

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

JULIANA BOTH ENGEL

Ação desinfetante de soluções de timol e carvacrol livres e encapsulados em lipossomas sobre *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* aderidos em aço inoxidável AISI 304

Porto Alegre

2015

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

JULIANA BOTH ENGEL

Ação desinfetante de soluções de timol e carvacrol livres e encapsulados em lipossomas sobre *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* aderidos em aço inoxidável AISI 304

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

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

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Engel, Juliana Both

Ação desinfetante de soluções de timol e carvacrol livres e encapsulados em lipossomas sobre Salmonella spp. e Staphylococcus aureus aderidos em aço inoxidável AISI 304 / Juliana Both Engel. -- 2015. 58 f.

Orientadora: Patrícia da Silva Malheiros.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Ação desinfetante. 2. Timol e Carvacrol. 3. Lipossomas. 4. Salmonella spp. e Staphylococcus aureus. 5. Aço inoxidável AISI 304. I. Malheiros, Patrícia da Silva, orient. II. Título.

JULIANA BOTH ENGEL

Ação desinfetante de soluções de timol e carvacrol livres e encapsulados em lipossomas sobre *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* aderidos em aço inoxidável AISI 304

Aprovada em: ____/____/____

.....
Patrícia da Silva Malheiros

(Orientadora)

Doutora em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente – UFRGS

.....
Letícia Sopeña Casarin

Doutora em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente – UFRGS

.....
Eduardo César Tondo

Doutor em Ciências Biológicas –
UFRGS

.....
Susana de Oliveira Elias

Mestre em Microbiologia agrícola e do
ambiente - UFRGS

*Aos meus pais, Milton e Neusa, e
a minha irmã, Adriana, que me
inspiram e que amo tanto,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai, Milton, e a minha mãe, Neusa, pelo amor incondicional e pelo incentivo na busca por conhecimento. Vocês são os meus maiores exemplos. Obrigada pelo apoio e pelas palavras de carinho nos momentos de dúvida.

Agradeço a minha irmã, Adriana, que mesmo distante se mostrou presente em muitos momentos, me ajudando e cuidando de mim. Amo vocês além das palavras!

Agradeço a minha orientadora, Prf^ª. Dr^ª. Patrícia, pelos ensinamentos, paciência, ideias e correções ao longo do percurso e pela atenção.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por proporcionar conhecimento e formação de qualidade.

Agradeço aos Professores Eduardo e Adriano, pelo empréstimo de equipamentos para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS) pela ajuda ao longo do caminho, em especial á Caroline Heckler pela ajuda nos experimentos.

Agradeço ao Diego, Ana Carolina e Carol Kothe pela amizade, companheirismo, ajuda e bons momentos que compartilhamos no Laboratório.

Agradeço a Vera, grande amiga, que se preocupou e cuidou de mim em Porto Alegre. Agradeço por todos os “puxões de orelha” e por nossas conversas.

Agradeço a Natasha, Érika e Mariana, grandes amigas que a Engenharia de Alimentos me proporcionou e que se tornaram imensamente importantes em minha vida, principalmente nesta reta final de curso. Com vocês compartilhei momentos muito felizes, risadas e cumplicidade. Obrigada pela ajuda e por estarem sempre por perto. Amo vocês!

Agradeço a todos os que de forma direta ou indireta se mostraram importantes na minha formação. Obrigada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos Específicos.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. Micro-organismos de importância na pesquisa	11
3.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
3.1.2. <i>Salmonella spp.</i>	12
3.2. Higiene na Indústria de Alimentos	14
3.3. Adesão bacteriana	15
3.4. Aço Inoxidável.....	16
3.5. Antimicrobianos naturais	18
3.6. Encapsulação em lipossomas de antimicrobianos naturais presentes em óleos essenciais	20
4. ARTIGO	23
5. CONCLUSÕES.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

Ação desinfetante de soluções de timol e carvacrol livres e encapsulados em lipossomas sobre *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* aderidos em aço inoxidável AISI 304

Autora: Juliana Both Engel; Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Malheiros

RESUMO

A adesão de micro-organismos em superfícies de contato é etapa fundamental do processo de formação de biofilmes, que representa preocupação à indústria de alimentos, uma vez que podem apresentar grande resistência a tratamentos antimicrobianos, podem causar deterioração e veiculação de patógenos. Além disso, o aumento da preocupação dos consumidores em relação ao uso de agentes químicos artificialmente sintetizados encorajam pesquisas envolvendo o uso de compostos naturais com atividade antimicrobiana. Timol e carvacrol, presentes em óleos essenciais, tem se destacado pela capacidade de inibir a multiplicação de patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação desinfetante de timol e carvacrol livres e encapsulados frente a *S. aureus* e *Salmonella* spp. inoculados em caldo BHI e leite de vaca integral UHT, aderidos ao aço inoxidável AISI 304. Primeiramente, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada utilizando placas de microdiluição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute*, e a partir destas concentrações foram preparadas soluções alcoólicas 20% (v/v) contendo timol e carvacrol. Os lipossomas para a encapsulação foram desenvolvidos pela técnica de hidratação do filme lipídico. Corpos de prova de aço inoxidável permaneceram por 15 minutos em contato com as culturas bacterianas e, em seguida, foram expostos as soluções sanitizantes, durante 1 e 10 minutos. Após o tempo de exposição, o número de células sobreviventes foi determinado por contagem em placas. *S. aureus* apresentou valores de CIM para timol e carvacrol de 0,662 mg/mL e *Salmonella* spp. de 0,331 mg/mL, para ambos os compostos. Os resultados mostram que a aderência dos micro-organismos ao aço inoxidável foi de 5,5 a 6,5 log UFC/cm². As soluções alcoólicas preparadas com timol e carvacrol causaram inibição total (6,1 log UFC/cm²) do *pool* de *S. aureus* mesmo quando o tempo de ação foi de 1 minuto e na presença de resíduos de leite. A inibição total de *Salmonella* spp. (5,94 log UFC/cm²) somente ocorreu após 10 minutos. O controle positivo feito com solução alcoólica 20% (v/v) confirmou que o efeito antimicrobiano ocorreu somente quando o timol ou carvacrol estavam presentes na solução desinfetante. Os lipossomas contendo timol/carvacrol apresentaram tamanho de 270,2 ± 12,5 nm, polidispersidade de 0,339 ± 0,17 e potencial zeta de + 39,99 ± 2,72 mV. Este composto não inibiu totalmente a população de patógenos aderidos ao aço inoxidável com 1 minuto de contato. Para inativação de *S. aureus* ou *Salmonella* spp. foi necessário manter os lipossomas (CIM = 0,662 mg/mL) em contato com o material por 10 minutos, sugerindo uma liberação mais lenta dos antimicrobianos encapsulados.

Palavras-chave: timol; carvacrol; lipossomas; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella* spp.

LISTA DE ABREVIATURAS

AISI: American Iron and Steel Institute

ATCC: American Type Culture Collection

BHI: Brain Heart Infusion

CFR: Code of Federal Regulations

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CIP: Cleaning in Place

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

FDA: Food and Drug Administration

GRAS: Generally Regarded As Safe

UFC/cm²: Unidades Formadoras de Colônia por centímetro quadrado

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

LISTA DE FIGURAS

Da Revisão Bibliográfica:

Figura 1: Estrutura e classificação dos lipossomas.....21

Do Artigo:

Figura 1: Inativação de *Staphylococcus aureus* (cultivado em leite de vaca integral) aderido em aço inoxidável utilizando solução alcoólica 20% contendo timol (CIM = 0,6625 mg/mL), carvacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) e lipossomas contendo timol/carvacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) após 10 minutos de contato. A barra cinza mostra a população que aderiu ao coupon após 15 minutos de contato e a barra pontilhada cinza mostra o efeito da solução alcoólica 20% (v/v) sem antimicrobianos.....34

Figura 2: Inativação de *Staphylococcus aureus* (cultivado em leite de vaca integral) aderido em aço inoxidável utilizando solução alcoólica 20% contendo timol (CIM = 0,6625 mg/mL), carvacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) e lipossomas contendo timol/carvacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) após 1 minuto de contato. A barra cinza mostra a população que aderiu ao coupon após 15 minutos de contato e a barra pontilhada cinza mostra o efeito da solução alcoólica 20% (v/v) sem antimicrobianos.....35

Figura 3: Inativação de *Salmonella* spp. (cultivada em leite de vaca integral) aderido em aço inoxidável utilizando solução alcoólica 20% contendo timol (CIM = 0,3312 mg/mL), carvacrol (CIM = 0,3312 mg/mL) e lipossomas contendo timol/carvacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) após 10 minutos de contato. A barra cinza mostra a população que aderiu ao coupon após 15 minutos de contato e a barra pontilhada cinza mostra o efeito da solução alcoólica 20% (v/v) sem antimicrobianos.....38

Figura 4: Inativação de *Salmonella* spp. (cultivada em leite de vaca integral) aderido em aço inoxidável utilizando solução alcoólica 20% contendo timol (CIM = 0,3312 mg/mL), carvacrol (CIM = 0,3312 mg/mL) e lipossomas contendo timol/carvacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) após 1 minuto de contato. A barra cinza mostra a população que aderiu ao coupon após 15 minutos de contato e a barra pontilhada cinza mostra o efeito da solução alcoólica 20% (v/v) sem antimicrobianos.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima de timol, carvacrol e lipossomas contendo carvacrol/timol para <i>pool</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella</i> spp.....	31
---	----

1. INTRODUÇÃO

Um das maiores preocupações envolvendo controle de qualidade e segurança dos alimentos é a adesão de micro-organismos. Limpeza e sanitização insuficientes de superfícies que entram em contato com alimentos podem proporcionar a sobrevivência de células microbianas e ocasionar a formação de biofilmes, causando contaminação cruzada, diminuição da vida de prateleira e também transmissão de doenças (KASNOWSKI *et al.*, 2010; ORTEGA *et al.*, 2010; PALABIYIK *et al.*, 2015).

De acordo com dados do Ministério da Saúde do Brasil, durante o período de 2000 a 2013, ocorreram 8.871 surtos de DTA. Dentre os micro-organismos mais envolvidos nos surtos encontram-se a *Salmonella* spp. como o principal agente causador de DTA (39,5%), seguida por *Staphylococcus aureus* (19,7%) (BRASIL, 2013).

Na tentativa de entender melhor o mecanismo de adesão de micro-organismos em superfícies que entram em contato com alimentos, muitos estudos já foram conduzidos, e o aço inoxidável foi o material mais utilizado, especialmente devido a sua resistência mecânica, à corrosão e facilidade de fabricação (ORTEGA *et al.*, 2010). São dois os tipos de ligas de aço inoxidável mais utilizados em indústrias de alimentos, sendo que a diferença entre eles é a porcentagem de níquel e a adição de outros elementos. O aço inoxidável AISI 316 apresenta maior resistência à corrosão (MARTINS, MOREIRA & MARTINS, 2014), entretanto, devido a seu elevado custo (SINDE & CARBALLO, 2000), muitas vezes seu uso é substituído pelo AISI 304 para confecção de superfícies de equipamentos de plantas produtoras deste ramo (BOARI *et al.*, 2009).

Visando evitar os problemas relacionados à adesão microbiana nas indústrias de alimentos, torna-se necessário o estabelecimento e a adequação das medidas de higiene e sanitização (KASNOWSKI *et al.*, 2010), esta deve ser realizada habitualmente por meio de agentes químicos objetivando a redução de micro-organismos até níveis seguros (SILVA, DUTRA & CADIMA, 2010). Entretanto, há uma mudança no pensamento dos consumidores, os quais vêm apresentando uma percepção negativa em relação ao uso de agentes químicos sintetizados artificialmente, levando a uma crescente demanda por produtos naturais.

Dentre esses produtos naturais, podem-se destacar compostos antimicrobianos presentes nos óleos essenciais de orégano e tomilho, como carvacrol e timol, por exemplo.

Ambos são compostos fenólicos com atividade antimicrobiana sendo reconhecidos pelo Food and Drug Administration (FDA) como substâncias seguras de acordo com o Code of Federal Regulations (CFR, 2015; AIT-OUAZZOU *et al.*, 2011). Entretanto, alguns problemas de estabilidade, possível interação entre os antimicrobianos naturais e compostos dos alimentos, hidrofobicidade e volatilidade podem resultar na diminuição da atividade antimicrobiana desses compostos presentes em óleos essenciais e dificultar sua aplicação na indústria de alimentos (BRANEN & DAVIDSON, 2004; CHOLLET *et al.*, 2008; WEISHEIMER *et al.*, 2010).

Uma alternativa para reduzir esses problemas pode ser a encapsulação utilizando lipossomas, pois dessa forma os compostos antimicrobianos ficariam protegidos dentro e/ou na superfície fosfolipídica de nanopartículas, diminuindo sua volatilidade e facilitando sua interação com a superfície processadora de alimentos. Além disso, a encapsulação poderia proporcionar uma liberação controlada levando a uma proteção adicional dos equipamentos e utensílios, diminuindo a possibilidade de contaminações cruzadas (MALHEIROS *et al.*, 2011; ASBAHANI *et al.*, 2015; ZORZI *et al.*, 2015).

