Bioscience**, v. 36, n. 4, 2020a.

OZOGUL, Yesim; KULEY, Esmeray; AKYOL, Ismail; DURMUS, Mustafa; REGENSTEIN, Joe M.; ALL, R. Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 36, n. 2, 2020b.

PAGAR, Kanchan R.; DAREKAR, A. B. Nanoemulsion: A new concept of Delivery System. **Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 1, p. 39, 2019.

PAN, Xiaojun; AKANO, Hiroyuki. Effects of Chlorine-Based Antimicrobial Treatments on the Microbiological Qualities of Selected Leafy Vegetables and Wash Water. **Food Science and Technology Research**, v. 20, n. 4, p. 765–774, 2014.

PARISH, M. E.; BEUCHAT, L. R.; SUSLOW, T. V.; HARRIS, L. J.; GARRETT, E. H.; FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. Methods to Reduce / Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 5, p. 161–173, 2003.

PARK, Shin Young; KANG, Sujin; HA, Sang Do. Antimicrobial effects of vinegar against norovirus and *Escherichia coli* in the traditional Korean vinegared green laver (*Enteromorpha intestinalis*) salad during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 208–214, 2016.

PATHAK, Manabendra. Nanoemulsions and Their Stability for Enhancing Functional Properties of Food Ingredients. **Nanotechnology Applications in Food**. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 87–106.

PATIL, Supriya S.; DHUMAL, Sangram S.; PATGAONKAR, Deepak R.; GARANDE, Vishnu K.; KAUR, Manpreet. Post-Harvest Behavior of Different Lettuce Cultivars and their Cut Form under Different Storage Conditions. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 1232–1246, 2017.

PEPE, Giacomo; SOMMELLA, Eduardo; MANFRA, Michele; DE NISCO, Mauro; TENORE, Gian Carlo; SCOPA, Antonio; SOFO, Adriano; MARZOCCO, Stefania; ADESSO, Simona; NOVELLINO, Tiziana; CAMPIGLIA, Pietro. Evaluation of anti-inflammatory activity and fast UHPLC-DAD-IT-TOF profiling of polyphenolic compounds

extracted from green lettuce (*Lactuca sativa* L.; Var. Maravilla de Verano). **Food Chemistry**, v. 167, p. 153–161, 2015.

PERCIVAL, Steven L.; WILLIAMS, David W. *Escherichia coli*. Second Edi ed. [s.l.]: Elsevier, 2013.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta; GEORGESCU, Cecilia; TURCUȘ, Violeta; OLAH, Neli Kinga; MATHE, Endre. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922–935, 2018.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta; GEORGESCU, Cecilia; TURCUȘ, Violeta; OLAH, Neli Kinga; MATHE, Endre. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922–935, 2018c.

POTHAKOS, Vasileios; SNAUWAERT, Cindy; DE VOS, Paul; HUYS, Geert; DEVLIEGHERE, Frank. Monitoring psychrotrophic lactic acid bacteria contamination in a ready-to-eat vegetable salad production environment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 7–16, 2014.

PRAKASH, Anand; BASKARAN, Revathy; PARAMASIVAM, Nithyanand; VADIVEL, Vellingiri. Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. **Food Research International**, v. 111, n. May, p. 509–523, 2018.

QUINTO, Emiliano J.; CARO, Irma; VILLALOBOS-DELGADO, Luz H.; MATEO, Javier; DE-MATEO-SILLERAS, Beatriz; REDONDO-DEL-R, P. Food Safety through Natural Antimicrobials. **Antibiotics**, v. 8, n. 208, p. 1–30, 2019.

RADULOVIC, N. S.; BLAGOJEVIC, P. D.; STOJANOVIC-RADIC, Z. Z.; STOJANOVIC, N. M. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 932–952, 2013.

RAMACHANDRAN, Girish. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. **Landes Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 213–218, 2014.

RAMOS, B.; MILLER, F. A.; BRANDÃO, T. R. S.; TEIXEIRA, P.; SILVA, C. L. M. Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 1–15, 2013.

RAYBAUDI-MASSILIA, Rosa M.; MOSQUEDA-MELGAR, Jonathan; SOLIVA-FORTUNY, Robert; MART, Olga. Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Antimicrobials. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 157–180, 2009.

