



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

PALMIRA PENINA RAÚL TIMBE

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Baccharis dracunculifolia* DC (ALECRIM-DO-CAMPO) COMBINADO COM NISINA E NANOENCAPSULADO

Porto Alegre

2019

PALMIRA PENINA RAÚL TIMBE

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Baccharis dracunculifolia* DC (ALECRIM-DO-CAMPO) COMBINADO COM NISINA E NANOENCAPSULADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR: PROF. DR. ADRIANO BRANDELLI
CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. AMANDA DE SOUZA DA MOTTA

Porto Alegre
2019

CIP - Catalogação na Publicação

Timbe, Palmira Penina Raul

Atividade antimicrobiana de *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim-do-campo) combinado com nisina e nanoencapsulado / Palmira Penina Raul Timbe.

-- 2019.

98 f.

Orientadora: Adriano Brandelli.

Coorientadora: Amanda de Souza da Motta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Antimicrobianos naturais. 2. Sinergismo. 3. Nanoencapsulação . I. Brandelli, Adriano, orient. II. Motta, Amanda de Souza da, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Autora: Palmira Penina Raúl Timbe

Título da dissertação: Atividade antimicrobiana de *Baccharis dracunculifolia* DC (Alecrim-do-campo) combinado com nisina e nanoencapsulado

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

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos PPGCTA/UFRGS

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Amanda de Souza da Motta

Docente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, PPGMAA/UFRGS

Banca: Márcia Monks Jantzen

Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial

Docente da faculdade de Veterinária e PPGAOA/UFRGS

Banca: Marjo Cadó Bessa

Doutora em Ciências Veterinárias - Biologia Celular

Docente na Escola de Ciências da Saúde e da Vida, PUCRS

Banca: Patrícia da Silva Malheiros

Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos PPGCTA/UFRGS

Homologada em: ____ / ____ / ____

Por: _____

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues
Coordenador PPGCTA/UFRGS

Prof^a. Dra. Simone Hickmann Flôres
Diretora ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, pela dádiva de vida e sabedoria.

A minha família, pelo apoio em todos meus desafios, compreensão, exemplo de carácter, e por tudo que me ensinaram.

Ao Deves Herculano Bernardo, pelo incentivo constante, preocupação, pela eterna paciência, apoio incondicional, por seu amor.

Aos meus orientadores, Professor Doutor Adriano Brandelli e a Professora Doutora Amanda de Souza da Motta, pela confiança depositada, ensinamentos e orientação. Ao Prof. Dr. Adriano, agradeço a oportunidade que me deu, por tudo que aprendi graças a você.

Aos colegas do laboratório 218 do ICTA, pela receptividade, pelos momentos de convívio, ensinamentos e experiência transmitida.

Aos meus colegas de turma (2018/01), em especial a Mariel Proz, Camila Hackenhaar e Tais Suhre, que estiveram comigo durante a minha caminhada, proporcionando-me ótimos momentos de convívio, conversas, e auxílio perante minhas dificuldades.

A comunidade moçambicana em Porto Alegre (MozPoa), em especial a Gloria Manhique, família Inroga, Telis Adolfo e Avelino Miguel, pelo apoio moral.

A todos professores do ICTA-UFRGS, o meu muito obrigado pela partilha de conhecimento.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia, Ensino Superior e Técnico-Profissional (MCTESTP), pelo financiamento.

E por último, a todos que direta ou indiretamente me ajudaram ao longo desta etapa de crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

A crescente busca por alimentos naturais e com alto teor de nutrientes, incentiva pesquisas sobre antimicrobianos naturais, como uma forma de conservação de alimentos alternativa aos antimicrobianos sintéticos e a altas temperaturas. Neste estudo, foi investigada a atividade antimicrobiana de bioativos de *Baccharis dracunculifolia* DC, planta popularmente conhecida como Alecrim-do-campo. Inicialmente, foi avaliada a ação do óleo essencial (OE) e extrato hidroalcolico (EH) de *B. dracunculifolia* DC contra 32 cepas de bactérias e 3 cepas de leveduras, através do teste disco-difusão, para selecionar a formulação com maior espectro de ação para os testes subsequentes. O OE e o EH apresentaram atividade antibacteriana, e o OE apresentou maior espectro. Na sequência, o OE foi combinado com nisina, para avaliar seu efeito sinérgico frente a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella* Enteritidis. O sinergismo foi avaliado através da curva de crescimento microbiano em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24 h a 37 °C. O OE e a nisina tiveram efeito sinérgico sobre todas cepas, por apresentar uma diferença superior a 4 log UFC/mL em relação aos antimicrobianos individuais as 24 h. Por último, foram desenvolvidas nanopartículas de Eudragit® RS100 carregadas de OE (N-OE) pela técnica de nanoprecipitação, seguida pela sua caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana. As N-OE, apresentaram tamanho de 151,6 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,08, potencial zeta (ζ) de + 51,7 mV, e eficiência de encapsulação (EE) de 99,4%. A ação antimicrobiana das N-OE e do OE, foi avaliada através da curva de crescimento microbiano, em caldo BHI, leite ultrapasteurizado integral e desnatado a 37 °C por 24 h. No meio sintético, o efeito foi testado contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* e *S. Enteritidis*, e observou-se que a ação das N-OE foi mais lenta em relação ao OE, por não ter se detectado nenhuma célula viável na contagem de colônias para todas cepas em 24 h, tendo o OE alcançado o mesmo efeito as 4 h, sugerindo-se uma liberação controlada do OE encapsulado. No leite, a ação foi testada contra *L. monocytogenes*, onde no integral as N-OE e o OE não demonstraram efeito antimicrobiano, enquanto que no leite desnatado as N-OE e o OE apresentaram efeito bacteriostático, e o OE foi o mais ativo, por reduzir a contagem de células em 2 log UFC/mL em relação aos controles em 24 h. A partir dos resultados deste estudo, o *B. dracunculifolia* DC pode ser considerada uma potencial fonte de antimicrobianos naturais. O sinergismo verificado entre o OE e a nisina permitiria reduzir a concentração do OE quando aplicado em alimento, o que reduziria os seus efeitos organolépticos