Dado o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano de timol e carvacrol encapsulados ou não frente a um *pool* constituído por 4 cepas de *Staphylococcus aureus* e um *pool* constituído por 4 cepas *Salmonella* spp. aderidos em aço inoxidável AISI 304.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação desinfetante dos antimicrobianos naturais timol e carvacrol, livres e encapsulados em lipossomas, frente à *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* aderidos ao aço inoxidável AISI 304.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de timol e carvacrol frente a um *pool* constituído por 4 cepas de *Salmonella* spp. e um *pool* constituído por 4 cepas de *S. aureus*;
- Avaliar a ação desinfetante dos antimicrobianos naturais timol e carvacrol frente à *Salmonella* spp. aderidas ao aço inoxidável AISI 304;
- Avaliar a ação desinfetante dos antimicrobianos naturais timol e carvacrol frente a *S. aureus* aderidos ao aço inoxidável AISI 304;
- Encapsular os compostos em lipossomas, caracterizá-los e determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente ao *pool* constituído por 4 cepas de *Salmonella* spp. e um *pool* constituído por 4 cepas de *S. aureus*;
- Avaliar a ação desinfetante do composto encapsulado frente à *Salmonella* spp. aderidas ao aço inoxidável AISI 304;
- Avaliar a ação desinfetante do composto encapsulado frente à *S. aureus* aderidos ao aço inoxidável AISI 304;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Micro-organismos de importância na pesquisa

Dentre os vários microrganismos contaminantes, as bactérias do gênero *Salmonella* e *Staphylococcus* são um dos principais alvos, pois são fontes frequentes de doenças bacterianas transmitidas por alimentos. Contaminações alimentares ocasionadas por essas bactérias estão associadas, especialmente, a problemas durante o processamento e manipulação dos alimentos. Infecções e intoxicações alimentares ocasionadas por estas falhas podem ser fatais principalmente para crianças, idosos e pessoas imunodeprimidas (DAL POZZO *et al.*, 2011).

3.1.1. *Staphylococcus aureus*

De acordo com suas características fenotípicas, os *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos e catalase-positivos, imóveis e não-esporulados. Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas) (SANTOS *et al.*, 2007).

Tendo como reservatórios o homem e os animais, o principal habitat do *S. aureus* é a cavidade nasal do homem, sendo que esse micro-organismo pode ser encontrado em 30 a 50% dos indivíduos saudáveis. É a partir da cavidade nasal que o micro-organismo atinge a epiderme, ar, água, solo, alimentos, ou qualquer outro objeto que entre em contato com o indivíduo contaminado. Os portadores nasais de *S. aureus* ao manipularem alimentos podem se tornar importantes fontes de contaminação (SANTANA *et al.*, 2010).

A versatilidade nutricional e a capacidade de se multiplicarem em diferentes condições ambientais fazem com que o *S. aureus* desenvolva-se com facilidade em vários alimentos (SANTANA *et al.*, 2010). São mesófilos, com temperatura de multiplicação entre 7 e 47,8 °C, sendo 35 °C a temperatura ideal, e podem produzir enterotoxinas termo resistentes em temperaturas entre 10 e 46 °C, com temperatura ótima entre 40 e 45 °C. O pH ideal para seu desenvolvimento varia entre 7 a 7,5, mas é possível a multiplicação em alimentos com pH variando entre 4,2 e 9,3. Este grupo de micro-organismos ainda tem a capacidade de

sobreviver e se multiplicar em uma concentração de cloreto de sódio de até 15% e a produção de enterotoxina acontece em concentrações de sal de até 10%, o que faz com que os alimentos curados também sejam veículos potenciais de intoxicação. Quanto à atividade de água (a_w), dentre os patógenos alimentares, os estafilococos apresentam capacidade de se multiplicarem em alimentos com valores de atividade de água inferiores aos normalmente considerados mínimos para outras bactérias halófilas. O valor mínimo de a_w é 0,86, apesar de já ter sido relatada a multiplicação desses micro-organismos em alimentos com a_w de 0,83 (SANTANA *et al.*, 2010).

Segundo Santana *et al.* (2010) este micro-organismo é considerado um agente de grande importância, pois tem alta prevalência como contaminante e grande potencial como causador de intoxicações. Essas intoxicações são causadas pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento durante a multiplicação bacteriana.

Intoxicações causadas por *S. aureus* representam 4,5% das DTAs que ocorrem anualmente nos EUA. Já no Brasil, as informações relacionadas a essas DTAs são escassas e de difícil obtenção quanto aos agentes etiológicos causadores, alimento consumido e local de ocorrência, isso devido à falta de investigação e notificação das intoxicações estafilocócicas. Entretanto, *S. aureus* desponta como o segundo principal agente causador de doenças transmitidas por alimentos, com 19,7% dos casos (BRASIL, 2013), porcentagem pouco fiel à realidade devido aos diversos casos que não são notificados.

Intoxicações estafilocócicas ocorrem devido ao consumo de alimentos contendo quantidades suficientes de uma ou mais enterotoxinas pré-formadas (LE LOIR, BARON & GAUTIER, 2003). Os sintomas aparecem rapidamente após a ingestão de alimentos contaminados, geralmente entre 2 e 8 horas, e incluem náusea, vômitos, cólicas abdominais, com ou sem diarreia (BALABAN & RASOOLY, 2000; MURRAY, 2005), mas desaparecem dentro de 24 a 48 horas (MURRAY, 2005).

3.1.2. *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* se apresentam na forma de bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, com temperatura ótima para multiplicação de 37 °C.

Caracterizam-se por serem oxidase negativa e catalase positiva, além de produzirem ácido sulfídrico e descarboxilarem a lisina, características que auxiliam na identificação bioquímica desses micro-organismos (MILAN & TIMM, 2015).

Salmonella spp. são bactérias entéricas responsáveis por graves infecções alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países. Deve-se ressaltar que a maioria dos sorotipos desse gênero são patogênicos ao homem, apresentando diferenças de sintomatologia em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade, além da idade e da resposta imune do hospedeiro (SHINOHARA *et al.*, 2008).

No Brasil, este micro-organismo tem sido identificado como o principal agente causador de DTA investigadas pelos órgãos reguladores (BRASIL, 2013). O mesmo ocorre no Rio Grande do Sul, nos últimos anos, onde uma cepa de *Salmonella*, a *S. Enteritidis* SE86, foi identificada como responsável por mais de 90% dos casos de salmoneloses no Estado (GEIMBRA *et al.*, 2004; DE PAULA, 2006). Os fatores que tornaram esta cepa um importante patógeno de origem alimentar são ainda pouco claras, e podem estar relacionados à sua capacidade de adesão ou resistência a desinfetantes usuais (TONDO *et al.*, 2010).

Dentre os alimentos relacionados com as salmoneloses, as preparações à base de ovos têm recebido destaque, sendo a maionese caseira o principal veículo de muitos surtos no RS (MALHEIROS, DE PAULA & TONDO, 2007). Cunha (2008) relatou a ocorrência de 41,1% de surtos em serviços de alimentação no RS no período de 2000 a 2002, nos quais a *Salmonella* spp. foi responsável por 44,76% dos casos. Além disso, os alimentos mais relacionados aos surtos foram salada com maionese caseira (45,61%), seguida de produtos cárneos (24,56%) e produtos de confeitaria (12,28%). Entretanto, uma ampla variedade de alimentos podem ser contaminados com *Salmonella* spp., tais como carne bovina, suínos, aves, leite e derivados e frutos do mar, pois apresentam alto teor de umidade, de proteína e de carboidratos e são mais susceptíveis à deterioração (SHINOHARA *et al.*, 2008).

Outros grupos de alimentos como frutas e vegetais minimamente processados também podem ser veiculadores de salmoneloses, e essa contaminação ocorre devido ao controle inadequado da temperatura, por contaminação de alimentos crus em contato com alimentos processados (SHINOHARA *et al.*, 2008), manipulação inadequada e higiene deficiente de utensílios e equipamentos (CUNHA, 2008).

Os principais sorovares envolvidos nos casos de salmonelose em humanos são *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (VUGIA *et al.*, 2004), e a doença geralmente é caracterizada por gastroenterite (FAVRIN *et al.*, 2001). Embora a salmonelose causada por *S. Enteritidis* seja limitada ao trato gastrointestinal e o tratamento não envolva antibióticos, a utilização destes fármacos é recomendada quando os indivíduos envolvidos são imunodeprimidos ou quando os sintomas são mais severos, como febre e/ou presença de sangue nas fezes (CAPALONGA *et al.*, 2014).

3.2. Higiene na Indústria de Alimentos

O processo de higiene industrial visa criar um ambiente seguro e livre de contaminação em toda a unidade fabril. Tal processo tem consequências diretas na qualidade do produto final que será ofertado ao consumidor. Para tanto, é necessário que se conheçam os vários aspectos envolvidos neste procedimento, desde a qualidade da água, os tipos de resíduos a serem removidos, as funções dos diversos agentes de higienização, as condições de uso dos detergentes e sanificantes, os mecanismos de ação da higienização, como avaliar o processo e como corrigir eventuais falhas (SILVA, DUTRA & CADIMA, 2010).

O correto procedimento técnico no processo de higienização nas unidades fabris de gêneros alimentícios visa, basicamente, não só eliminar ou reduzir a carga microbiana indesejável dos alimentos, como também excluir por completo contaminações por sujidades diversas, proporcionando, dessa forma, um produto de melhor qualidade nutricional, sensorial e higiênico-sanitária (SILVA, DUTRA & CADIMA, 2010; MEMISI *et al.*, 2015).

Sendo assim, o procedimento de higienização compreende duas etapas: primeiro a limpeza e depois a desinfecção ou sanitização. A limpeza consiste na remoção de substâncias orgânicas e/ou minerais, como terra, poeira, gordura e outras sujidades indesejáveis à qualidade do alimento. Normalmente são perceptíveis a olho nu. Já a desinfecção ou sanitização é o procedimento de redução, através de agentes químicos ou físicos, do número de micro-organismos aderidos às instalações, maquinários e utensílios, em um nível que não resulte na contaminação do alimento (BATISTA, 2003; ANDRADE, 2008; SILVA, DUTRA & CADIMA, 2010).

A formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos contribui para infecções alimentares, uma vez que podem causar contaminação cruzada, problema relacionado com a capacidade de adesão de bactérias como *Salmonella* spp. e *S. aureus* (PARIZZI *et al.*, 2004). Dessa forma, na tentativa de evitar a disseminação deste tipo de contaminação, é necessária a escolha do sanitizante mais apropriado para as indústrias de alimentos, para que a redução do número de micro-organismos seja eficaz (DAVIDSON & HARRISON, 2002).

3.3. Adesão bacteriana

A adesão bacteriana e a formação de biofilmes ocorrem devido à deposição de micro-organismos em uma superfície de contato, onde eles se fixam e iniciam a multiplicação (AKUTSU, 2001, PALABIYIK *et al.*, 2015). Esse processo pode ser importante em um grande número de atividades tecnológicas, tais como na obtenção de produtos fermentados, no tratamento de resíduos e no tratamento de água, mas também apresenta desvantagens, tais como proporcionar o aumento da resistência a sanitizantes, acelerar processos corrosivos em equipamentos, além de atuar como veículo de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos (ARAÚJO *et al.*, 2010).

A adesão de micro-organismos em superfícies é um fenômeno que ocorre naturalmente em meios aquosos e depende de propriedades superficiais das interfaces dos suportes de adesão (aço, polímeros, mármore, vidro, entre outros), tais como tensão superficial e composição da superfície, além das características das membranas dos micro-organismos. Outro fator importante são as características do meio circundante, tais como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes (ARAÚJO *et al.*, 2010).

A formação de um biofilme inclui muitas etapas, mas um pré-requisito é a adesão das células microbianas à superfície, que resulta no acúmulo de biomassa e materiais extracelulares na superfície de um substrato (HORI & MATSUMOTO, 2010). Esse processo pode tanto ser benéfico e desejável como trazer desvantagens. No campo da indústria de alimentos, em alguns casos o processo de adesão bacteriana e formação de biofilmes podem ser desejáveis. A exemplo dos processos realizados em biorreatores na produção de alimentos fermentados, nos quais as bactérias produtoras de ácido acético crescem, adsorvendo e

agregando-se para conversão de diversos substratos em vinagre. Esses agregados microbianos são também usados em tratamentos aeróbios e anaeróbios de águas residuárias para a remoção de matéria orgânica e inorgânica (XAVIER *et al.*, 2005). No processo de potabilização de água, as remoções de nitrogênio, carbono biodegradável e precursores de tri-halometanos podem ser feitas por biofilmes microbianos submersos (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Já em outros casos tais fenômenos de adesão e formação de biofilme podem causar problemas, tais como tornar o processo de cloração da água menos eficiente, bem como reduzir a eficiência da transferência de calor em trocadores térmicos, diminuir o fluxo em tubulações, desencadear processos corrosivos, e talvez o aspecto mais importante, se tornarem fontes de contaminação microbiana, a qual pode constituir-se de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos, resultando em problemas de higiene, saúde pública e econômicos (ARAÚJO *et al.*, 2010).

3.4. Aço Inoxidável

Na indústria de alimentos, as superfícies mais comumente utilizadas são de aço inoxidável e de polímeros. Isso devido as suas excelentes propriedades e baixo custo em relação aos demais materiais. Tais materiais são geralmente empregados na fabricação de tanques, tubulações, acessórios e superfícies para processamento de alimentos (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Segundo Araújo *et al.* (2010) o aço inoxidável pode ser produzido em vários graus de polimento, dependendo da finalidade, o que afeta a adesão bacteriana devido a suas várias micro topografias e propriedades físico-químicas. A principal diferença entre os tipos de aço disponíveis comercialmente é sua composição relativa de ferro, cromo e níquel e a baixa porcentagem de carbono.

Dentre os vários tipos de aços inoxidáveis disponíveis, os mais utilizados são os do chamado grupo 18 - 8, ou seja, que apresentam em sua composição aproximadamente 18% de cromo e 8% de níquel. Deste grupo, as alterações do grau 300, por exemplo, 304 e 316, satisfazem à maioria das necessidades da indústria de alimentos. O grau 304 é resistente à corrosão originada pela maioria dos alimentos e agentes de limpeza e desinfecção. Em

problemas de corrosão mais intensos deve ser empregado o grau 316 que apresenta cerca de 10% de níquel e 3% de molibdênio. O aço inoxidável difere também no acabamento da superfície, que pode variar de acordo com o polimento empregado, que se classifica de 1, sem polimento, até 8, cuja superfície é espelhada. Normalmente, a indústria de alimentos utiliza o aço inoxidável 304 com polimento 4 (ARAÚJO *et al.*, 2010; MARTINS, MOREIRA & MARTINS, 2014).