RICO, D.; MARTÍN-DIANA, A. B.; BARAT, J. M.; BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 7, p. 373–386, 2007.

ROSSO, Annalisa; LOLLO, Giovanna; CHEVALIER, Yves; TROUNG, Nam; BORDES, Claire; BOURGEOIS, Sandrine; MANITI, Ofelia; GRANJON, Thierry; DUGAS, Pierre Yves; URBANIAK,

Sebastien; BRIANÇON, Stephanie. Development and structural characterization of a novel nanoemulsion for oral drug delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 593, n. 2, p. 124614, 2020.

RYU, Victor; MCCLEMENTS, David J.; CORRADINI, Maria G.; YANG, Jason Suzhao; MCLANDSBOROUGH, Lynne. Natural antimicrobial delivery systems: Formulation, antimicrobial activity, and mechanism of action of quillaja saponin-stabilized carvacrol nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 442–450, 2018.

SAGONG, Hun-Gu; LEE, Sun-Young; CHANG, Pahn-Shick; HEU, Sunggi; RYU, Sangryeol; CHOI, Young-Jin; KANG, Dong-Hyun. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 287–292, 2011.

SALA, Fernando Cesar; DA COSTA, Cyro Paulino. Retrospectiva e tendência da alfacultura Brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187–194, 2012.

SALMINEN, Hanna; BISCHOFF, Sonja; WEISS, Jochen. Formation and stability of emulsions stabilized by Quillaja saponin–egg lecithin mixtures. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 4, p. 1213–1222, 2020.

SANTOS, M. I. S.; MARTINS, S. R.; PEDROSO, L.; SOUSA, I.; FERREIRA, M. A. S. S. Potential bio-activity of whey fermented extract as sanitizer of organic grown lettuce. **Food Control**, v. 50, p. 477–481, 2015.

SARHEED, Omar; SHOUQAIR, Douha; RAMESH, K. V. R. N. S.; KHALEEL, Taha; AMIN, Muhammad; BOATENG, Joshua; DRECHSLER, Markus. Formation of stable nanoemulsions by ultrasound-assisted two-step emulsification process for topical drug delivery: Effect of oil phase composition and surfactant concentration and loratadine as ripening inhibitor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 576, n. 9, 2019, p. 118952, 2020.

SEVERINO, Renato; FERRARI, Giovanna; VU, Khanh Dang; DONSI, Francesco; SALMIERI, Stéphane; LACROIX, Monique. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on green beans. **Food Control**, v. 50, p. 215–222, 2015.

SEVERINO, Renato; VU, Khanh Dang; DONSI, Francesco; SALMIERI, Stéphane; FERRARI, Giovanna; LACROIX, Monique. Antimicrobial effects of different combined non-thermal treatments against *Listeria monocytogenes* in broccoli florets. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 1–10, Mar. 2014.

SETYA, Sonal; TALEGAONKAR, Sushama. Nanoemulsions: Formulation Methods and Stability Aspects. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 2214–2228, 2014.

SEWLIKAR, Snigdha; D'SOUZA, Doris H. Antimicrobial Effects of Quillaja saponaria Extract Against *Escherichia coli* O157:H7 and the Emerging Non-O157 Shiga Toxin-

Producing *E. coli*. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 5, p. 1171–1177, 2017.

SHAH, Urvi; RANIERI, Pietro; ZHOU, Yuyuan; SCHAUER, Caroline L.; MILLER, Vandana; FRIDMAN, Gregory; SEKHON, Jasreen K. Effects of cold plasma treatments on spot-inoculated *Escherichia coli* O157:H7 and quality of baby kale (*Brassica oleracea*) leaves. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 57, p. 102104, 2019.

SHAO, Ying; WU, Chunhua; WU, Tiantian; LI, Yuan; CHEN, Shiguo; YUAN, Chunhong; HU, Yaqin. Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 193, n. 3, p. 144–152, 2018.

SHARIFI-RAD, Mehdi; VARONI, Elena Maria; IRITI, Marcello; MARTORELL, Miquel; SETZER, William N.; DEL MAR CONTRERAS, María; SALEHI, Bahare; SOLTANI-NEJAD, Azam; RAJABI, Sadegh; TAJBAKHSH, Mercedeh; SHARIFI-RAD, Javad. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1675–1687, 2018.