indesejáveis do OE. A nanoprecipitação permitiu encapsular com sucesso o OE desta planta, devido as ótimas características físico-químicas, alta eficiência de encapsulação, e a atividade antimicrobiana observada em meio de cultura sugestiva de liberação destas nanopartículas e a sua liberação controlada. No entanto, a redução do efeito antimicrobiano das N-OE observada no leite, sugere-se mais estudos sobre a interação dessas nanoestruturas com os componentes do alimento.

Palavras chave: antimicrobianos naturais, Alecrim-do-campo, óleo essencial, extrato hidroalcoólico, *Baccharis dracunculifolia* DC, Eudragit® RS100, nanoprecipitação.

ABSTRACT

Increased demand for natural and high nutrient content foods, encourages research on natural antimicrobials, as food preservation alternative to both synthetic antimicrobials and use of high temperatures. In this study was investigated the antimicrobial activity of bioactive compounds coming from *Baccharis dracunculifolia* DC, a plant popularly known as Alecrim-do-campo. Initially, was evaluated the action of *B. dracunculifolia* DC essential oil (EO) and hydroalcoholic extract (EH) against against 32 strains of bacteria and 3 strains of yeast, using the disc diffusion test, to select the formulation with the greatest spectrum of action for subsequent tests. The EO and EH presented antibacterial activity, and the EO presented larger spectrum. Thus, the EO was combined with nisin to evaluate its synergistic effect against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Salmonella Enteritidis*. Synergism was evaluated by the microbial growth curve in Brain Heart Infusion (BHI) broth for 24 h at 37°C. The EO and nisin have shown a synergistic effect up to all the tested strains, presenting a difference greater than 4 log CFU/mL compared to individual antimicrobials at 24 h. Successively, EO-loaded Eudragit® RS100 nanoparticles (N-EO) were developed by the nanoprecipitation technique, followed by characterization and antimicrobial activity evaluation. The N-EO shown size of 151.6 nm, a polydispersity index (PDI) of 0.08, a zeta potential (ζ) of + 51.7 mV, and an encapsulation efficiency (EE) of 99.4%. The antimicrobial action of N-EO and EO was evaluated through the microbial growth curve, in BHI broth, ultra-pasteurized whole milk and skimmed at 37 °C for 24 h. In the synthetic medium, the effect was tested against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* and *S. Enteritidis*, and it was observed that the action of encapsulated essential oil (N-EO) was slower in comparison to the free essential oil (EO), by no detected viable cell in the colony count for all strains within 24 h, with the EO achieving the same effect at 4 h, suggesting a controlled release of the encapsulated EO. In milk, the action was tested against *L. monocytogenes*, in the latter medium the N-EO and EO showed no antimicrobial effect in the whole milk, while in the skimmed milk the N-EO and EO showed bacteriostatic effect, highlighting the free EO more active compared to the N-EO, by reducing the cell count around 2 log CFU/mL compared to the controls at 24 h. From the results of this study, *B. dracunculifolia* DC can be considered a potential source of natural antimicrobials. The synergism between nisin and EO may reduce the concentration of the EO when applied in foods, minimizing organoleptic effects that may be undesirable. Nanoprecipitation has

successfully encapsulated the EO of this plant due to its excellent physicochemical characteristics, high encapsulation efficiency, and the antimicrobial activity observed in culture media suggestive of release of these nanoparticles and their controlled release. However, the reduced antimicrobial effect of N-OE observed in milk suggests further studies on the interaction of these nanostructures with food components.

Keywords: natural antimicrobials, Alecrim-do-campo, essential oil, hydroalcoholic extract, *Baccharis dracunculifolia* DC, Eudragit® RS100, nanoprecipitation.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC (Alecrim-do-campo).....	12
Figura 2 - Estrutura química de compostos majoritários presentes no extrato hidroalcoólico ou no óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC (Alecrim-do-campo)	14
Figura 3 - Estrutura química da nisina A.....	19
Figura 4 - Mecanismo de ação da nisina sobre células vegetativas.....	20
Figura 5 - Estrutura de nanocápsula (A) e nanoesfera (B)	23
Figura 6 - Desenvolvimento de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação	24

ARTIGO 1

Figura 1 - Efeito da nisina e do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC (OE), utilizados isoladamente ou combinados no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 (A), <i>B. cereus</i> ATCC 9634 (B), <i>S. aureus</i> ATCC 1901 (C), e <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 (D).....	42
--	----

ARTIGO 2

Figura 1 - Representação gráfica da distribuição de tamanho das nanopartículas (A), e do potencial Zeta (B) das nanopartículas contendo óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC (N-OE)	58
Figura 2 - Efeito do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC livre (OE) e encapsulado (N-OE) no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 (A), <i>S. aureus</i> ATCC 1901 (B), <i>B. cereus</i> ATCC 9634 (C) e <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 (D)	60
Figura 3 - Efeito do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC livre (OE) e encapsulado (N-OE) no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 em leite integral (A) e desnatado (B).....	62