Além disso, o aço inoxidável é considerado um material hidrofílico. Essa superfície geralmente permite uma menor aderência bacteriana quando comparada com superfícies hidrofóbicas como teflon, náilon e ampla variedade de polímeros, dentre eles o polietileno (SINDE & CARBALLO, 2000).

Muitos estudos envolvendo a adesão de micro-organismos em superfícies de aço inoxidável já foram realizados. Marques *et al.* (2007) verificou a capacidade de *S. aureus* formar biofilme em superfícies de aço inoxidável AISI 304, bem como a eficiência de sanificantes químicos dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético. Os resultados observados por estes autores indicaram a formação de biofilme com contagens bacterianas na ordem de 10^7 UFC/cm² e o sanificante mais eficiente foi o ácido peracético, que apresentou redução decimal de 4,5 log UFC/mL.

Furukawa *et al.* (2010) investigaram os efeitos de diferentes agentes de limpeza e desinfecção, como os utilizados no *clean in place* (CIP), emulsificantes e enzimas, e outros compostos, como EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), Tween20 (detergente não iônico) e SDS (detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio), na remoção de biofilme formado por *S. aureus* em placas de aço inoxidável. Os resultados mostraram que este micro-organismo formou um filme espesso e resistente à limpeza, mas compostos CIP fortemente ácidos e alcalinos apresentaram efeito de limpeza significativo, sendo que os agentes fortemente alcalinos foram os mais efetivos para a remoção deste biofilme.

A adesão de cepas de *Salmonella* spp. em aço inoxidável e a inativação por biocidas utilizados na indústria de alimentos foi investigada por Tondo *et al.* (2010). Os resultados observados neste estudo mostraram que o tempo de exposição entre a superfície e as cepas bacterianas não influenciou nas contagens de células aderidas, e a cepa *S. Enteritidis* SE86 apresentou clusters maiores nesta superfície quando comparada às outras cepas de *Salmonella* utilizadas. Além disso, os sanificantes não foram capazes de inativar todos os micro-

organismos aderidos no aço inoxidável. Pelo menos 1 log UFC/cm² de todos os sorovares testados permaneceu viável após a exposição à diferentes concentrações dos sanificantes.

Valeriano *et al.* (2012) avaliaram o efeito anti-biofilme de soluções desinfetantes formuladas com óleos essenciais de hortelã (*Mentha piperita*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) contra a formação de biofilme de *S. Enteritidis* S64 em superfícies de aço inoxidável 304 depois de 10, 20 e 40 minutos de contato. A Concentração Inibitória Mínima para ambos os óleos essenciais foi encontrada e a partir deste resultado foram formuladas soluções desinfetantes. Dez minutos de contato da superfície com a solução desinfetante reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) a população microbiana aderida para ambos os óleos analisados. Depois de 20 e 40 minutos de tratamento contagens de células não foram detectadas, fato que mostra o potencial uso destas substâncias como agentes sanificantes na indústria de alimentos.

3.5. Antimicrobianos naturais

Desde civilizações antigas, plantas aromáticas são empregadas em alimentos com diferentes propósitos. Atualmente, os óleos essenciais, extraídos de diversas plantas, que apresentam atividade antimicrobiana, estão ganhando especial interesse pela indústria de alimentos. A utilização destes óleos essenciais ou seus compostos majoritários como agentes conservantes e/ou sanificantes é desejável, pois podem ser utilizados como alternativa natural para substituir os antimicrobianos normalmente utilizados, tornando assim os alimentos mais saudáveis (COELHO *et al.*, 2013; PATRIGNANI *et al.*, 2015).

Como definição, óleos essenciais são líquidos aromáticos extraídos de flor, caule, folha, fruto, broto, semente, tronco ou raiz de plantas medicinais, ervas e plantas comestíveis, fato que minimiza questões a respeito da aplicação de tais compostos em alimentos, além de atingirem um amplo espectro microbiano, tanto para bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas (SILVA, 2007).

Os óleos essenciais derivados de plantas utilizadas como condimentos representam um grupo de antimicrobianos naturais tradicionalmente usados em alimentos para acentuar gosto ou aroma desses. Constituem-se de complexas misturas de substâncias voláteis em diferentes

concentrações, em que um composto farmacologicamente ativo é majoritário (DAL POZZO *et al.*, 2011).

Tanto timol como carvacrol são compostos fenólicos encontrados, por exemplo, no óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* Linneus), sendo que neste o carvacrol está presente em porcentagens que variam de 3 a 17%. Já no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), o timol aparece em porcentagens em torno de 40%. Os óleos essenciais extraídos de orégano e tomilho, por exemplo, têm potencial antimicrobiano significativo frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos (DAL POZZO *et al.*, 2011). Além disso, estudos realizados com estes óleos mostraram sua eficiência como conservante de alimentos, justificada pelo alto potencial antimicrobiano, principalmente do carvacrol (LEAL, 2013).

De uma forma geral, o mecanismo de ação dos óleos essenciais e seus compostos majoritários nas células bacterianas diz respeito, principalmente, a danos estruturais e funcionais à membrana citoplasmática. Como são tipicamente lipofílicos, eles se acumulam na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, conferindo característica de permeabilidade. A permeabilidade das membranas celulares é dependente da sua composição e da hidrofobicidade dos solutos que a atravessam, de maneira que a resistência bacteriana a óleos essenciais e seus compostos fenólicos parece estar relacionada à habilidade de partição dos componentes dos mesmos na fase lipídica da membrana (DAL POZZO *et al.*, 2011).

A indústria de alimentos apresenta crescente demanda por óleos essenciais e seus compostos, devido a possível aplicação como conservante alimentar e no que se refere ao combate a patógenos, como *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, entre outros. Outro benefício apresentado pelo uso de óleos essenciais diz respeito à facilidade de isolamento dos mesmos a partir de material vegetal. Além disso, apresentam baixa toxicidade em mamíferos, além de serem fácil e rapidamente degradados (KAVANAUGH & RIBBECK, 2012).

Em adição, além da inibição de células bacterianas vegetativas, a presença de carvacrol pode causar supressão da produção de toxinas microbianas, capazes de desencadear grandes surtos alimentares, uma vez que este composto provoca insuficiência de ATP para secretar as toxinas, devido ao fato de as células utilizarem todas as energias disponíveis para sustentar sua viabilidade (ULTEE & SMID, 2001).

Com relação a esse fenômeno, Trater, Tassou & Nychas (1993), em seus estudos com *S. aureus* S6, micro-organismo produtor de enterotoxina B, observaram que a oleuropeína, composto fenólico extraído de folhas de oliveira, foi capaz de inibir a multiplicação do patógeno e a produção de toxinas. Segundo os autores, para inibição do micro-organismo, foram necessárias maiores concentrações do composto, porém para inibição da produção de toxina B, baixas concentrações de oleuropeína foram efetivas.

Além disso, a pressão pela substituição de compostos antimicrobianos sintetizados quimicamente vem aumentando nos últimos anos (XU *et al.*, 2007), fato que tem expandido o interesse pelo uso de óleos essenciais como sanificantes naturais e sua utilização como antimicrobiano em vegetais minimamente processados (AZERÊDO *et al.*, 2012), por exemplo. Esses produtos são manipulados em processos como descascamento e fracionamento e necessitam de sanitização, uma vez que apresentam potencial para abrigar bactérias patogênicas (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Muitos óleos essenciais e seus constituintes individuais são considerados GRAS nas doses tipicamente utilizadas em alimentos (BURT, 2004). Entretanto, quando aplicado diretamente em alimentos ou mesmo em superfícies e equipamentos que entram em contato direto com o alimento, é necessário atentar para a quantidade aplicada, pois, muitas vezes, a concentração requerida de óleo essencial para estabelecimento do efeito antimicrobiano pode resultar em odores e sabores indesejáveis aos consumidores (GUTIERREZ *et al.*, 2009). Outros problemas relacionados à aplicação direta de óleos essenciais e seus constituintes seria a estabilidade, já que são substâncias voláteis, bem como a hidrofobicidade que poderia dificultar sua aplicação na indústria de alimentos (BRANEN & DAVIDSON, 2004; CHOLLET *et al.*, 2008; WEISHEIMER *et al.*, 2010).

Neste contexto, alguns novos métodos estão sendo avaliados visando melhorar a estabilidade e biodisponibilidade dos óleos essenciais e seus constituintes, entre os quais está a encapsulação em lipossomas.

3.6. Encapsulação em lipossomas de antimicrobianos naturais presentes em óleos essenciais

Lipossomas são estruturas coloidais constituídas de um núcleo interno aquoso e uma membrana formada pela auto associação de moléculas fosfolipídicas em bicamadas. Esse mecanismo de formação é baseado nas interações que ocorrem entre fosfolipídios e moléculas de água, onde os grupos polares finais dos fosfolipídios são expostos à fase aquosa, localizada no interior e exterior, e as caudas de hidrocarboneto hidrofóbicas são forçadas a formar uma bicamada (JESORKA & ORWAR, 2008). É durante esse processo de formação que, devido à energia imposta aos fosfolipídios, solutos presentes no meio aquoso podem ser encapsulados. Além disso, devido à presença de fase aquosa e lipídica na estrutura das vesículas, os lipossomas podem ser utilizados na encapsulação e liberação de materiais hidrossolúveis, lipossolúveis e anfifílicos (MOZAFARI *et al.*, 2008).

Como demonstrado na Figura 1, após a formação, os lipossomas podem ser classificados quanto ao número de bicamadas, assumindo forma de vesículas multilamelares (MLV) ou unilamelares (ULV); ou quanto ao seu tamanho, podendo apresentar vesículas unilamelares grandes (LUV) ou vesículas unilamelares pequenas (SUV) (SHARMA & SHARMA, 1997).

Existem diferentes técnicas para encapsulamento de óleos essenciais em partículas poliméricas, e cada uma apresenta vantagens específicas. Entretanto, técnicas que incluem etapas de aquecimento ou evaporação podem apresentar perdas do composto, embora seja comprovado que óleos essenciais encapsulados ficam protegidos contra degradação, que pode ocorrer devido a altas temperaturas, luz UV e oxidação, que comprometem a atividade biológica deles (ASBAHANI *et al.*, 2015).

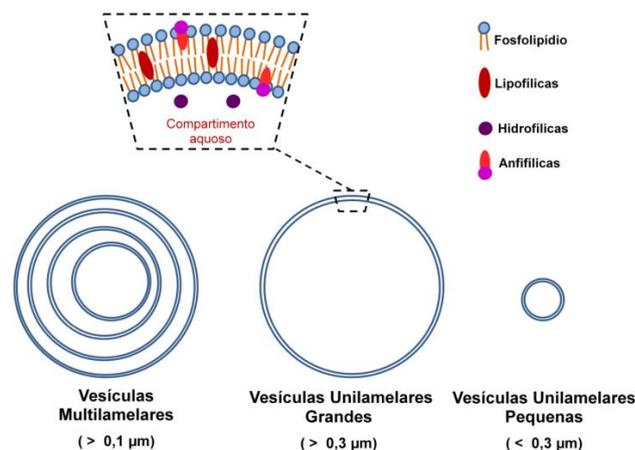


Figura 1: Estrutura e classificação dos lipossomas (GAETI, 2011);

Para encapsulação de antimicrobianos em lipossomas, a técnica mais utilizada é a hidratação do filme fosfolipídico. O método consiste na formação de um filme lipídico na superfície interna de um balão de fundo redondo após solubilização do lipídio em solvente e evaporação do mesmo. O composto bioativo em solução tampão é adicionado neste filme e a dispersão dos fosfolipídios é facilitada por ultra agitação. Através da agitação o filme se desprende da superfície do balão sob forma de vesículas com diâmetros elevados e multilamelares. Para diminuir e homogeneizar o tamanho dos lipossomas, uma nova energia deve ser fornecida como ultra-som, por exemplo, para desta forma obter-se vesículas de tamanho adequado e alta eficiência de encapsulação (SHARMA & SHARMA, 1997; JESORKA & ORWAR, 2008; MALHEIROS *et al.*, 2010; 2011).

Na indústria de alimentos os lipossomas têm sido estudados para liberação controlada de enzimas, vitaminas, antioxidantes, flavors e, mais recentemente, compostos bioativos, isso porque essas estruturas têm a capacidade de proteger o material encapsulado contra mudanças ambientais, tais como mudanças de pH, temperatura e alterações químicas (MOZAFARI *et al.*, 2008).

A encapsulação de óleos essenciais e seus constituintes vêm mostrando resultados promissores. Liolios *et al.* (2009), por exemplo, encapsularam timol e carvacrol em lipossomas utilizando a técnica da hidratação do filme fosfolipídico e, dessa forma, observaram aumento da atividade antimicrobiana. Coimbra *et al.* (2011) encapsularam carvacrol, com o mesmo método, obtendo aumento da solubilidade e melhoramento da estabilidade do composto. Portanto, a encapsulação de timol e carvacrol em lipossomas pode resultar em aumento da atividade antimicrobiana desses compostos visando melhorar sua ação sanificante contra microrganismos aderidos em aço inoxidável.

A metodologia e os resultados serão apresentados na forma de artigo.

4. ARTIGO

Ação desinfetante de soluções de timol e carvacrol livres e encapsulados em lipossomas sobre *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* aderidos em aço inoxidável AISI 304

Artigo preliminar a ser submetido ao periódico Food Microbiology, após formatação e tradução para o inglês.