SHATILOV, M. V.; RAZIN, A. F.; IVANOVA, M. I. Analysis of the world lettuce market. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 395, n. 1, 2019.

SHETH, Tanvi; SESHADRI, Serena; PRILESZKY, Tamás; HELGESON, Matthew E. Multiple nanoemulsions. **Nature Reviews Materials**, v. 5, n. 3, p. 214–228, 2020.

SIDDIQUI, Md Wasim; CHAKRABORTY, Ivi; AYALA-ZAVALA, J. F.; DHUA, R. S. Advances in minimal processing of fruits and vegetables: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 70, n. 10, p. 823–834, 2011.

SILVA, Beatriz Nunes; CADAVEZ, Vasco; TEIXEIRA, José A.; GONZALES-BARRON, Ursula. Meta-analysis of the incidence of foodborne pathogens in vegetables and fruits from retail establishments in Europe. **Current Opinion in Food Science**, v. 18, p. 21–28, 2017.

SILVEIRA, Josete Baialardi; HESSEL, Claudia Titze; TONDO, Eduardo Cesar. Inactivation of *Salmonella* enteritidis on lettuces used by minimally processed vegetable industries. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 1, p. 34–41, 2017.

SIMKO, Ivan; HAYES, Ryan J.; MOU, Beiquan; MCCREIGHT, James D. Lettuce and Spinach. *In: Yield Gains in Major U.S. Field Crops*. 33. ed. [s.l.] : American Society of Agronomy, 2015. p. 53–85.

SINGH, Prashant; HUNG, Yen-Con; QI, Hang. Efficacy of Peracetic Acid in Inactivating Foodborne Pathogens on Fresh Produce Surface. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 2, p. 432–439, 2018.

SINGH, Trepti; SHUKLA, Shruti; KUMAR, Pradeep; WAHLA, Verinder; BAJPAI, Vivek K. Application of nanotechnology in food science: Perception and overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–7, 2017.

SIROLI, Lorenzo; PATRIGNANI, Francesca; SERRAZANETTI, Diana I.; TAPPI, Silvia; ROCCULI, Pietro; GARDINI, Fausto; LANCIOTTI, Rosalba. Natural antimicrobials to



prolong the shelf-life of minimally processed lamb's lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, [S. l.], v. 103, p. 35–44, 2015a.

SIROLI, Lorenzo; PATRIGNANI, Francesca; SERRAZANETTI, Diana I.; TAPPI, Silvia; ROCCULI, Pietro; GARDINI, Fausto; LANCIOTTI, Rosalba. Postharvest Biology and Technology Natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed lamb ' s lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 103, p. 35–44, 2015b.

SOUZA, Giovanna C; SPINOSA, Wilma A; OLIVEIRA, Tereza CRM. Sanitizing action of triple-strength vinegar against *Escherichia coli* on lettuce. **Horticultura Brasileira**, v. 36, no. 3, p. 414–418, 2018.

SOW, Li Cheng; TIRTAWINATA, Felisa; YANG, Hongshun; SHAO, Qingsong; WANG, Shifei. Carvacrol nanoemulsion combined with acid electrolysed water to inactivate bacteria, yeast in vitro and native microflora on shredded cabbages. **Food Control**, [S. l.], v. 76, p. 88–95, 2017.

STUART, Diana. “Nature” is Not Guilty: Foodborne Illness and the Industrial Bagged Salad. **Sociologia Ruralis**, v. 51, n. 2, p. 158–174, 2011.

TAŞTAN, Özge; PATARO, Gianpiero; DONSI, Francesco; FERRARI, Giovanna; BAYSAL, Taner. Decontamination of fresh-cut cucumber slices by a combination of a modified chitosan coating containing carvacrol nanoemulsions and pulsed light. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 260, n. 8, p. 75–80, 2017.

VAISHANAVI, Saravanakumar; PREETHA, Radhakrishnan. Soy protein incorporated nanoemulsion for enhanced stability of probiotic (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) and its characterization. **Materials Today: Proceedings**, p. 4–9, 2020.