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Cepas microbianas testadas em ensaios de atividade antimicrobiana, origem e condições de cultivo de cada micro-organismo.....	31
Tabela 2 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC (OE) e do extrato hidroalcoólico de <i>B. dracunculifolia</i> DC (EH).....	36
Tabela 3 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC (OE) em ágar leite contra culturas bacterianas mistas	40
Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC (OE) e da nisina	41

ARTIGO 2

Tabela 1 - Características físico-químicas de suspensões de nanopartículas contendo óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC (N-OE) e nanopartículas controle (N-B).....	58
Tabela 2 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC (OE)	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: Percentual
®: Marca registrada
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL: Bactérias Ácido Láticas
BHI: *Brain Heart Infusion*
CBM: Concentração Bactericida Mínima
CDC: *Center for Disease Control and Prevention*
CIM: Concentração Inibitória Mínima
DTA: Doença transmitida por alimentos
ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*
EE: Eficiência de encapsulação
EFSA: *European Food Safety Authority*
FAO: *Food and Agriculture Organization*
GRAS: Generally Recognized as Safe
IDA: Ingestão Diária Aceitável
JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
mg: Miligrama
MH: *Mueller Hinton*
mL: Mililitro
mV: Milivolt
N-OE: Nanopartículas contendo óleo essencial *Baccharis dracunculifolia* DC
nm: Nanômetro
°C: Graus Celsius
OE: Óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC
PDI: Índice de polidispersão
rpm: Rotações por minuto
UFC: Unidades Formadoras de Colônias
WHO: *World Health Organization*
ζ: Potencial zeta
μg: Micrograma
μL: Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVOS.....	3
1.1.1	Objetivo geral	3
1.1.2	Objetivos específicos.....	3
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	IMPORTÂNCIA DOS MICRO-ORGANISMOS NOS ALIMENTOS	4
2.1.1	<i>Listeria (Listeria monocytogenes, Listeria innocua, Listeria seeligeri)</i>	5
2.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.1.3	<i>Bacillus (Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens)</i>	6
2.1.4	<i>Escherichia coli</i>	7
2.1.5	<i>Salmonella Enteritidis</i>	8
2.1.6	<i>Aeromonas hydrophila</i>	8
2.1.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.1.8	<i>Erwinia psidii</i>	9
2.1.9	Leveduras (<i>Saccharomyces cerevisiae, Candida parapsilosis, Candida krusei</i>).....	10
2.2	ANTIMICROBIANOS NATURAIS.....	10
2.2.1	<i>Baccharis dracunculifolia DC</i>	12
2.2.2	Peptídeos Antimicrobianos - Nisina	16
2.3	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	21
2.3.1	Eudragit® RS 100	24
2.3.2	Caracteruzacao das nanoparticulas	25
3	METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1	ARTIGO 1	28
3.2	ARTIGO 2	50
6.	DISCUSSÃO GERAL	69
7.	CONCLUSÕES GERAIS	72
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos contêm diversos nutrientes, o que os tornam excelentes meios para o crescimento de micro-organismos. Conforme o tipo de micro-organismo presente, estes podem induzir a deterioração do alimento, causar doenças no consumidor, além de serem úteis na produção de alguns alimentos. Os micro-organismos responsáveis pela deterioração e doenças devem ser controlados para se obter um alimento seguro e com tempo de prateleira longo, sendo uma das formas de controle o uso de aditivos antimicrobianos e a pasteurização. No entanto, nos últimos anos tem se observado aumento no número de consumidores mais preocupados com a saúde, que buscam por alimentos mais naturais e com alto teor de nutrientes, rejeitando produtos contendo aditivos sintéticos (PISOSCHI et al., 2018) ou submetidos ao tratamento térmico envolvendo altas temperaturas (ALEGBELEYE et al., 2018; MELINI et al., 2017; PISOSCHI et al., 2018). Dessa forma, os antimicrobianos naturais que podem ser obtidos de plantas e bactérias, surgem como alternativa aos antimicrobianos sintéticos e ao tratamento térmico.

O *Baccharis dracunculifolia* DC (nome vernáculo alecrim-do-campo, alecrim-de-vassoura, vassourinha), é uma planta nativa do Brasil, onde suas folhas geralmente são utilizadas na medicina tradicional (SALAZAR et al., 2018). Esta planta produz metabólitos com propriedade antimicrobiana, as quais pertencem ao grupo dos terpenos e dos compostos fenólicos. Contudo, a aplicação dessas substâncias em alimentos enfrenta algumas limitações relacionadas ao sabor adstringente dos compostos fenólicos (VIDAL et al., 2018) e instabilidade dos mesmos ao oxigênio, umidade, calor, pH e luz (ALNAIZY; AKGERMAN, 2000; FRIEDMAN; JÜRGENS, 2000). Considerando a aplicação de terpenos, o pH, a presença do oxigênio, calor e luz também afetam sua estabilidade (KHAYYAT; SELVA ROSELIN, 2018; WEERAWATANAKORN et al., 2015), além de serem voláteis, hidrofóbicos (REDDY; COUVREUR, 2009) e alguns produtos da oxidação possuem odores desagradáveis (WEERAWATANAKORN et al., 2015). Além dos aspectos mencionados, sabe-se que a matriz alimentar é muito complexa, sendo composta por lipídeos, proteínas entre outros componentes, os quais podem reagir com as substâncias ativas reduzindo a sua potência, conseqüentemente doses maiores são necessárias para se observar o efeito desejado, o que incrementa o efeito organoléptico indesejável. Reconhecendo o potencial antimicrobiano da planta, e tencionando ultrapassar as limitações supracitadas, o uso dos seus

compostos combinados com bacteriocinas ou nanoencapsulados, podem ser consideradas estratégias para melhorar sua aplicação.