Ação desinfetante de soluções de timol e carvacrol livres e encapsulados em lipossomas sobre *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* aderidos em aço inoxidável AISI 304

Juliana Both ENGEL e Patrícia da Silva MALHEIROS

RESUMO

A adesão de micro-organismos em superfícies de contato é etapa fundamental do processo de formação de biofilmes, que representa preocupação à indústria de alimentos, uma vez que podem apresentar grande resistência a tratamentos antimicrobianos, podem causar deterioração e veiculação de patógenos. Além disso, o aumento da preocupação dos consumidores em relação ao uso de agentes químicos artificialmente sintetizados encorajam pesquisas envolvendo o uso de compostos naturais com atividade antimicrobiana. Timol e carvacrol, presentes em óleos essenciais, tem se destacado pela capacidade de inibir a multiplicação de patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação desinfetante de timol e carvacrol livres e encapsulados frente a *S. aureus* e *Salmonella* spp. inoculados em caldo BHI e leite de vaca integral UHT, aderidos ao aço inoxidável AISI 304. Primeiramente, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada utilizando placas de microdiluição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute*, e a partir destas concentrações foram preparadas soluções alcoólicas 20% (v/v) contendo timol e carvacrol. Os lipossomas para a encapsulação foram desenvolvidos pela técnica de hidratação do filme lipídico. Corpos de prova de aço inoxidável permaneceram por 15 minutos em contato com as culturas bacterianas e, em seguida, foram expostos as soluções sanificantes, durante 1 e 10 minutos. Após o tempo de exposição, o número de células sobreviventes foi determinado por contagem em placas. *S. aureus* apresentou valores de CIM para timol e carvacrol de 0,662 mg/mL e *Salmonella* spp. de 0,331 mg/mL, para ambos os compostos. Os resultados mostram que a aderência dos micro-organismos ao aço inoxidável foi de 5,5 a 6,5 log UFC/cm². As soluções alcoólicas preparadas com timol e carvacrol causaram inibição total (6,1 log UFC/cm²) do pool de *S. aureus* mesmo quando o tempo de ação foi de 1 minuto e na presença de resíduos de leite. A inibição total de *Salmonella* spp. (5,94 log UFC/cm²) somente ocorreu após 10 minutos. O controle positivo feito com solução alcoólica 20% (v/v) confirmou que o efeito antimicrobiano ocorreu somente quando o timol ou carvacrol estavam presentes na solução desinfetante. Os lipossomas contendo timol/carvacrol apresentaram tamanho de 270,2 ± 12,5 nm, polidispersidade de 0,339 ± 0,17 e potencial zeta de + 39,99 ± 2,72 mV. Este composto não inibiu totalmente a população de patógenos aderidos ao aço inoxidável com 1 minuto de contato. Para inativação de *S. aureus* ou *Salmonella* spp. foi necessário manter os lipossomas (CIM = 0,662 mg/mL) em contato com o material por 10 minutos, sugerindo uma liberação mais lenta dos antimicrobianos encapsulados.

Palavras-chave: timol; carvacrol; lipossomas; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella* spp.

INTRODUÇÃO

A adesão bacteriana consiste em uma atração da célula pela superfície, seguida da adsorção e posterior aderência (KATSIKOIANNI & MISSIRLIS, 2004). As características das superfícies que entram em contato com os alimentos apresentam papel muito importante nesse processo. O aço inoxidável, por exemplo, é um material hidrofílico amplamente utilizado na confecção de equipamentos e utensílios para a indústria de alimentos. Esse material apresenta excelentes propriedades físico-químicas, baixo custo em relação aos demais (ARAÚJO *et al.*, 2010), boa resistência mecânica e à corrosão e facilidade de fabricação (ORTEGA *et al.*, 2010).

Motivo de grande preocupação para a indústria de alimentos, a adesão de micro-organismos a superfícies e equipamentos pode proporcionar a sobrevivência de células e ocasionar a formação de biofilmes, causando contaminação cruzada, diminuição da vida de prateleira e transmissão de doenças (ORTEGA *et al.*, 2010; WHITEHEAD & VERRAN, 2015).

No Brasil, as bactérias identificadas que mais causaram doenças transmitidas por alimentos (DTA) foram *Salmonella* spp. (39,5%) e *Staphylococcus aureus* (19,7%) (BRASIL, 2013) e a formação de biofilmes após a adesão de micro-organismos patogênicos em superfícies de contato com alimentos é apontada como um dos principais fatores que contribuem com a ocorrência de surtos alimentares (SHI & ZHU, 2009; BONSAGLIA *et al.*, 2014).

Para reduzir o número de casos de DTA, o processo de higienização deve ser prática frequente nas indústrias de alimentos e serviços de alimentação. A higienização compreende duas etapas: limpeza, que consiste na remoção de sujidades como terra, poeira e outras geralmente visíveis a olho nu, e desinfecção ou sanitização, procedimento que visa reduzir até níveis aceitáveis o número de micro-organismos aderidos às superfícies através de agentes químicos ou físicos (BATISTA, 2003; ANDRADE, 2008; SILVA, DUTRA & CADIMA, 2010).

Atualmente, o uso de agentes sanitizantes sintetizados artificialmente não é bem visto pelos consumidores, os quais buscam por produtos naturais. Por esse motivo, aumentam cada vez mais as pesquisas na busca por compostos naturais com propriedades antimicrobianas, como os óleos essenciais.

Óleos essenciais são complexas misturas de líquidos aromáticos e voláteis produzidos no metabolismo secundário das plantas em resposta a fitopatógenos e insetos, e podem ser extraídos de diversas partes dos vegetais. Além disso, apresentam propriedades antimicrobianas, que atingem amplo espectro de bactérias, incluindo ação sobre biofilmes (HYLDGAARD *et al.*, 2012; SZCZEPANSKI & LIPSKI, 2014). Eles apresentam substâncias voláteis em diferentes concentrações, em que um composto farmacologicamente ativo é majoritário, como por exemplo, carvacrol e timol, nos óleos essenciais de orégano e tomilho, respectivamente (DAL POZZO *et al.*, 2011). Ainda, apresentam menores riscos com relação à sua aplicação em alimentos (SILVA, 2007) sendo reconhecidos pelo Food and Drug Administration (FDA) como substâncias seguras de acordo com o Code of Federal Regulations (CFR, 2015).

Entretanto, alguns problemas de estabilidade, possível interação entre os antimicrobianos naturais e resíduos de limpeza, hidrofobicidade e volatilidade podem resultar na diminuição da atividade antimicrobiana destes compostos presentes em óleos essenciais dificultando sua aplicação como sanitizante na indústria de alimentos (BRANEN & DAVIDSON, 2004; CHOLLET *et al.*, 2008; WEISHEIMER *et al.*, 2010).

Neste contexto, a encapsulação em lipossomas pode ser uma solução para tais problemas, pois dessa forma os compostos antimicrobianos ficariam protegidos, diminuindo sua volatilidade, facilitando sua interação com a superfície de contato com alimentos e prolongando sua duração, por meio de uma liberação controlada (MALHEIROS *et al.*, 2011; ASBAHANI *et al.*, 2015; ZORZI *et al.*, 2015). Lipossomas são estruturas coloidais constituídas de um núcleo interno aquoso e uma membrana formada pela auto associação de moléculas fosfolipídicas em bicamadas. Portanto, os lipossomas podem ser utilizados na encapsulação e liberação de materiais anfifílicos, hidrossolúveis e lipossolúveis (MOZAFARI *et al.*, 2008; MALHEIROS *et al.*, 2011), como o timol e carvacrol.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano de timol e carvacrol livres e encapsulados em lipossomas frente à *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. aderidas em aço inoxidável.

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas bacterianas

Dois *pools* bacterianos foram utilizados sendo um composto por 4 cepas de *S. aureus* e outro composto por 4 cepas de *Salmonella* spp. As cepas utilizadas para a composição do *pool* de *S. aureus* foram: *S. aureus* 4668/03, isolado de alimento envolvido em surto de origem alimentar; *S. aureus* S6, isolado de aço inoxidável de frigorífico de carne de aves antes da limpeza; *S. aureus* S8, isolado de placa de corte de frigorífico de carne de aves antes da limpeza e *S. aureus* ATCC 2998. As cepas utilizadas para a composição do *pool* de *Salmonella* spp. foram: *S. Enteritidis* SE86, isolada de repolho envolvido em surto alimentar, sendo que essa cepa apresenta o mesmo perfil genético de mais de 90% das *Salmonellas* envolvidas nos surtos alimentares causados por esse patógeno no Rio Grande do Sul (GEIMBA *et al.*, 2004, CAPALONGA *et al.*, 2014); *S. Typhimurium*, isolada de fezes de suínos; *S. Newport* e *S. Saint Paul*, ambas isoladas de produtos cárneos. Todas as cepas foram cultivadas, separadamente, em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia) e em leite de vaca UHT integral adquirido em mercado local, a 37 °C por 18-24 horas. Foram utilizados 2,5 mL de caldo BHI ou leite contendo cada cepa, totalizando 10 mL para *S. aureus* e 10 mL para *Salmonella* spp. para compor o *pool*.

Preparação das soluções sanificantes

Carvacrol (98% de pureza) e timol ($\geq 99,5\%$ de pureza) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para o desenvolvimento da solução sanificante, 0,106 g de cada composto foram pesadas e diluídas em 10 mL de solução alcoólica 20% (v/v) (CHORIANOPOULOS *et al.*, 2008). A concentração dos antimicrobianos foi determinada a partir de experimentos prévios. Antes da aplicação nos corpos de prova, essa solução sanificante foi diluída em água destilada estéril para obtenção do valor observado na CIM.

Encapsulação dos antimicrobianos naturais em lipossomas

Os lipossomas foram preparados pela técnica de hidratação do filme lipídico (MALHEIROS *et al.*, 2010). Primeiramente, foram pesados 0,08 g de fosfatidilcolina de soja (LIPOID S 100 – Lipoid GMBH - Alemanha) em um balão de fundo redondo. Em seguida, foram adicionados 20 mL de clorofórmio o qual foi removido em rotaevaporador (Heidolph –

Laborota 4000 – Heizbad OB, Alemanha) para a formação do filme na superfície interna do balão. Para garantir a completa remoção do solvente, o filme foi mantido em dessecador por 24 horas. Então, o filme foi re-hidratado pela adição de 10 mL de uma solução composta por 0,106 g de timol e 0,106 g de carvacrol em DMSO (solvente polar) 10% (v/v). Utilizou-se DMSO para diluição dos óleos porque experimentos prévios mostraram que o álcool desestabiliza a estrutura dos lipossomas. A solução foi homogeneizada em banho-maria a 40 °C e vórtex. Finalmente, para reduzir e homogeneizar o tamanho dos lipossomas já formados utilizou-se ultrassom de ponta (50 KHz, Sonics & Materials Inc. VCX 400, Danbury, CT, USA), em 3 ciclos de 1 minuto em banho de gelo. Esse experimento foi repetido duas vezes.

O diâmetro médio e polidispersidade dos lipossomas contendo os antimicrobianos naturais foram determinados por espalhamento dinâmico de luz em equipamento Brookhaven Instruments (modelo EMI9863) com 3 repetições. O potencial zeta também foi determinado em equipamento da Brookhaven Instruments ZetaPALS (modelo 31450) com 3 repetições. Previamente a essa caracterização os lipossomas foram diluídos em água destilada. A atividade antimicrobiana foi determinada por Concentração Inibitória Mínima conforme descrito abaixo.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para timol, carvacrol e para os lipossomas, utilizando placas de microdiluição de 96 poços de acordo com o *Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2002) com modificações. A suspensão bacteriana de cada *pool* foi ajustada para aproximadamente 10^8 UFC/mL. Isso foi feito diluindo-se cada suspensão em caldo BHI estéril para obter uma absorbância ($OD_{630\text{ nm}}$) de aproximadamente 0,5 usando espectrofotômetro (Ultrospec 3100 *pro* – Amersham Biosciences). Para confirmação dessa concentração foi realizada contagem em placas, utilizando ágar BHI. Inicialmente, adicionou-se em cada poço 100 µL de caldo BHI. Então, 100 µL de solução sanificante foram adicionadas no primeiro poço, homogeneizadas e transferidas para o segundo poço, do segundo para o terceiro, e assim sucessivamente. Em seguida, 100 µL do *pool* de bactérias foram adicionados em cada poço, sendo que no último poço não foram adicionadas bactérias, servindo assim de controle negativo. Essa técnica foi repetida para todas as soluções sanificantes. Solução alcoólica 20% (v/v) sem os antimicrobianos foi

utilizada como controle positivo. A placa de microdiluição foi incubada a 37 °C e após 18-24 h observou-se a presença ou não de turvação em cada poço.

Preparação dos coupons de aço inoxidável AISI 304

Corpos de prova de aço inoxidável 304 foram confeccionados nas dimensões de 2 cm x 2 cm, com espessura de 1 mm. Previamente aos ensaios de adesão bacteriana, os coupons foram lavados com detergente neutro e devidamente enxaguados, sendo em seguida secos a 60 °C. Depois de secos, os coupons foram autoclavados a 121 °C, por 15 minutos, e novamente levados à estufa para secagem (ROSSONI & GAYLARDE, 2000). Os corpos de prova foram mantidos em frascos estéreis que permaneceram à temperatura ambiente até o momento dos ensaios.