VALILIS, Evangelia; RAMSEY, Alison; SIDIQ, Saad; DUPONT, Herbert L. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*—A poorly appreciated enteric pathogen: Systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 76, p. 82–87, 2018.

VIACAVA, Gabriela E.; AYALA-ZAVALA, Jesús F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, Gustavo A.; ANSORENA, María R. Effect of free and microencapsulated thyme essential oil on quality attributes of minimally processed lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 145, n.4, p. 125–133, 2018.

VILLALOBOS-DELGADO, Luz H.; CARO, Irma; QUINTO, Emiliano J.; MATEO, Javier. **Natural antimicrobial agents to improve foods shelf life**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2019.

WIECZYŃSKA, Justyna; CAVOSKI, Ivana. Antimicrobial, antioxidant and sensory features of eugenol, carvacrol and trans-anethole in active packaging for organic ready-to-eat iceberg lettuce. **Food Chemistry**, v. 259, n. December 2017, p. 251–260, 2018.

YANG, Ying; LESER, Martin E.; SHER, Alexander A.; MCCLEMENTS, David Julian. Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale®). **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 589–596, 2013.

YUAN, Wenqian; TEO, Constance Hui Min; YUK, Hyun Gyun. Combined antibacterial

activities of essential oil compounds against *Escherichia coli* O157:H7 and their application potential on fresh-cut lettuce. **Food Control**, v. 96, n. May 2018, p. 112–118, 2019.

ZHANG, Hongchao; WANG, Siyuan; GOON, Kasey; GILBERT, Andrea; NGUYEN HUU, Cuong; WALSH, Martin; NITIN, Nitin; WRENN, Steven; TIKEKAR, Rohan V. Inactivation of foodborne pathogens based on synergistic effects of ultrasound and natural compounds during fresh produce washing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 64, n. 11, 2019, p. 104983, 2020.

ZHANG, Ruojie; ZHANG, Zipei; MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions: An emerging platform for increasing the efficacy of nutraceuticals in foods. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 194, p. 111202, 2020.

ZHANG, Zhiyun; TAN, Yunbing; MCCLEMENTS, David Julian. Investigate the adverse effects of foliarly applied antimicrobial nanoemulsion (carvacrol) on spinach. **LWT**, v. 141, n. 1, p. 110936, 2021.

**APÊNDICE A – DADOS SUPLEMENTARES DO EFEITO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS**

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração de Inativação Bacteriana (CIB) das formulações no dia da produção contra coquetéis de *Salmonella* e de *E. coli*

Amostra	Coquetel <i>Salmonella</i>		Coquetel <i>E. coli</i>	
	CIM (mg/mL)	CIB (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CIB (mg/mL)
<b>NCP1</b>	0,92 ± 0,40 <sup>d</sup>	1,15 ± 0,40 <sup>c</sup>	0,69 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,92 ± 0,40 <sup>c</sup>
<b>NCP2</b>	2,75 ± 0,00 <sup>b</sup>	5,51 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,38 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,84 ± 0,80 <sup>b</sup>
<b>CNEP1</b>	0.69 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.69 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.69 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.69 ± 0.00 <sup>c</sup>
<b>CNEP2</b>	0.69 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.69 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.57 ± 0.20 <sup>d</sup>	0.57 ± 0.20 <sup>c</sup>
<b>NCS1</b>	0,57 ± 0,20 <sup>e</sup>	0,69 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,57 ± 0,20 <sup>d</sup>	0,69 ± 0,00 <sup>c</sup>
<b>NCS2</b>	1,38 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,84 ± 0,79 <sup>c</sup>	1,15 ± 0,40 <sup>c</sup>	1,38 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>CNES1</b>	0.58 ± 0.20 <sup>e</sup>	0.69 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.46 ± 0.20 <sup>d</sup>	0.69 ± 0.00 <sup>c</sup>
<b>CNES2</b>	0.34 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.69 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.34 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.69 ± 0.00 <sup>c</sup>
<b>ACET</b>	3,13 ± 0,00 <sup>b</sup>	6,25 ± 0,00 <sup>b</sup>	3,13 ± 0,00 <sup>b</sup>	12,5 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>CIT</b>	6,25 ± 0,00 <sup>a</sup>	25,0 ± 0,00 <sup>a</sup>	6,25 ± 0,00 <sup>a</sup>	12,5 ± 0,00 <sup>a</sup>

Fonte: Autora (2022).