As bacteriocinas são peptídeos sintetizados ao nível dos ribossomos por certas linhagens de bactérias, que possuem atividade antimicrobiana, geralmente contra espécies relacionadas (FIELD; ROSS; HILL, 2018). Dentre as diversas bacteriocinas existentes, a nisina é a única considerada GRAS (*Generally Recognized as Safe* - geralmente reconhecido como seguro) e aprovada para uso em mais de 50 países, possuindo atividade contra várias bactérias Gram-positivas (PISOSCHI et al., 2018). Nos últimos anos diversas pesquisas têm demonstrado que a nisina quando combinada com antimicrobianos isolados de plantas, pode resultar em efeito sinérgico (FIELD et al., 2017; PINILLA; BRANDELLI, 2016), o que melhoraria o aspecto organoléptico indesejável, pela redução da dose necessária para observar o efeito desejado.

A nanoencapsulação é o processo que consiste no aprisionamento de substâncias ativas em materiais transportadores na escala nanométrica (FATHI; MARTÍN; MCCLEMENTS, 2014). Este processo tem despertado interesse no setor de alimentos devido às diversas vantagens proporcionadas ao material encapsulado, dentre estas (I) melhorar a estabilidade e biodisponibilidade por proteger o material de condições ambientais desfavoráveis, evitar volatilização de substâncias, e evitar interações entre o material encapsulado e componentes do alimento; (II) proporcionar a liberação controlada do ativo; (III) melhorar a solubilidade por permitir a mistura de substâncias naturalmente imiscíveis; e por se tratar de substâncias na escala nanométrica, há maior superfície de contato, conseqüentemente maior atividade (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

Neste contexto, foi estudada a propriedade antimicrobiana de *B. dracunculifolia* DC, além disso, estes bioativos foram combinados com a nisina, para potencializar a sua ação, como estratégia para reduzir os efeitos organoléptico (artigo 1); e foram nanoencapsulados para melhorar sua estabilidade, melhorar a solubilidade, permitir a liberação controlada, e reduzir as interações com a matriz alimentar (artigo 2).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de compostos de *Baccharis dracunculifolia* DC na forma individual, combinados com a nisina, e nanoencapsulados em Eudragit® RS100, frente a micro-organismos de interesse em alimentos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar o espectro de ação do óleo essencial (OE) e do extrato hidroalcoólico (EH) de *B. dracunculifolia* DC, contra bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas e leveduras oriundas de diferentes fontes;
- Avaliar a ação do OE sobre culturas mistas de bactérias;
- Verificar o efeito sinérgico entre o OE e nisina, sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas;
- Desenvolver e caracterizar nanopartículas de Eudragit® RS100 contendo OE;
- Testar a ação das nanopartículas em caldo BHI, contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas;
- Avaliar a ação das nanopartículas em leite ultrapasteurizado integral e leite desnatado, contra *Listeria monocytogenes*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTÂNCIA DOS MICRO-ORGANISMOS NOS ALIMENTOS

A qualidade e a segurança microbiológica dos alimentos estão diretamente relacionadas com a quantidade e o tipo de micro-organismos neles presentes. Os micro-organismos presentes nos alimentos podem ser patogênicos, deteriorantes ou benéficos. Os patogênicos quando presentes, são de extrema importância devido seu impacto negativo à saúde pública, sendo considerados a principal causa de Doença Transmitida por Alimento (DTA) no mundo (World Health Organization - WHO, 2015). Entende-se por DTA, qualquer doença de natureza infecciosa ou tóxica, que resulta da ingestão de alimentos e/ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas (WHO, 2015). Segundo a WHO (2015, 2019), estima-se que a nível mundial, por ano, cerca de 600 milhões de pessoas adoecem e 420 mil morrem devido a DTA, sendo a maior incidência e mortalidade observadas na África e Ásia. Nos Estados Unidos, os cinco principais agentes etiológicos envolvidos nos surtos são *Norovirus*, *Salmonella* spp, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus* (Center for Disease Control and Prevention – CDC, 2018), enquanto no Brasil são *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, coliformes e *Norovirus* os mais prevalentes (BRASIL, 2019a). Informações sobre agentes causais de DTA em Moçambique são escassas, mas segundo o relatório da WHO (2015), a região da África que o país faz parte, os agentes mais envolvidos em surtos são *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC), e *Norovirus*. A contaminação dos alimentos por micro-organismos, além de causar doenças no consumidor, também pode causar a deterioração do alimento, sendo estes conhecidos como deteriorantes. Durante o seu metabolismo, os agentes deteriorantes produzem substâncias que causam alterações sensoriais indesejáveis do alimento, tornando-o inaceitável pelo consumidor (BURKEPILE et al., 2006; GRAM et al., 2002; RAWAT, 2015). Estima-se que por ano, 25% dos alimentos produzidos são degradados por micro-organismo, após a colheita ou abate (GRAM et al., 2002; PETRUZZI, et al., 2017). Todo alimento que não for consumido, independentemente da causa, além de perdas econômicas, representa um impacto negativo na segurança alimentar pois emite CO₂ para meio ambiente e envolve desperdício de recursos, tais como terra, água, energia e insumos utilizados na produção (FAO, 2011). Além dos patogênicos e deteriorantes, que são indesejáveis, os alimentos podem conter micro-organismos benéficos, os quais são considerados GRAS (*Generally*

Recognized As Safe). Esses micro-organismos são geralmente utilizados na produção de alimentos tais como queijo, iogurte, cerveja, pão, além de serem úteis na conservação do alimento devido a capacidade de produzir substâncias com propriedade antimicrobiana como os peptídeos antimicrobianos, ácidos e álcoois (BOURDICHON et al., 2012; SIEDLER; BALTI; NEVES, 2019). A seguir encontra-se uma breve revisão dos micro-organismos sobre os quais os ensaios antimicrobianos foram realizados.