Adesão microbiana e ação dos sanificantes

Para a avaliação da adesão microbiana, utilizou-se o *pool* obtido a partir do cultivo de cada bactéria em caldo BHI bem como o *pool* obtido a partir do cultivo em leite de vaca UHT integral. Um coupon de aço inoxidável AISI 304 foi imerso em 10 mL de cada *pool* bacteriano, com concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL, durante 15 minutos, para adesão das células microbianas à sua superfície. Durante esse período, o frasco contendo o *pool* e o coupon foi mantido em estufa a 37 °C. Em seguida, o coupon foi lavado em 10 mL de água peptonada 0,1% para remoção das células pouco aderidas. O coupon contendo as células aderidas foi, então, imerso em 10 mL de solução sanificante preparada a partir do resultado obtido na determinação do CIM. Além disso, os experimentos foram conduzidos utilizando soluções sanificantes com $\frac{1}{2}$ do valor do CIM, bem como com o dobro desta concentração. Foram testados tempos de contato entre aço inoxidável e solução sanificante de 1 e 10 minutos. Dois controles foram realizados, sendo que em um deles o coupon foi imerso em 10 mL de água peptonada 0,1% e no outro o coupon foi imerso em 10 mL de solução alcoólica 20% v/v diluída em água destilada estéril nas mesmas condições do sanificante. Esse último controle foi realizado para comprovar que a ação antimicrobiana foi devido à presença do carvacrol e timol e não devido ao efeito do álcool. Transcorrido o tempo de contato estipulado, o coupon foi novamente imerso em 10 mL de água peptonada 0,1% para

retirada do sanificante. Depois de lavado, o coupon foi imerso em 10 mL de água peptonada 0,1% e sonicado em lavadora ultrassônica (UNIQUE®-USC700) com potência de 55 KHz, por 10 minutos, para que as células aderidas se soltassem da superfície testada (SINDE & CARBALLO, 2000). Quatro diluições decimais de cada corpo de prova sonicado foram preparadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), sendo que 20 μ L das mesmas foram semeados em ágar BHI, pelo método de gota (MILLES & MISRA, 1938) e, então, incubados a 37 °C por 18 h.

Análise estatística

As contagens bacterianas obtidas nos experimentos de adesão microbiana e ação dos sanificantes foram analisadas estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA), fator único, aplicando o teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o *software* Statistica 12.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento de lipossomas contendo timol e carvacrol

Os lipossomas contendo uma mistura de timol e carvacrol apresentaram diâmetro médio das partículas em suspensão de $270,2 \pm 12,5$ nm com polidispersidade, que indica a distribuição de tamanhos presentes na solução, de $0,339 \pm 0,17$. O potencial zeta mostrou que a carga superficial desses lipossomas foi de $+ 39,99 \pm 2,72$ mV. A elevada carga elétrica das nanovesículas desenvolvidas nesse estudo sugere boa estabilidade da suspensão, pois quanto maior o potencial zeta, tanto positivo quanto negativo, maiores são as interações repulsivas, diminuindo assim a frequência das colisões e possibilidade de precipitação (MALHEIROS *et al.*, 2010).

Paula *et al.* (2010) encapsularam em nanopartículas de quitosana e goma do angico óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), cujo principal componente foi o timol. A emulsão contendo o óleo essencial para nanoencapsulação foi preparada com Tween, um detergente não iônico. Diferente do observado no presente estudo, as nanopartículas apresentaram tamanho bastante reduzido (10 a 60 nm) e potencial zeta negativo. Nanopartículas de zeína, proteína do glúten do milho, carregadas com timol e estabilizadas com caseinato de sódio e cloridrato de quitosano foram preparadas e caracterizadas no estudo

realizado por Zhang *et al.* (2014). Na ausência de caseinato de sódio o tamanho das partículas e o potencial zeta foram de 118,30 nm e +28,10 mV, respectivamente. Após revestimento das nanopartículas com caseinato de sódio, houve inversão do sinal do potencial zeta, que passou de positivo para negativo, na faixa de -33,60 a -38,95 mV, enquanto o tamanho passou para cerca de 200 nm. No estudo, os autores comprovaram que timol encapsulado foi mais efetivo na supressão de bactérias Gram positivas do que o timol não encapsulado por um período mais longo. As nanopartículas de zeína apresentaram um perfil de liberação do composto em duas fases. Acredita-se que na primeira fase, mais rápida, há liberação da porção de timol presente na fase externa do filme; a segunda fase de liberação, mais lenta, representaria o timol contido nas partículas de zeína.

Portanto, segundo os resultados do estudo supracitado realizado por Zhang *et al.* (2014) o tamanho, o potencial zeta e a atividade antimicrobiana de nanopartículas contendo compostos bioativos podem ser influenciados tanto pelo tipo de material usado na encapsulação como pelo composto encapsulado e meio dispersante.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de timol, carvacrol e lipossomas contendo timol/carvacrol

Os valores de CIM para timol, carvacrol e lipossomas contendo timol/carvacrol frente aos diferentes *pools* de bactérias podem ser observados na Tabela 1. O controle positivo feito com solução alcoólica 20% (v/v) confirmou que o efeito antimicrobiano ocorreu somente quando o timol ou carvacrol estavam presentes na solução desinfetante.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de timol, carvacrol e lipossomas contendo carvacrol/timol para *pool* de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp;

Micro-organismo	Composto	CIM (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Timol	0,662
	Carvacrol	0,662
	Lipossomas	0,662
<i>Salmonella</i> spp.	Timol	0,331
	Carvacrol	0,331
	Lipossomas	0,662

Os resultados mostraram que as cepas de *Salmonella* utilizadas neste estudo foram mais sensíveis do que as cepas de *Staphylococcus aureus* tanto para o desinfetante contendo carvacrol quanto para o desinfetante contendo timol. O mesmo foi observado por Sharififar *et al.* (2007), os quais afirmaram que timol e carvacrol apresentam maior bioatividade sobre bactérias Gram negativas, devido à maior afinidade destas pela estrutura lipídica da membrana que as envolve. Timol e carvacrol atuam induzindo deformações na membrana citoplasmática alterando sua permeabilidade. Além disso, é possível que núcleos aromáticos, contendo um grupo polar, possam fazer ligações de hidrogênio com os sítios ativos de enzimas microbianas alvo, o que favoreceria a atividade antimicrobiana (LAMBERT *et al.*, 2001; ULTEE *et al.*, 2002).

Dal Pozzo *et al.* (2011) analisaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. Os autores analisaram as CIM para diversos óleos essenciais, tais como os de orégano e tomilho, bem como suas frações majoritárias, carvacrol e timol. Os resultados para CIM foram 1,44 mg/mL para óleo essencial de orégano; 1,47 mg/mL para óleo essencial de tomilho; 0,76 mg/mL para carvacrol e 1,06 mg/mL para timol, valores próximos dos observados nesta pesquisa, além de comprovar que as frações majoritárias evidenciaram maior atividade antimicrobiana do que os óleos essenciais.

Lu & Wu (2010) avaliaram a redução da contaminação causada por *Salmonella enterica* em tomates lavados com óleo essencial de tomilho, timol e carvacrol. No referido estudo, foram utilizadas cepas de *S. Kentucky*, *S. Senftenberg*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* e o valor de CIM para o óleo essencial de tomilho foi de 1,0 mg/mL para todas as cepas estudadas. Para timol e carvacrol, o valor encontrado foi de 0,2 mg/mL para ambos os compostos, para todas as cepas. Estes resultados também apontam que os compostos majoritários apresentam maior atividade antimicrobiana do que o óleo essencial, além de mostrarem que quando as cepas são cultivadas separadamente, os valores de CIM observados são relativamente menores dos que os obtidos para as cepas crescendo juntas, como neste estudo (CARPENTIER & CHASSAING, 2004; MOLIN *et al.*, 2004; BURMOLLE *et al.*, 2006).

Neste trabalho, a encapsulação de timol/carvacrol em lipossomas não melhorou a atividade antimicrobiana de acordo com os resultados da CIM (Tabela 1). Neste sentido, é possível sugerir que o composto ficou retido no interior da nanovesícula, não sendo liberado

imediatamente para inibir o patógeno alvo. De forma semelhante, Pan *et al.* (2014) encapsularam timol em caseinato de sódio pela técnica da homogeneização *high shear* e encontraram um valor de CIM de 0,2 mg/L tanto para o composto livre quanto encapsulado frente a *Listeria monocytogenes* Scott A.

Adesão microbiana e ação dos sanificantes

Os resultados da adesão microbiana mostraram que uma população média inicial de aproximadamente 8 a 9 log UFC/mL de *Salmonella* spp. e *S. aureus*, cultivados tanto em caldo BHI quanto em leite integral, foram capazes de aderir de 5,5 a 6,5 log UFC/cm² em aço inoxidável AISI 304 após 15 minutos de contato. O aço inoxidável é um material no qual micro-organismos, tanto Gram positivos quanto Gram negativos, podem aderir (HOOD & ZOTTOLA, 1997), sendo que neste curto intervalo de tempo (menor do que 2 horas) os micro-organismos estão ligados entre si e com a superfície por interações fracas (BERESFORD *et al.*, 2001).

A adesão de bactérias em superfícies utilizadas para manipulação de alimentos é um grande problema para indústria alimentícia, pois é a primeira etapa para a formação de biofilmes, os quais podem ser associados a surtos de DTA. Normalmente a formação de biofilmes ocorre por falhas nos procedimentos de higienização, especialmente porque muitos manipuladores não respeitam o tempo correto para a ação do sanificante. Além disso, a maioria dos sanificantes não age em superfícies com resíduos de alimentos ou detergentes, além de serem potencialmente tóxicos ao operador, ao meio ambiente e aos consumidores, caso o enxague não seja adequado. Neste contexto, o desenvolvimento de sanificantes contendo antimicrobianos naturais, como timol e carvacrol, podem ser boas alternativas aos agentes químicos.

Os resultados dos experimentos utilizando os sanificantes naturais frente ao *pool* de *S. aureus* mostraram que quando o micro-organismo foi cultivado em caldo BHI, tanto a solução alcoólica contendo timol quanto a solução alcoólica contendo carvacrol, inativaram toda a população aderida no aço inoxidável (6,22 log UFC/cm²), após 10 minutos de ação. O mesmo experimento foi realizado para avaliar se 1 minuto de ação do sanificante inibiria o *pool* de *S. aureus* aderido ao aço inoxidável. Os resultados mostraram que 1 minuto foi suficiente para inativar toda a população aderida (5,88 log UFC/cm²). Em ambos os experimentos, a inibição

causada pela solução alcoólica 20% v/v não foi significativa frente ao controle. Já as reduções logarítmicas das soluções de timol e carvacrol foram significativamente diferentes quando comparadas ao controle e à solução alcoólica 20% (v/v), mas não apresentaram diferença entre si. Portanto, os diferentes tempos de contato, 1 e 10 minutos, não foram significativamente diferentes, o que mostra uma vantagem potencial para aplicações destes compostos como sanificantes em indústrias de alimentos, uma vez que não demandam tempo de contato prolongado.

Dessa forma, utilizou-se leite de vaca integral UHT para cultivo e adesão das bactérias, simulando ambiente de indústrias processadoras desta matéria-prima. Inicialmente foi testado tempo de contato de 10 minutos, bem como soluções sanificantes preparadas com o dobro da CIM e metade da CIM. A Figura 1 mostra que para este tempo de contato as soluções preparadas com timol e carvacrol, tanto para a CIM quanto para o dobro desta, causaram inibição total do micro-organismo, diferentemente daquela causada quando somente

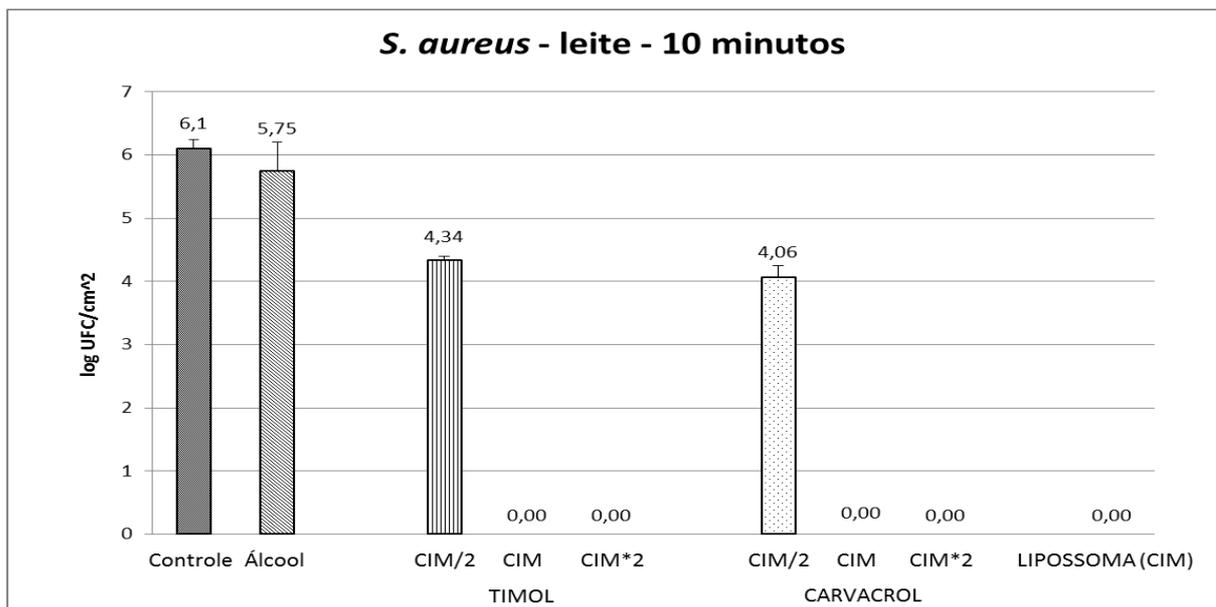


Figura 1: Inativação de *Staphylococcus aureus* (cultivado em leite de vaca integral) aderido em aço inoxidável utilizando solução alcoólica 20% contendo timol (CIM = 0,6625 mg/mL), carvacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) e lipossomas contendo timol/carvacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) após 10 minutos de contato. A barra cinza mostra a população que aderiu ao coupon após 15 minutos de contato e a barra pontilhada cinza mostra o efeito da solução alcoólica 20% sem antimicrobianos.

a metade da CIM foi utilizada na preparação dos sanificantes. A solução alcoólica 20% (v/v) não apresentou redução significativa ($p < 0,05$) frente ao controle, mostrando que o efeito antimicrobiano foi devido à ação do timol e carvacrol. Além disso, os lipossomas contendo timol/carvacrol inativaram toda a população de *S. aureus* aderida ao aço inoxidável ($6,1 \log \text{ UFC/cm}^2$), em 10 minutos de contato.