Legenda: Dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. contaminada sem tratamento; Nanoemulsão de carvacrol com polisorbato 80 (NCP1 e NCP2); Carvacrol não-encapsulado com polisorbato 80 (CNEP1 e CNEP2); Nanoemulsão de carvacrol com saponina (NCS1 e NCS2); Carvacrol não-encapsulado com saponina (CNES1 e CNES2); Ácido acético (ACET); Ácido cítrico (CIT).

<sup>a,b,c,d</sup> Médias que não compartilham letras minúsculas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

## APÊNDICE B – DADOS SUPLEMENTARES DA APLICAÇÃO DE NANOEMULSÃO DE CARVACROL E DE CARVACROL NÃO-ENCAPSULADO EM ALFACES

Tabela 2 – Contagem de células viáveis de *Salmonella* e *E. coli* após imersão de alfaces artificialmente contaminadas com essas bactérias em nanoemulsão de carvacrol (NCS1) e em carvacrol não-encapsulado (CNES1)

Tratamento	Tempo	Coquetel <i>Salmonella</i> log UFC/g		Coquetel <i>E. coli</i> log UFC/g	
		BIC	2×BIC	BIC	2×BIC
NCS1	0,5 min	3,16 ± 0,16 <sup>bb</sup>	2,36 ± 0,37 <sup>cb</sup>	3,02 ± 0,30 <sup>bb</sup>	2,92 ± 0,14 <sup>bb</sup>
	5 min	3,02 ± 0,15 <sup>bb</sup>	2,12 ± 0,27 <sup>cb</sup>	2,92 ± 0,30 <sup>bb</sup>	2,43 ± 0,25 <sup>bc</sup>
	10 min	2,28 ± 0,27 <sup>bc</sup>	<ALD*	2,66 ± 0,26 <sup>bc</sup>	2,40 ± 0,13 <sup>bc</sup>
	15 min	2,06 ± 0,27 <sup>bc</sup>	<ALD*	2,23 ± 0,16 <sup>bc</sup>	2,18 ± 0,16 <sup>bc</sup>
CNES1	0,5 min	2,48 ± 0,15 <sup>cb</sup>	2,43 ± 0,23 <sup>cb</sup>	2,97 ± 0,13 <sup>bb</sup>	3,04 ± 0,19 <sup>bb</sup>
	5 min	2,44 ± 0,29 <sup>cb</sup>	2,05 ± 0,43 <sup>cb</sup>	2,82 ± 0,17 <sup>bc</sup>	2,53 ± 0,07 <sup>bc</sup>
	10 min	2,34 ± 0,35 <sup>bb</sup>	<ALD*	2,79 ± 0,25 <sup>bc</sup>	2,35 ± 0,37 <sup>bc</sup>
	15 min	2,23 ± 0,13 <sup>bb</sup>	<ALD*	2,39 ± 0,16 <sup>bc</sup>	2,10 ± 0,21 <sup>bc</sup>
C+	-	5,56 ± 0,30 <sup>aA</sup>		5,52 ± 0,13 <sup>aA</sup>	

Fonte: Autores (2022).

Legenda: \*ALD: abaixo do limite de detecção da técnica de Spread Plate (< 2 log UFC/g)

Dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Amostra de alface contaminada sem tratamento (C+); Alfaces tratadas com nanoemulsão de carvacrol com saponina (NCS1); Alfaces tratadas com carvacrol não-encapsulado com saponina (CNES1).