2.1.1 *Listeria (Listeria monocytogenes, Listeria innocua, Listeria seeligeri)*

Listeria é um gênero de bactérias Gram-positivas, anaeróbicas facultativas, composto por 18 espécies das quais a *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas para o homem, sendo casos de *L. ivanovii* escassos, o que torna a *L. monocytogenes* o patógeno mais importante (NÚÑEZ-MONTERO et al., 2018). Estas bactérias habitam diversos locais, e já foram isoladas no solo, material vegetal em decomposição, água, vestuário, instalações, o que facilita a contaminação dos alimentos e as superfícies do seu processamento (BUCHANAN et al., 2017; JARVIS et al., 2016; SAUDERS et al., 2012). Quando comparada a outras bactérias causadoras de DTA, o número de casos associados a *L. monocytogenes* é reduzido, mas o micro-organismo é de extrema importância devido a capacidade se multiplicar na temperatura de refrigeração e a alta taxa mortalidade (WHO, 2018a). A forma mais comum de transmissão da listeriose é por meio de ingestão, sendo as carnes, alimentos pronto para o consumo, laticínios, mariscos e vegetais os produtos já relatados (ALLEN et al., 2016; BUCHANAN et al., 2017). A dose infecciosa ainda é desconhecida, mas estima-se que menos de 1.000 células sejam suficientes para desencadear a doença nos indivíduos susceptíveis, fazendo parte deste grupo os idosos, imunodeprimidos, mulheres gestantes e recém-nascidos (FDA, 2012), e nos demais indivíduos acredita-se que a dose seja maior (WHO, 2018a). A infecção resultante da ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* pode causar dois tipos de síndromes, sendo elas, a síndromes não invasiva (forma leve da doença), e a invasiva (forma grave da doença). Na síndrome não invasiva, a bactéria limita-se ao trato gastrointestinal, e essa ocorre mais em indivíduos saudáveis, manifestando-se alguns dias após a infecção, enquanto que na forma invasiva, a bactéria atinge outros órgãos além do trato gastrointestinal, acometendo mais o grupo susceptível, e o período de incubação varia de dias a 3 meses, mas na maioria dos casos os sinais surgem entre uma a duas semanas, com taxa de mortalidade entre 20 % e 30 % (WHO, 2018a; ZHU; GOONERATNE; HUSSAIN, 2017).

2.1.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, com crescimento ótimo na temperatura entre 30 °C e 37 °C (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014), que habita locais como ar, água, equipamentos, animais, incluindo o homem (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012). No corpo humano, normalmente é encontrada na superfície da pele e no trato respiratório superior, sendo as narinas, mãos e braços de manipuladores de alimentos as fontes mais importantes na contaminação de alimentos (DENAYER et al., 2017). *S. aureus* é um dos agentes mais envolvidos em surtos de DTA, causando doença de pouca duração e baixa letalidade. A doença causada por *S. aureus* resulta da ingestão de toxina produzida pela bactéria no alimento, tendo já sido veiculada por carnes, ovos, leite, produtos lácteos, saladas, e produtos de panificação (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014). A dose infectante não está determinada, mas sabe-se que é baixa, havendo casos contraídos com 0,015 ng/g a 0,019 ng/g de toxina por alimento, e os sinais clínicos frequentemente surgem entre 2 e 7 horas, ocasionalmente dentro de 30 minutos, sendo o período de incubação influenciado pela quantidade de toxina ingerida e suscetibilidade do indivíduo (DENAYER et al., 2017).

2.1.3 *Bacillus (Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens)*

Os *Bacillus* são micro-organismos Gram-positivos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativas, formadoras de esporos. O gênero *Bacillus* compreende mais de 220 espécies de bactérias (CADORET et al., 2017), a maioria inofensivas, existindo alguns patógenos de origem alimentar, onde o *B. cereus* é o mais comum (GRANUM; STENFORS ARNESEN; FROM, 2014). Esse, por sua vez, é um patógeno relevante na indústria de alimentos, por ser produtor de esporos, estruturas que permitem a resistência do micro-organismo a tratamentos térmicos e químicos que normalmente eliminam células vegetativas, dificultando seu controle. As intoxicações por *B. cereus* resultam da ingestão de alimentos contaminados pela toxina ou bactéria, desencadeando duas síndromes, a emética e a diarreica. A síndrome emética geralmente ocorre devido ao consumo de alimentos ricos em amidos tais como arroz, contendo aproximadamente 8 µg a 10 µg de toxina por kg do peso corporal, manifestando-se (0,5-6) horas após a ingestão (STENFORS ARNESEN; FAGERLUND; GRANUM, 2008). Já a síndrome diarreica resulta da ingestão de alimentos contendo 10⁵-10⁸ Unidades Formadoras de colônias (UFC) por grama de alimento, sendo

geralmente veiculada por carnes, vegetais, lácteos, e pudins, com período de incubação superior a 6 horas (GRANUM; STENFORS ARNESEN; FROM, 2014; STENFORS ARNESEN; FAGERLUND; GRANUM, 2008). Ao contrário de *B.cereus*, as bactérias *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* são utilizadas na produção de alimentos (KIMURA; YOKOYAMA, 2019), possuem propriedade probiótica (ELSHAGHABEE et al., 2017), e por estas produzirem peptídeos antimicrobianos, também podem desempenhar um papel importante na conservação (FIRA et al., 2018). Apesar de *B. subtilis* não ser frequentemente associada a surtos, existe algumas cepas capazes de causar doenças (BEATTIE; WILLIAMS, 2014; GRANUM; STENFORS ARNESEN; FROM, 2014). Em vista disso, para aplicação de cepas de *Bacillus* em alimentos é imprescindível a realização de testes sobre seu efeito patogênico (FIRA et al., 2018).