Na tentativa de verificar se tempos menores de contato seriam suficientes para a inibição do *pool* de micro-organismos, procedeu-se o mesmo experimento com tempo de contato de 1 minuto. A Figura 2 demonstra que em 1 minuto, as soluções de timol e carvacrol preparadas com valor obtido para CIM, bem como para o dobro desta concentração, proporcionaram inibição total do *pool* de *S. aureus*. Entretanto, tempo de contato mais curto demonstra que a solução desinfetante preparada a partir de timol e carvacrol encapsulados não foi eficaz na inibição microbiana, bem como as soluções de timol e carvacrol livres preparadas com a metade da CIM.

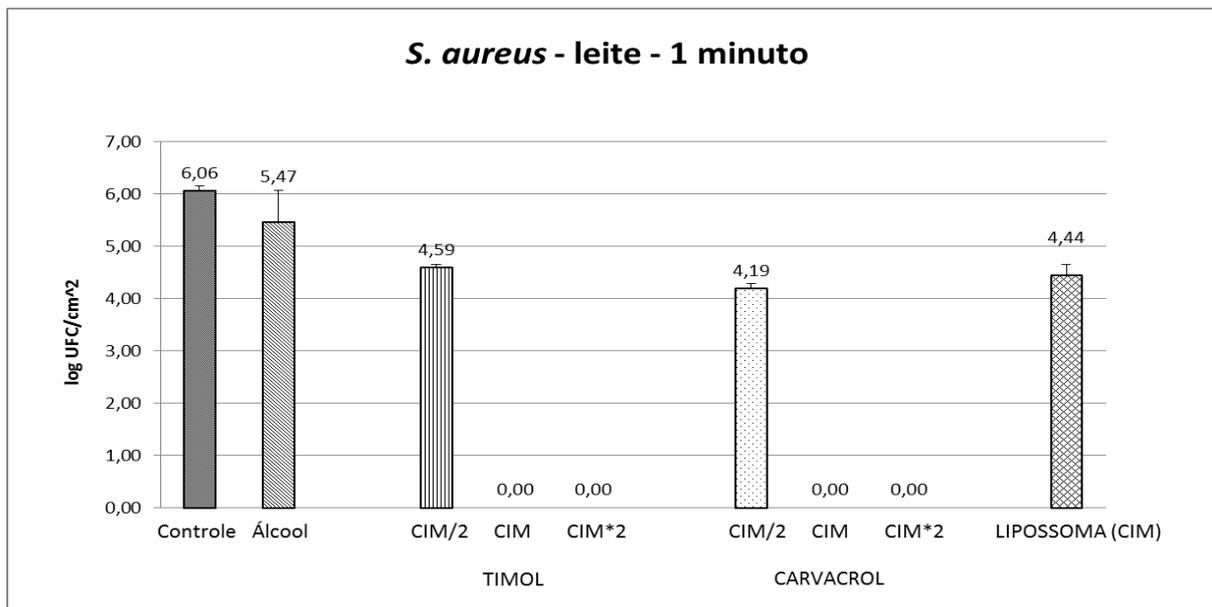


Figura 2: Inativação de *Staphylococcus aureus* (cultivado em leite de vaca integral) aderido em aço inoxidável utilizando solução alcoólica 20% contendo timol (CIM = 0,6625 mg/mL), carvacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) e lipossomas contendo timol/carvacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) após 1 minuto de contato. A barra cinza mostra a população que aderiu ao coupon após 15 minutos de contato e a barra pontilhada cinza mostra o efeito da solução alcoólica 20% sem antimicrobianos.

De forma geral, comparando os experimentos realizados com crescimento e adesão de *S. aureus* em caldo BHI e em leite de vaca integral UHT, para as soluções de timol e carvacrol, não houve diferença significativa ($p < 0,05$). Ambas as soluções se mostraram eficazes na redução logarítmica, não importando o meio de multiplicação bacteriana nem o tempo de contato do coupon com a solução sanificante.

Resultados positivos com relação à redução de contagens microbianas utilizando compostos naturais também foram observados por Mendonça (2004), que analisou o efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre a multiplicação de *S. aureus* ATCC 25963 em ricota cremosa. Este estudo mostrou que o óleo essencial de orégano, rico em timol e carvacrol, em concentração de 5%, reduziu 3,08 ciclos logarítmicos na matriz alimentícia.

Outro estudo que vai ao encontro dos resultados observados nesta pesquisa foram mostrados por Lambert *et al.* (2001), que testaram a ação dos componentes do óleo essencial de orégano, timol e carvacrol concluindo que efeitos inibitórios combinados destes compostos foram capazes de causar inibição total de *S. aureus* com concentrações de 0,14 mg/mL e 0,175 mg/mL para timol e carvacrol, respectivamente. Lakis *et al.* (2012) compararam o efeito inibitório dos compostos presentes no óleo essencial de orégano (timol e carvacrol) à diferentes antibióticos, como tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, cefalotina e gentamicina, sobre *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* isolado da cavidade oral de humanos. O estudo mostrou maior atividade antimicrobiana de timol e carvacrol comparados aos antibióticos para ambas as cepas analisadas, sendo que o timol mostrou-se o composto mais eficiente.

Júnior (2011) observou a atuação de timol e carvacrol presentes no óleo essencial de tomilho sobre biofilme de *S. aureus* ATCC 25923 em coupons de aço inoxidável AISI 304. Neste estudo, a CIM encontrada para o óleo essencial de tomilho foi igual a 0,10% (v/v) e a partir deste resultado foi preparada a solução sanificante. Após a exposição dos coupons à solução sanificante, composta por 8 mL de solução salina, 1,99 mL de etanol e 0,01 mL do óleo essencial, por 10 minutos, houve redução de 6,68 log UFC/cm² com relação ao controle (solução sem óleo essencial) e não houve recuperação de células viáveis de *S. aureus*, fato que comprova a eficácia do composto na aplicação como sanificante.

No presente estudo, para o *pool* de *Salmonella* spp. cultivado em caldo BHI, as soluções alcoólicas contendo timol e carvacrol inativaram toda a população aderida ao aço

inoxidável ($5,94 \log \text{ UFC/cm}^2$), após 10 minutos de contato. Entretanto, quando o experimento foi conduzido com tempo de contato de 1 minuto, as soluções alcoólicas contendo timol e carvacrol mostraram reduzido potencial antimicrobiano. A solução de timol apresentou redução de $2,87 \log \text{ UFC/cm}^2$ e a de carvacrol, apenas $1,72 \log \text{ UFC/cm}^2$, sendo que somente a redução logarítmica apresentada pela solução de timol foi significativa ($p < 0,05$). Em ambos os tempos de contato as soluções alcoólicas 20% v/v não apresentaram redução significativa frente ao controle.

Do mesmo modo que para os experimentos com *S. aureus*, na tentativa de simular ambiente de indústrias de laticínios, os experimentos foram realizados utilizando leite de vaca integral UHT para cultivo e adesão do *pool* de *Salmonella* spp. Primeiramente foi testado tempo de contato de 10 minutos, bem como soluções sanificantes preparadas com o dobro da CIM e metade da CIM.

Como mostra a Figura 3, soluções de timol e carvacrol preparadas com o valor obtido para CIM, bem como para o dobro desta concentração, causaram inibição total do *pool* composto por diferentes cepas de *Salmonella*, mesmo comportamento observado para o *pool* composto por cepas de *S. aureus*. Entretanto, as soluções de timol e carvacrol preparadas com metade do valor da CIM não inativaram toda a população, sendo consideradas inadequadas para indústrias de alimentos. Além disso, a solução sanificante preparada com o valor obtido para CIM de timol e carvacrol encapsulados, também inibiu totalmente o micro-organismo.

Como foi alcançada inibição total do *pool* de *Salmonella* spp. após 10 minutos, avaliou-se o tempo de contato de 1 minuto. A Figura 4 evidencia que não foi possível atingir inibição total do *pool* de *Salmonella* spp., mesmo quando foram utilizadas soluções sanificantes preparadas com timol e carvacrol no dobro da CIM. Além disso, a solução de timol e carvacrol encapsulada não mostrou reduções logarítmicas satisfatórias. Esses resultados mostram que os antimicrobianos naturais estudados têm melhor ação sanificante frente à *Salmonella* spp. quando o tempo de contato é prolongado, diferentemente do observado para *S. aureus*.

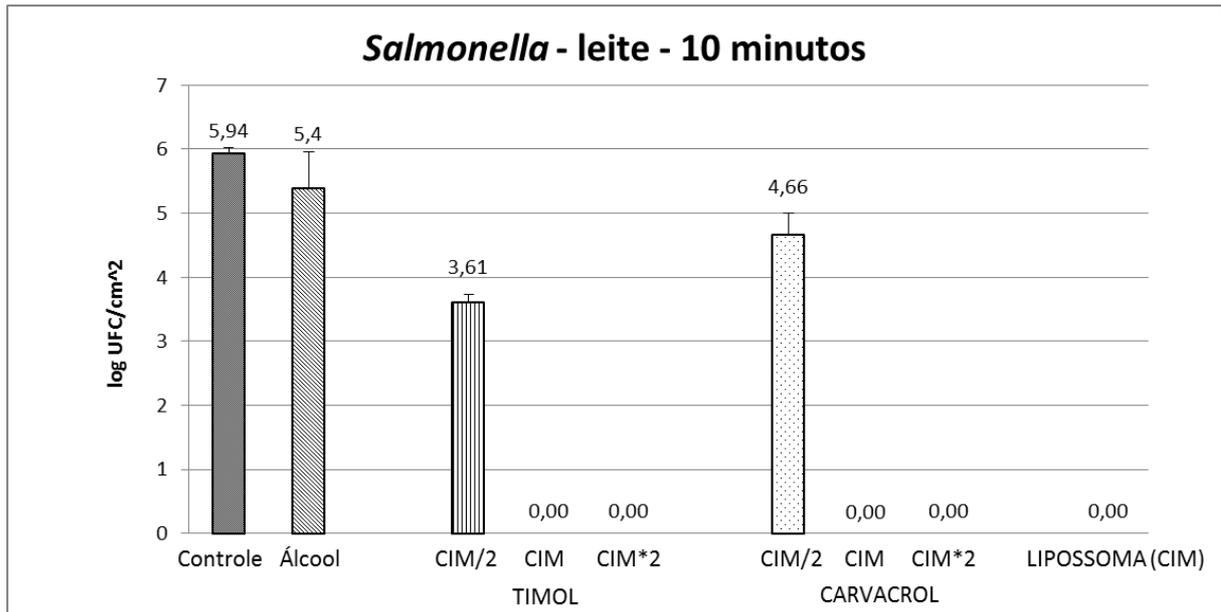


Figura 3: Inativação de *Salmonella* spp. (cultivada em leite de vaca integral) aderido em aço inoxidável utilizando solução alcoólica 20% contendo timol (CIM = 0,3312 mg/mL), carvacrol (CIM = 0,3312 mg/mL) e lipossomas contendo timol/carcacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) após 10 minutos de contato. A barra cinza mostra a população que aderiu ao coupon após 15 minutos de contato e a barra pontilhada cinza mostra o efeito da solução alcoólica 20% sem antimicrobianos.

Santurio *et al.* (2007) também analisaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de orégano (carvacrol, 3 a 17%), tomilho (timol, 40%) e canela (cinamaldeído, 75%) frente a diferentes sorovares de *Salmonella*, entre eles *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg*, *S. Saintpaul* e *S. Heidelberg*, todas de origem avícola. O estudo evidenciou que a atividade do óleo de orégano foi superior ao do tomilho, e este superior ao de canela, resultado que vai ao encontro do concluído por Helander *et al.* (1998), que ao caracterizarem a atividade dos componentes dos óleos essenciais, observaram que o carvacrol e o timol, principais frações dos óleos de orégano e de tomilho, respectivamente, evidenciaram atividades similares, as quais eram superiores a do cinamaldeído, principal constituinte do óleo de canela.

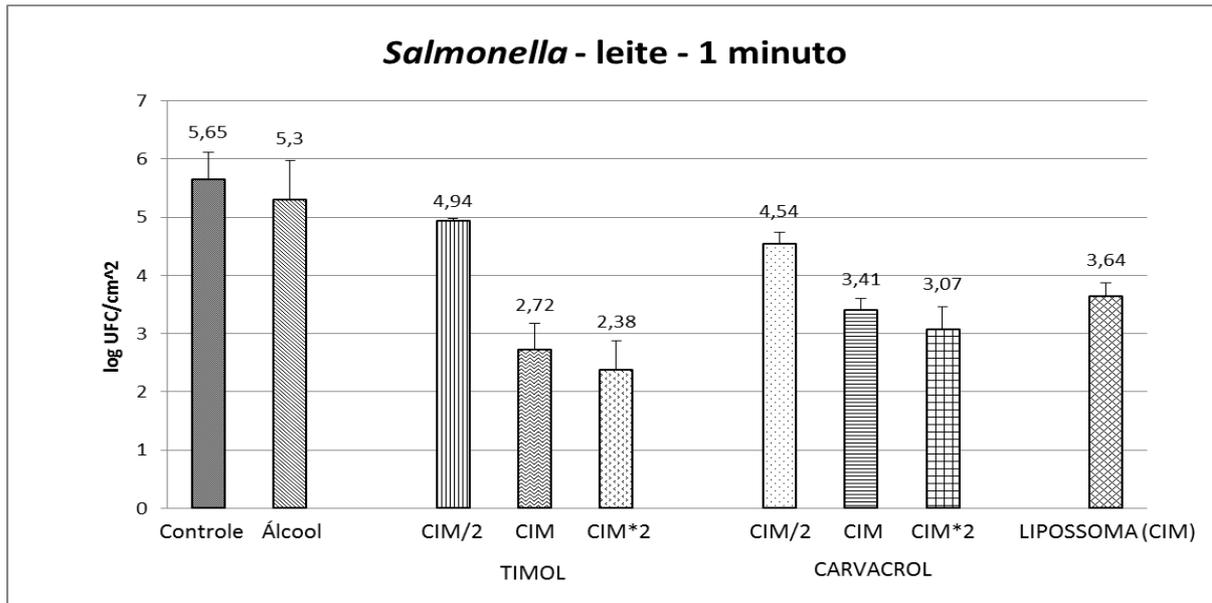


Figura 4: Inativação de *Salmonella* spp. (cultivada em leite de vaca integral) aderido em aço inoxidável utilizando solução alcoólica 20% contendo timol (CIM = 0,3312 mg/mL), carvacrol (CIM = 0,3312 mg/mL) e lipossomas contendo timol/carvacrol (CIM = 0,6625 mg/mL) após 1 minuto de contato. A barra cinza mostra a população que aderiu ao coupon após 15 minutos de contato e a barra pontilhada cinza mostra o efeito da solução álcool 20% sem antimicrobianos.