<sup>a,b,c</sup> Médias de vários antimicrobianos no mesmo tempo de imersão que não compartilham letras minúsculas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

<sup>A,B,C</sup> Médias do mesmo antimicrobiano em diferentes tempos de imersão que não compartilham letras maiúsculas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

## APÊNDICE C – DADOS SUPLEMENTARES DA APLICAÇÃO DE SANITIZANTES EM ALFACES

Tabela 3 – Contagem de células viáveis de *Salmonella* e *E. coli* após imersão de alfaces artificialmente contaminadas com essas bactérias em solução de hipoclorito de sódio (100 ppm e 150 ppm)

Tempo	Coquetel <i>Salmonella</i> log UFC/g		Coquetel <i>E. coli</i> log UFC/g	
	100 ppm	150 ppm	100 ppm	150 ppm
<b>0,5 min</b>	2,88 ± 0,27 <sup>b</sup>	2,75 ± 0,24 <sup>b</sup>	3,25 ± 0,26 <sup>b</sup>	3,09 ± 0,11 <sup>b</sup>
<b>5 min</b>	2,63 ± 0,30 <sup>b</sup>	2,62 ± 0,15 <sup>b</sup>	3,13 ± 0,43 <sup>b</sup>	2,69 ± 0,48 <sup>c</sup>
<b>10 min</b>	2,54 ± 0,49 <sup>b</sup>	2,24 ± 0,13 <sup>c</sup>	2,79 ± 0,31 <sup>c</sup>	2,47 ± 0,57 <sup>c</sup>
<b>15 min</b>	2,38 ± 0,37 <sup>c</sup>	2,12 ± 0,16 <sup>c</sup>	2,59 ± 0,54 <sup>c</sup>	2,36 ± 0,43 <sup>c</sup>
<b>C+</b>	5,56 ± 0,30 <sup>a</sup>		5,52 ± 0,13 <sup>a</sup>	

Fonte: Autora (2022). Legenda: Dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Amostra de alface contaminada sem tratamento (C+); <sup>a,b,c,d</sup> Médias que não compartilham letras minúsculas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 4 – Contagem de células viáveis de *Salmonella* e *E. coli* após imersão de alfaces artificialmente contaminadas com essas bactérias em ácido acético e ácido cítrico

Tratamento	Tempo	Coquetel <i>Salmonella</i> (log UFC/g)		Coquetel <i>E. coli</i> (log UFC/g)	
		BIC	2×BIC	BIC	2×BIC
<b>Ácido acético</b>	0,5 min	4,55 ± 0,04 <sup>b</sup>	3,98 ± 0,27 <sup>b</sup>	4,48 ± 0,36 <sup>b</sup>	3,51 ± 0,09 <sup>b</sup>
	5 min	4,48 ± 0,07 <sup>b</sup>	3,92 ± 0,14 <sup>b</sup>	3,93 ± 0,09 <sup>b</sup>	3,35 ± 0,30 <sup>c</sup>
	10 min	4,33 ± 0,54 <sup>c</sup>	3,21 ± 0,33 <sup>c</sup>	3,61 ± 0,65 <sup>c</sup>	3,39 ± 0,26 <sup>c</sup>
	15 min	4,24 ± 0,18 <sup>c</sup>	3,04 ± 0,19 <sup>c</sup>	3,67 ± 0,17 <sup>c</sup>	3,19 ± 0,18 <sup>c</sup>
<b>Ácido cítrico</b>	0,5 min	4,34 ± 0,10 <sup>c</sup>	3,52 ± 0,18 <sup>b</sup>	4,12 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,78 ± 0,27 <sup>b</sup>
	5 min	3,55 ± 0,11 <sup>d</sup>	2,86 ± 0,25 <sup>d</sup>	3,59 ± 0,12 <sup>c</sup>	3,10 ± 0,25 <sup>c</sup>
	10 min	3,24 ± 0,59 <sup>d</sup>	2,82 ± 0,16 <sup>d</sup>	3,36 ± 0,57 <sup>c</sup>	3,04 ± 0,44 <sup>c</sup>
	15 min	3,21 ± 0,31 <sup>d</sup>	2,75 ± 0,12 <sup>d</sup>	3,16 ± 0,42 <sup>d</sup>	2,75 ± 0,12 <sup>d</sup>
<b>C+</b>	-	5,56 ± 0,30 <sup>a</sup>		5,52 ± 0,13 <sup>a</sup>	

Fonte: Autora (2022). Legenda: Dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Amostra de alface contaminada sem tratamento (C+); <sup>a,b,c,d</sup> Médias que não compartilham letras minúsculas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).