2.1.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, que habita o trato gastrointestinal do homem e outros animais de sangue quente, sendo a maioria das cepas da espécie inofensivas, com exceção de algumas capazes de causar doença no trato gastrointestinal e extraintestinal (AIJUKA; BUYS, 2019; GOMES et al., 2016). A doença envolvendo trato gastrointestinal, resulta de consumo de alimentos contaminados, e é uma das principais causas de DTA em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos devido a más condições de higiene. No entanto, em países desenvolvidos, *E. coli* é menos frequente e quando ocorre geralmente está associada a contaminação cruzada (AIJUKA; BUYS, 2019). Com base nos sintomas causados, as cepas de *E. coli* são subdivididas em 7 patotipos, sendo estes a enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), produtora de toxina shiga (STEC), enteroagregativa (EAEC), de adesão difusa (DAEC), enteroinvasiva (EIEC), e aderente invasiva (AIEC) (AIJUKA; BUYS, 2019). O patotipo STEC serovar O157: H7 (*E. coli* O157: H7) é o mais comum em surtos, estando geralmente associado ao consumo de carnes, laticínios, vegetais, causando colite hemorrágica (WHO, 2018b; CDC, 2019). A dose infecciosa de EHEC O157: H7 é muito baixa, estima-se que cerca de 100 bactérias sejam capazes de desencadear a doença (FDA, 2012), e os sinais clínicos aparecem 3 a 8 dias após a ingestão, os quais incluem dor abdominal severa, diarreia sanguinolenta, com ou sem febre e vômito, podendo surgir complicações fatais, tais como a síndrome hemolítica-urêmica (SHU), principalmente em crianças e idosos (WHO, 2018b).

2.1.5 *Salmonella* Enteritidis

Entre os patógenos veiculados por alimentos, a *Salmonella* é um dos principais, causando infecção de curta duração, baixa gravidade e mortalidade (WHO, 2018c). As espécies do gênero *Salmonella* são Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, e habitam naturalmente o trato gastrointestinal de animais, incluindo o homem, sendo as fezes consideradas as principais fontes de contaminação da água e dos alimentos (ANDINO; HANNING, 2015). O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, a *Salmonella enterica* e a *Salmonella bongori*, onde *S. enterica* é a mais relevante de ponto de vista de saúde pública. Essa espécie compreende 6 subespécies, onde a *S. enterica* subsp. *enterica* é a mais estudada, sendo composta por 1531 sorotipos (LAMAS et al., 2018). Dos diversos sorotipos de *S. enterica* subsp. *enterica*, o sorotipo *Salmonella* Enteritidis é o mais isolado em casos de salmonelose (EFSA; ECDC - *European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control* – 2018; HUGAS; BELOEIL, 2014). Esses surtos estão geralmente associados ao consumo de aves, ovos e produtos a base destes (EFSA; ECDC, 2018; CDC, 2019). Acredita-se que menos de 1000 células possam causar doença (TORTORA BERDELL R; CASE, 2012) e os sinais clínicos surgem 6 a 72 horas após a infecção (WHO, 2018c).

2.1.6 *Aeromonas hydrophila*

A *Aeromonas* é um gênero de bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, capazes de causar doenças em animais de sangue quente e frio. Com base nas propriedades fisiológicas e o tipo de hospedeiro, o gênero é dividido em dois grupos, o de espécies móveis, cuja temperatura ótima de crescimento está entre 35 a 37 °C, sendo o grupo considerado patogênico para humanos, e o outro, de espécies não móveis e crescem melhor entre 22 a 28 °C (IGBINOSA et al., 2012). Das espécies de *Aeromonas* patogênicas para o homem, a *A. hydrophila* é a mais frequente, e têm sido implicadas em surtos de DTA, onde é considerado um agente emergente, e tem despertado interesse por crescer em temperatura de refrigeração, e já foi isolada de diversos alimentos, bem como no ambiente aquático (DASKALOV, 2006; RODRIGUEZ-MORALES; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, 2014). A aeromoniose causada pela *A. hydrophila* normalmente está associada a ingestão de água e ao consumo de peixes contaminados, com dose infecciosa alta, estando acima de 10⁶ UFC (DASKALOV, 2006), podendo se manifestar entre 20 e 34 horas após a ingestão (RODRIGUEZ-MORALES; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, 2014).

2.1.7 *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são aeróbicas, Gram-negativas, de distribuição ubíqua, sendo encontradas em produtos de origem vegetal, animal e água (BENIE et al., 2017; SCHROTH et al., 2018). *Pseudomonas* foram encontradas como os deteriorantes psicrotróficos mais frequentes em alimentos refrigerados no estudo realizado por Zhang et al. (2019), e por se multiplicar em baixas temperaturas (psicrotróficos), e estarem amplamente difundidas no meio ambiente, estão implicadas na degradação de diversos produtos que incluem carnes, vegetais e leite (RAPOSO et al., 2017; ZHANG et al., 2019). A deterioração veiculada por essas bactérias resulta de produção de enzimas líticas (lipases e proteases) e pigmentos, que provocam alterações indesejáveis na textura, odor e cor do alimento (CALDERA et al., 2016; RAPOSO et al., 2017). Embora as *Pseudomonas* em alimentos sejam frequentemente associadas a deterioração, certas espécies são consideradas patógenos oportunistas, sendo a *P. aeruginosa* a mais comum (LOVEDAY et al., 2014). E estes geralmente acometem mais pacientes imunocomprometidos e debilitados, sendo a água a principal fonte, devido a capacidade da bactéria de formar biofilmes em sistemas hídricos que permitem a sua persistência por longos períodos, ocorrendo em simultâneo a produção de toxinas (LOVEDAY et al., 2014; BENIE et al., 2017). Além de ser patogênica, a *P. aeruginosa* pode ser importante na conservação de alimentos, pois certas cepas desta espécie são produtoras de bacteriocinas (REDERO et al., 2018).