Comparando os resultados obtidos para inibição microbiana frente a *S. aureus* e *Salmonella* spp. aderidos em aço inoxidável pela ação de timol e carvacrol, percebem-se valores médios mais pronunciados de reduções logarítmicas para *S. aureus*, que apresentou inibição total também no tempo de contato mais curto, isso porque, segundo Harpaz *et al.* (2003), sendo este um micro-organismo Gram positivo, há melhora na ação dos óleos, ou seja, há maior incorporação do aditivo na parede celular. Dorman & Deans (2000) testaram a atividade de óleos essenciais de cravo-da-índia, orégano, gerânio e pimenta sobre 25 espécies de bactérias Gram positivas e negativas e os resultados mostraram que bactérias Gram positivas foram mais suscetíveis aos óleos essenciais estudados do que as Gram negativas. Entretanto, outros autores mencionam que timol e carvacrol são mais eficazes sobre bactérias Gram negativas, devido a características da membrana que as envolvem (Sharififar *et al.*, 2007).

CONCLUSÕES

S. aureus e *Salmonella* spp. cultivados tanto em caldo BHI como em leite de vaca integral foram capazes de aderir em alta concentração ao aço inoxidável AISI 304, após 15 minutos de contato. Os desinfetantes desenvolvidos, ou seja, solução alcoólica 20% contendo 0,662 mg/mL de carvacrol ou timol foram eficazes para inativar uma população média de 6,1 log UFC/cm² de *S. aureus* aderido ao aço inoxidável mesmo na presença de resíduos de leite após 1 minuto de ação. Para *Salmonella* spp., os desinfetantes contendo 0,331 mg/mL de timol ou carvacrol foram mais eficazes na inativação do micro-organismo quando o tempo de contato foi de 10 minutos na presença de resíduos de leite, com inativação de uma população média de 5,94 log UFC/cm². Com tempo de contato de 1 minuto nenhum dos sanificantes foi capaz de eliminar totalmente a população de *Salmonella* spp.

Lipossomas contendo timol/carvacrol foram desenvolvidos mostrando tamanho adequado, baixo índice de polidispersidade e potencial zeta positivo. Para inativação de *S. aureus* ou *Salmonella* spp. aderidos em aço inoxidável foi necessário manter os lipossomas (CIM = 0,662 mg/mL) em contato com o material por 10 minutos, sugerindo uma liberação mais lenta dos antimicrobianos encapsulados. Mais estudos são necessários para verificar um possível efeito residual do antimicrobiano encapsulado em lipossomas, visando diminuir a contaminação cruzada em indústrias de alimentos.

Mesmo sem apresentar odor característico nas concentrações utilizadas neste estudo, tanto timol quanto carvacrol ainda necessitam aprovação por órgãos oficiais de registro e fiscalização para que possam ser utilizados como sanitizantes em indústrias de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, N. J. Higiene na indústria de alimentos. Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. **Editora Varela**, 2008.
- Araújo, E. A.; De Andrade, N. J.; De Carvalho, A. F.; Ramos, A. M.; Silva, C. A. S. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1940-1948, 2010.
- Asbahani, A. El; Miladi, K.; Bradi, W.; Sala, M.; Aït Addi, E. H.; Casabianca, H.; Mousadik, A. El; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F. N. R.; Elaissari, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220 – 243, 2015.
- Batista, P. Higienização de equipamentos e instalações na indústria agroalimentar. **Forvisão – Consultoria em Formação Integrada**, Lda. 1ª Edição. 2003.

Beresford, M. R.; Andrews, P. W.; Shama, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 1000 – 1005, 2001.

Bonsaglia, E. C. R.; Silva, N. C. C.; Fernandes Júnior, A.; Araújo Júnior, J. P.; Tsunemi, V. L. M.; Rall, M. H. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, v. 35, p. 386 – 391, 2014.

Branen, J. K.; Davidson, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 63 – 74, 2004.

Burmolle, M.; Webb, J. S.; Rao, D.; Hansen, L.H.; Sorensen, S. J.; Kjelleberg, S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3916–3923. 2006.

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

Capalonga, R.; Ramos, R. C.; Both, J. M. C.; Soeiro, M. L. T.; Longaray, S. M.; Haas, S.; Tondo, E. C. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in Southern Brazil between 2007 and 2012. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 7, p. 811 – 817, 2014.

Carpentier, B.; Chassaing, D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 111–122, 2004.

Chollet, E.; Sebti, I.; Martial-Gros, A.; Degraeve, P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, v. 19, p. 982 – 989, 2008.

Chorianopoulos, N. G.; Giaouris, E. D.; Skandamis, P. N.; Haroutounian, S. A.; Nychas, G. J. E. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1586–1596, 2008.

Dal Pozzo, M.; Viégas, J.; Santurio, D. F.; Rossatto, L.; Soares, I. H.; Alves, S. H.; Da Costa, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus spp* isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 41, n. 4, p. 667-672, 2011.

Dorman, H. J. D.; Deans, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308 – 316, 2000.

Geimba, M. P.; Tondo, E. C.; Oliveira, F. A.; Canal, C. W.; Brandelli, A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* sp. isolated from foods involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, South of Brasil. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1229 – 1233, 2004.

Harpaz, S.; Glatman, L.; Drabkin, V.; Gelman, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, Ames, v. 66, n. 3, p. 401 – 417, 2003.

Helander, I.M. *et al.* Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590 - 3595, 1998.

Hood, S. K.; Zottola, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, n. 2 – 3, p. 145 – 153, 1997.

Hunter, R. J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. London: Academic Press. 1988.

Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers of Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1 – 24, 2012.

Júnior, A. C. S. **Atuação de óleos essenciais sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável e polipropileno**. 2011. 75(1). Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG. 2011.

Katsikogianni, M.; Missirlis, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial and techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells and Materials**, v. 7, n. 8, p. 37 – 57, 2004.

Lakis, Z.; Mihele, D.; Nicorescu, I.; Vulturescu, V.; Udeanu, D. I. The antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* and *Origanum syriacum* essential oils on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* and *Candida albicans*. **Farmacia**, v. 60, n. 6, p. 857 – 865, 2012.

Lambert, R. J. W.; Skandamis, P. N.; Coote, P.; Nychas, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, n. 3, v. 91, p. 453 – 462, 2001.

Lu, Y.; Wu, C. Reduction of *Salmonella enterica* contamination on grape tomatoes by washing with thyme oil, thymol and carvacrol as compared with chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 12, p. 2270 – 2275, 2010.

Malheiros, P.S.; Micheletto, Y. M. S.; Silveira, N. P.; Brandelli, A. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1198–1203. 2010.

Malheiros, P. S.; Daroit, D. J.; Brandelli, A. Food encapsulations of liposome-encapsulates antimicrobial peptides. **Trends in Science & Technology**, v. 21, n. 6, p. 284 – 292, 2010.

Malheiros, P. S. **Desenvolvimento de lipossomas contendo peptídeos antimicrobianos para o controle de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos**. 2011. 154(1). Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Abril de 2011.

- Mendonça, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 85(1). Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG. 2004.
- Milles, A. A.; Misra, S. S. Estimation of the bactericidal power of the bloods. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.
- Molin, S.; Tolker-Nielsen, T.; Hansen, S.K. Microbial interactions in mixed-species biofilms. **Microbial Biofilms**, Ed. Ghannoum, M.A. and O’Toole, G.A, p. 206–221. Washington, DC: ASM Press, 2004.
- Mozafari, W. R.; Johnson, C.; Hatziantoniou, S.; Demetzos, C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, New York, v. 18, n. 4, p. 309 – 327, 2008.
- Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- Ortega, M. P.; Hagiwara, T.; Watanabe, H.; Sakiyama, T. Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 573 – 578, 2010.
- Pan, K.; Chen, H.; Davidson, P. M.; Zhong, Q. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 1649 – 1657, 2014.
- Paula, H. C. B.; Sombra, F. M.; Abreu, F. O. M. S.; De Paul, R. C. M. Lippia sidoides essential oil encapsulation by angico gum/chitosan nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2359 – 2366, 2010.
- Pereira, G. I. **Dinâmica populacional de *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina a inoculado em queijo prato**. 2006. 85(1). Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2006.
- Rossoni, E. M. M.; Gaylarde, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2000.
- Santos, A. L.; Santos, D. O.; Freitas, C. C.; Ferreira, B. L. A.; Afonso, I. F.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- Santurio, J. M.; Santurio, D. F.; Pozzatti, P.; Moraes, C.; Franchin, P. R.; Alves, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.
- Sharififar, F.; *et al.* In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 7, p. 800 – 805, 2007.

Shi, X.; Zhu, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 9, p. 407 – 413, 2009.

Silva, G.; Dutra, P. R. S.; Cadima, I. M. Higiene na Indústria de Alimentos. **E-Tec Brasil – Escola Técnica Aberta do Brasil**. Universidade Federal do Pernambuco – UFRPE/CODAI. 2010.

Silva, J. P. L. **Avaliação da ação de antimicrobianos naturais no controle de *Salmonella Enteritidis* em salada de legumes com maionese**. 2007. 90(1). Tese para obtenção do Grau de Doutor. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2007.

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

Tondo, E. C.; Machado, T. R. M.; Malheiros, P. S.; Padrão, D. K.; De Carvalho, A. L.; Brandelli, A. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 41, n. 4, p. 1027 - 1037, 2010.

Ultee, A.; Smid, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 373 – 378, 2001.

Ultee, A.; Bennink, M. H. J.; Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

Weisheimer, V.; Miron, D.; Silva, C. B.; Guterres, S.S.; Schapoval, E.E. Microparticles containing lemongrass volatile oil: preparation, characterization and thermal stability. **Pharmazie**, v. 65, n. 12, p. 885 -890, 2010.

Whitehead, K. A.; Verran, J. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 84 – 91, 2015.

Zhang, Y.; Niu, Y.; Luo, Y.; Ge, M.; Yang, T.; Yu, L. L.; Wang, Q. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, v. 142, p. 269 – 275, 2014.

Zorzi, G. K.; Carvalho, E. L. S.; Von Poser, G. L.; Teixeira, H. F. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 25, n. 4, p. 426 – 436, 2015.

5. CONCLUSÕES

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

- ✓ A Concentração Inibitória Mínima mostrou que *S. aureus* foi mais resistente à presença de timol e carvacrol do que *Salmonella* spp.
- ✓ *S. aureus* e *Salmonella* spp. (8 a 9 log UFC/mL) cultivados tanto em caldo BHI como em leite de vaca integral foram capazes de aderir em alta concentração ao aço inoxidável AISI 304 (5,5 a 6,5 log UFC/cm²) após 15 minutos de contato.
- ✓ Os desinfetantes desenvolvidos, ou seja, solução alcoólica 20% contendo 0,662 mg/mL de carvacrol ou timol foram eficientes para inativar uma população média de 6,1 log UFC/cm² de *S. aureus* aderido ao aço inoxidável mesmo na presença de resíduos de leite após 1 minuto de ação.
- ✓ Para *Salmonella* spp. os desinfetantes contendo 0,331 mg/mL de timol ou carvacrol foram mais eficientes na inativação do micro-organismo quando o tempo de contato foi de 10 minutos na presença de resíduos de leite, com inativação de uma população média de 5,94 log UFC/cm².
- ✓ Com tempo de contato de 1 minuto nenhum dos sanificantes foi capaz de eliminar totalmente uma alta população de *Salmonella* spp. aderida ao aço inoxidável. Entretanto, esse tempo foi suficiente para inibir 2,93 log UFC/cm² do patógeno aderido quando o composto utilizado foi timol.
- ✓ Os lipossomas contendo timol/carvacrol mostraram tamanho adequado, baixo índice de polidispersidade e potencial zeta positivo.
- ✓ Para inativação de *S. aureus* ou *Salmonella* spp. aderidos em aço inoxidável foi necessário manter os lipossomas (CIM = 0,662 mg/mL) em contato com o material por 10 minutos, sugerindo uma liberação mais lenta dos antimicrobianos encapsulados.

- ✓ Mais estudos são necessários para verificar um possível efeito residual do antimicrobiano encapsulado em lipossomas visando diminuir a contaminação cruzada em indústrias de alimentos.