2.1.8 *Erwinia psidii*

A *Erwinia psidii* é um patógeno reconhecido no Brasil, como causadora de doença em goiabeira (*Psidium guajava* L.) (MARQUES et al., 2007; RODRIGUES NETO et al. 1987), embora recentemente tenha sido relatada em papaveira na Malásia (*Carica papaya* L.) (CHAI et al., 2017), e em eucalipto (*Eucalyptus* spp.) no Brasil (ARRIEL et al., 2014) na Argentina e Uruguai (COUTINHO et al., 2011). A importância dessa bactéria, está relacionada com as perdas provocadas nas culturas de goiabeiras, devido aos danos causados na planta, sendo caracterizadas por secagem dos ramos e brotos, amolecimento das folhas, necrose e mumificação de flores e frutos imaturos (MARQUES et al., 2007; RODRIGUES NETO et al. 1987).

2.1.9 Leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*)

As leveduras são micro-organismo que podem ser isoladas em diversos locais na natureza, tais como no ambiente aquático, solo, ar, plantas, animais, sendo as plantas o seu principal habitat (AZHAR et al., 2017), estimando-se que existem mais de 2500 espécies. Em alimentos, devido ao seu metabolismo, as leveduras são úteis na produção de bebidas alcoólicas, produtos de panificação, laticínios, entre outros, e são importantes agentes deteriorantes. *S. cerevisiae* é uma das principais leveduras utilizadas na produção de alimentos, sendo algumas das aplicações na produção de pão, vinho, cerveja, onde atuam como agentes de fermentação, além de produzir ácidos e compostos voláteis que contribuem no sabor e aroma do produto (COPETTI, 2019). Outro aspecto importante é que algumas cepas de *S. cerevisiae* isoladas de alimentos produzem compostos com atividade antioxidante (RAI et al., 2016), probiótica e hipocolesterolêmica (SAIKIA et al., 2018), o que pode agregar *status* de alimento funcional ao produto. *S. cerevisiae*, não é apenas importante na produção de novos alimentos, quando presente como contaminante, pode crescer e produzir compostos como enxofre, CO₂, etanol, aldeídos, que alteraram o sabor e o aroma do produto, tornando deteriorado (HOWELL, 2016). Em relação a saúde pública, as doenças causadas pelas leveduras geralmente não são veiculadas por alimentos (HOWELL, 2016), no entanto, podem ser isoladas em alimentos algumas leveduras patogênicas como é o caso de *C. krusei* e *C. parapsilosis* (RAJKOWSKA; KUNICKA-STYCZYŃSKA, 2018), mas os surtos relacionados a estes micro-organismos não são de origem alimentar, sendo frequentemente adquiridas em ambiente hospitalar (KVASNICKOVA et al., 2015).

2.2 ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Anteriormente, conforme descrito anteriormente, os micro-organismos se encontram amplamente distribuídos no meio ambiente, podendo facilmente contaminar os alimentos tanto de origem vegetal, animal, incluindo água. A presença de micro-organismos responsáveis pela deterioração e doenças é indesejável, por reduzir a vida de prateleira do alimento e colocar em risco a saúde, respectivamente. Para prolongar a vida útil, e alcançar a segurança microbiológica dos alimentos, vários métodos de conservação são empregados, dentre estes a pasteurização e o uso de

aditivos antimicrobianos. A pasteurização é um processo térmico, que causa a redução das células microbianas presentes nos alimentos (MEUNIER-GODDIK; SANDRA, 2016). Sendo uma das suas principais aplicações na conservação do leite, onde é considerada o principal método (MELINI et al., 2017; SADIQ; FLINT; HE, 2018). No entanto, nos últimos anos tem se verificado aumento no número de consumidores em busca de leite não pasteurizado, acreditando que este seja mais saudável. Essa tendência coloca em risco a saúde, pois este produto pode conter micro-organismos patogênicos (ALEGBELEYE et al., 2018; MELINI et al., 2017), e apesar da pasteurização ser associado a perda de nutrientes do leite por envolver temperaturas ligeiramente altas, essas perdas são consideradas insignificantes (MELINI et al., 2017; MEUNIER-GODDIK; SANDRA, 2016). Por outro lado, os aditivos antimicrobianos são substâncias de origem natural ou sintética, adicionadas intencionalmente no alimento, capazes de inibir o crescimento ou causar a destruição de micro-organismos (DAVIDSON; BRANEN, 2005; NAIR et al., 2017). Atualmente, a maioria dos antimicrobianos aplicados em alimentos são de origem sintética (DAVIDSON; BRANEN, 2005), e nos últimos anos tem se observado um interesse crescente por antimicrobianos naturais, como resultado do aumento da demanda do consumidor por alimentos orgânicos (PISOSCHI et al., 2018). Nesse cenário, os antimicrobianos naturais, que podem ser extraídos dos animais, plantas, bactérias, fungos e algas, podem ser considerados formas de conservação alternativa a pasteurização e aos antimicrobianos sintéticos, atendendo assim as exigências do consumidor (PISOSCHI et al., 2018).