- ✓ É possível sugerir que os desinfetantes (solução alcoólica 20% contendo carvacrol ou timol) desenvolvidos nesse estudo cumprem diversos requisitos importantes, tais como rápida destruição dos micro-organismos avaliados, pouco odor e baixo custo. Entretanto, é preciso considerar que para sua utilização na indústria de alimentos é necessário prévia aprovação e liberação pelos órgãos oficiais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C., Pagán, R. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 3, p. 320–329, 2011.
- Akutsu, C. K. **Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado**. 2001. 84(1). Tese DE Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 2001.
- Andrade, N. J. Higiene na indústria de alimentos. Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. **Editores Varela**, 2008.
- Araújo, E. A.; De Andrade, N. J.; De Carvalho, A. F.; Ramos, A. M.; Silva, C. A. S. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**. v. 33, n. 9, p. 1940-1948, 2010.
- Asbahani, A. El; Miladi, K.; Bradi, W.; Sala, M.; Aït Addi, E. H.; Casabianca, H.; Mousadik, A. El; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F. N. R.; Elaissari, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1 – 2, p. 220 – 243, 2015.
- Azerêdo, G. A.; Figueiredo, R. C. B. Q.; Souza, E. L.; Stamford, T. L. M. Changes in *Listeria monocytogenes* induced by *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils alone and combined at subinhibitory amounts. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 2, p. 226 – 235, 2012.
- Balaban, N.; Rasooly, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1–10, 2000.
- Batista, P. Higienização de equipamentos e instalações na indústria agroalimentar. **Forvisão – Consultoria em Formação Integrada**, Lda. 1ª Edição. 2003.
- Beresford, M. R.; Andrews, P. W.; Shama, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 1000 – 1005, 2001.
- Boari, C. A.; Alves, M. P.; Tebaldi, V. M. R.; Savian, T. V.; Piccoli, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 29, n. 4, p. 886 - 895, 2009.
- Bonsaglia, E. C. R.; Silva, N. C. C.; Fernandes Júnior, A.; Araújo Júnior, J. P.; Tsunemi, V. L. M.; Rall, M. H. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 386 – 391, 2014.
- Branen, J. K.; Davidson, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 1, p. 63 – 74, 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. **Dados Epidemiológicos – DTA – Período de 2000 a 2013**. Abril de 2013.

Burmolle, M.; Webb, J. S.; Rao, D.; Hansen, L.H.; Sorensen, S. J.; Kjelleberg, S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3916–3923, 2006.

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

Capalonga, R.; Ramos, R. C.; Both, J. M. C.; Soeiro, M. L. T.; Longaray, S. M.; Haas, S.; Tondo, E. C. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in Southern Brazil between 2007 and 2012. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 7, p. 811 – 817, 2014.

Carpentier, B.; Chassaing, D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 111–122, 2004.

CFR – Code of Federal Regulations Title 21 [WWW Document], 2015. URL < <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=182.20> > Acesso em set. 2015.

Chollet, E.; Sebti, I.; Martial-Gros, A.; Degraeve, P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, v. 19, n. 10, p. 982 – 989, 2008.

Chorianopoulos, N. G.; Giaouris, E. D.; Skandamis, P. N.; Haroutounian, S. A.; Nychas, G. J. E. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1586–1596, 2008.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. Document M27-A2, Pensylvânia. 51p. 2002.

Coelho, M. S.; Domingues, A. S.; Dias, N. A. A.; Do Vale, L. A.; Piccoli, R. H. **Efeito bacteriostático de citral, eugenol e timol sobre Salmonella Enteritidis e Staphylococcus aureus**. XXII Congresso de Pós-Graduação da UFLA - 14 a 18 de outubro de 2013.

Coimbra, M.; Isacchi, B.; Van Bloois, L.; Torano, J. S.; Ket, A.; Wu, X.; Broere, F.; Metselaar, J. M.; Rijcken, C. J. F.; Storm, G.; Bilia, R.; Schiffelers, R. M. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 2, p. 433–442. 2011.

Cunha, B. **Investigação de surtos alimentares ocorridos em serviços de alimentação no Rio Grande do Sul**. 2008. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Engenharia de Alimentos. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre. 2008.

Dal Pozzo, M.; Viégas, J.; Santurio, D. F.; Rossatto, L.; Soares, I. H.; Alves, S. H.; Da Costa, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus spp* isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 41, n. 4, p. 667-672, 2011.

Davidson, P. M.; Harrison, M. A. Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. **Food Technology**, v. 56, n. 11, p. 69-78, 2002.

De Paula, C. M. **Avaliação da sorologia e susceptibilidade a antimicrobianos de linhagens de *Salmonella sp.* envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul entre 2003 e 2006**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre. 2006.

Dorman, H. J. D.; Deans, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, n. 2, v. 88, p. 308 – 316, 2000.

Favrin, S. J.; Jassim, S. A.; Griffiths, M. W. Development and Optimization of a novel immunomagnetic separation – bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 217-224, 2001.

Furukawa, S.; Akiyoshi, Y.; Komoriya, M.; Ogihara, H.; Morinaga, Y. Removing *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms on stainless steel by cleaning-in-place (CIP) cleaning agents. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 669–672, 2010.

Gaeti, M. P. N. **Efeito da encapsulação em lipossomas sobre a estabilidade físico-química e citotoxicidade in vitro do 4-nerolidilcatecol**. 2011. 74(1). Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde. Universidade Federal de Goiás. Goiânia – GO. 2011.

Geimba, M. P.; Tondo, E. C.; Oliveira, F. A.; Canal, C. W.; Brandelli, A. Serological characterization and prevalence of spvR genes in *Salmonella sp.* isolated from foods involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, South of Brasil. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1229 – 1233, 2004.

Gutierrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 142 – 150, 2009.

Harpaz, S.; Glatman, L.; Drabkin, V.; Gelman, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, Ames, v. 66, n. 3, p. 401 – 417, 2003.

Helander, I.M. *et al.* Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590 - 3595, 1998.

Hood, S. K.; Zottola, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, n. 2 – 3, p. 145 – 153, 1997.

Hori, K.; Matsumoto, S. Bacterial adhesion: from mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 424 – 434, 2010.

Hunter, R. J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. London: Academic Press. 1988.

Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers of Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1 – 24, 2012.

Jesorka, A.; Orwar, O. Liposomes: Technologies and analytical applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, p. 801 – 832, 2008.

Júnior, A. C. S. **Atuação de óleos essenciais sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável e polipropileno**. 2011. 75(1). Tese de Mestrado em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG. 2011.

Kasnowski, M. C.; Mantilla, S. P.S.; Oliveira, L. A. T.; Franco, R. M. Formação de biofilme na Indústria de Alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VIII – Número 15 – Julho de 2010 – Periódico Semestral.

Katsikogianni, M.; Missirlis, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial and techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells and Materials**, v. 7, n. 8, p. 37 – 57, 2004.

Kavanaugh, N. L.; Ribbeck, K. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 11, p. 4057 – 4061, 2012.

Lakis, Z.; Mihele, D.; Nicorescu, I.; Vulturescu, V.; Udeanu, D. I. The antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* and *Origanum syriacum* essential oils on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Candida albicans*. **Farmacia**, v. 60, n. 6, p. 857 – 865, 2012.

Lambert, R. J. W.; Skandamis, P. N.; Coote, P.; Nychas, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, n. 3, v. 91, p. 453 – 462, 2001.

Leal, P. M. **Ação antimicrobiana de compostos majoritários presentes em óleos essenciais sobre bactérias causadoras de infecções hospitalares**. 2013. 52(1). Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu – SP. 2013.

Le Loir, Y.; Baron, F.; Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 63–76, 2003.

- Liolios, C.C.; Gortzi, O.; Lalas, S.; Tsaknis, J.; Chinou, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 112, p. 77–83, 2009.
- Lu, Y.; Wu, C. Reduction of *Salmonella enterica* contamination on grape tomatoes by washing with thyme oil, thymol and carvacrol as compared with chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 12, p. 2270 – 2275, 2010.
- Malheiros, P.S.; Micheletto, Y. M. S.; Silveira, N. P.; Brandelli, A. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1198–1203, 2010.
- Malheiros, P. S. **Desenvolvimento de lipossomas contendo peptídeos antimicrobianos para o controle de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos**. 2011. 154(1). Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Abril de 2011.
- Malheiros, P. S.; Daroit, D. J.; Brandelli, A. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 6, p. 284 - 292. 2010.
- Malheiros, P. S.; De Paula, C. M. D.; Tondo, E. C. Cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com linhagens de outros sorovares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n. 4, p. 751-755, 2007.
- Malheiros, P. S.; Sant’Anna, V.; Micheletto, Y. M. S.; Da Silveira, N. P.; Brandelli, A. Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, p. 3545 – 3552, 2011.
- Marques, S. C.; Rezende, J. G. O. S.; Alves, L. A. F.; Silva, B. C.; De Abreu, L. R.; Piccoli, R. H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 538 – 543, 2007.
- Memisi, N.; Moracanib, S. V.; Milijasevic, M.; Babic, J.; Djukic, D. CIP cleaning processes in the dairy industry. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 184 – 186, 2015.
- Mendonça, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 85(1). Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG. 2004.
- Milan, C.; Timm, C. D. Fatores de virulência associados à formação de biofilme por *Salmonella enterica*: Minirrevisão. **Science and Animal Health**, v. 3, n.1, p. 94-102, 2015.
- Milles, A. A.; Misra, S. S. Estimation of the bactericide power of the bloods. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

Molin, S.; Tolker-Nielsen, T.; Hansen, S.K. Microbial interactions in mixed-species biofilms. **Microbial Biofilms** ed. Ghannoum, M.A. and O'Toole, G.A. pp. 206–221. Washington, DC: ASM Press. 2004.

Mozafari, W. R.; Johnson, C.; Hatziantoniou, S.; Demetzos, C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, New York, v. 18, n. 4, p. 309 – 327, 2008.

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

Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

Oliveira, K. A. R.; Medeiros, J. A. C.; Figueiredo, R. C. B. Q.; Magnani, M.; Siqueira Junior, J. P.; Souza, E. L. Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. **Food Control**, v. 47, p. 334 – 339, 2015.

Ortega, M. P.; Hagiwara, T.; Watanabe, H.; Sakiyama, T. Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 573–578, 2010.

Palabiyik, I; Yilmaz, M. T.; Fryer, P. J.; Robbins, P. T.; Toker, O. S. Minimising the environmental footprint of industrial-scaled cleaning processes by optimization of a novel clean-in-place system protocol. **Journal of Cleaner Production**, v. 108, p. 1009-1018, 2015.

Pan, K.; Chen, H.; Davidson, P. M.; Zhong, Q. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 1649 – 1657, 2014.

Parizzi, S. Q. F.; Andrade, N. J.; Silva, C. A. S.; Soares, N. F. F.; Silva, E. A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.

Patrignani, F.; Siroli, L.; Serrazanetti, D. I.; Gardini, F.; Lanciotti, R. Innovative strategies based on the use of essential oils and their components to improve safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 311 – 319, 2015.

Paula, H. C. B.; Sombra, F. M.; Abreu, F. O. M. S.; De Paul, R. C. M. Lippia sidoides essential oil encapsulation by angico gum/chitosan nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2359 – 2366, 2010.

Pereira, G. I. **Dinâmica populacional de *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina a inoculado em queijo prato**. 2006. 85(1). Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2006.

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

Santana, E.H.W.; Beloti, V.; Aragon-alegro, L.C.; Mendonça, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

Santos, A. L.; Santos, D. O.; Freitas, C. C.; Ferreira, B. L. A.; Afonso, I. F.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

Santurio, J. M.; Santurio, D. F.; Pozzatti, P.; Moraes, C.; Franchin, P. R.; Alves, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

Sharififar, F.; *et al.* In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 7, p. 800 – 805, 2007.

Sharma, A.; Sharma, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 154, n. 2, p. 123 – 140, 1997.

Shi, X.; Zhu, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 9, p. 407 – 413, 2009.

Shinohara, N. K. S.; De Barros, V. B.; Jimenez, S. M. C.; Machado, E. C. L.; Dutra, R. A. F.; De Lima, J. L. *Salmonella spp.*, importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 13, n. 5, p. 1669-1674, 2008.

Silva, G.; Dutra, P. R. S.; Cadima, I. M. Higiene na Indústria de Alimentos. **E-Tec Brasil – Escola Técnica Aberta do Brasil**. Universidade Federal do Pernambuco – UFRPE/CODAI. 2010.

Silva, J. P. L. **Avaliação da ação de antimicrobianos naturais no controle de *Salmonella Enteritidis* em salada de legumes com maionese**. 2007. 90(1). Tese para obtenção do Grau de Doutor. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2007.

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

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

Tondo, E. C.; Machado, T. R. M.; Malheiros, P. S.; Padrão, D. K.; De Carvalho, A. L.; Brandelli, A. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 41, n. 4, p. 1027 – 1037, 2010.

Tranter, H. S.; Tassou, C. S.; Nychas, G. J. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, n. 3, p. 253-259, 1993.

Ultee, A.; Smid, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 373 – 378, 2001.

Ultee, A.; Bennink, M. H. J.; Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p.1561-1568, 2002.

Valeriano, C.; De Oliveira, T. L. C.; De Carvalho, S. M.; Cardoso, M. G.; Alves, E.; Piccoli, R. H. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella* enterica serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 673–677, 2012.

Vugia, D. J.; Samuel, M.; Farley, M. M.; et al. Invasive *Salmonella* infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 3, p. 149-156, 2004.

Weisheimer, V.; Miron, D.; Silva, C. B.; Guterres, S.S.; Schapoval, E.E. Microparticles containing lemongrass volatile oil: preparation, characterization and thermal stability. **Pharmazie**, v. 65, n. 12, p. 885-90, 2010.

Whitehead, K. A.; Verran, J. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 84 – 91, 2015.

Xavier, J. B. *et al.* Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, Oeiras, v. 1, p. 1 – 12, 2005.

Xu, W.; Qu, W.; Huang, K.; Guo, F.; Yang, J.; Zhao, H. Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 126 – 133, 2007.

Zhang, Y.; Niu, Y.; Luo, Y.; Ge, M.; Yang, T.; Yu, L. L.; Wang, Q. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, v. 142, p. 269 – 275, 2014.

Zorzi, G. K.; Carvalho, E. L. S.; Von Poser, G. L.; Teixeira, H. F. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 25, n. 4, p. 426 – 436, 2015.