As plantas são organismo que habitam o ambiente aquático e terrestre, estando expostas a estresses abióticos (umidade, luz, composição do solo, salinidade) e bióticos (herbívoros, bactérias, fungos). As plantas são capazes de sobreviver aos diversos estresses, por meio de produção de vários compostos químicos através do seu metabolismo secundário. O metabolismo secundário desempenha um papel reconhecido na interação da planta com o meio ambiente, sendo seus metabolitos responsáveis pela proteção da planta contra herbívoros, agentes causadores de doenças (exemplo: bactérias, fungos, parasitas), condições climáticas desfavoráveis, e para atração de animais de polinização e de dispersão de sementes (ZAYNAB et al., 2018). Estima-se que as plantas produzam mais de 100.000 metabólitos secundários (ZAYNAB et al., 2018), e estes compostos pertencem maioritariamente aos grupos dos terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (LEWINSOHN; GIJZEN, 2009; ANULIKA et al., 2016). Os metabólitos secundários

estão presentes em toda planta, podendo ser extraídos das folhas, flores, caule, frutos, sementes, frutas, raízes, entre outros órgãos da planta. Seus óleos essenciais e extratos, possuem diversas propriedades dentre elas, a antimicrobiana. A propriedade antimicrobiana das plantas resulta da capacidade que elas possuem de sintetizar vários compostos como parte de defesa contra micro-organismos (ZAYNAB et al., 2018).

2.2.1 *Baccharis dracunculifolia* DC

O *Baccharis dracunculifolia* DC, popularmente conhecido como Alecrim-do-campo, Alecrim-de-vassoura, Vassourinha (Figura 1), é um arbusto de 2 m a 3 m de altura, nativo do Brasil (BARROSO, 1976), Argentina, Uruguai, Paraguai, e Bolívia, com capacidade de crescer naturalmente no meio ambiente, sendo caracterizada por ser invasora e colonizadora de áreas de pastagens (GOMES, FERNANDES, 2002).

Figura 1 - *Baccharis dracunculifolia* DC (Alecrim-do-campo)



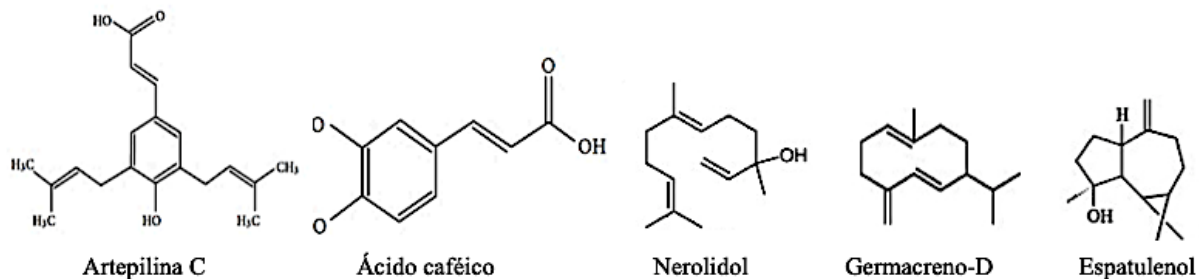
Fonte: Instituto de Biociência-Universidade de São Paulo.

No Brasil, as folhas do *B. dracunculifolia* DC geralmente são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças gastrointestinais, hepáticas, como anti-inflamatório (SALAZAR et al., 2018), e já se reconheceu, que é por meio da coleta de resina desta planta pelas abelhas *Apis mellifera* que elas produzem a própolis verde (DE ALENCAR et al., 2005). A própolis verde é um composto bastante conhecido devido as suas inúmeras propriedades, dentre elas, a ação antibacteriana (VEIGA et al., 2017), antifúngica e antioxidante (DE FRANCISCO et al., 2018) podem ser importantes na bioconservação. Por ser uma planta culturalmente utilizada para fins terapêuticos, o *B. dracunculifolia* DC tem sido objeto de alguns estudos a fim de verificar essas

propriedades. Buscando-se na literatura, comprovou-se cientificamente que a planta tem ação antifúngica, antibacteriana (CAZELLA et al., 2019), antiparasitária (DE ASSIS LAGE et al., 2015), antiviral (BÚFALO et al., 2009), antiúlceras (MASSIGNANI et al., 2009), anti-inflamatório (FIGUEIREDO-RINHEL et al., 2017) e analgésica (DOS SANTOS et al., 2010).

A atividade antimicrobiana dos diferentes extratos e óleo essencial do *B. dracunculifolia* DC podem estar relacionadas a diversos constituintes. Os principais compostos químicos desta planta, assim como das outras pertencentes ao gênero *Baccharis*, pertencem aos grupos dos compostos fenólicos e terpenos (CAMPOS et al., 2016). Entretanto, a composição dos seus extratos e óleos essenciais como de qualquer outra planta, varia em termos quantitativos e qualitativos entre idade da planta, parte da planta, localização geográfica, composição química do solo, disponibilidade de água, variações na temperatura, exposição a luz solar, bactérias, vírus, fungos ou parasitas (VERMA; SHUKLA, 2015), método de extração (AZMIR et al., 2013), e condições de armazenamento (KHAYYAT; SELVA ROSELIN, 2018). Os extratos hidroalcoólicos de partes aéreas de *B. dracunculifolia* DC colhidos no território brasileiro, são constituídos essencialmente por compostos fenólicos, mencionando-se a artepilina C, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, aromadendrina-4-metil éter, baccharina, drupanina, isosakuranetina, 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (BÚFALO et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2010; LEMOS et al., 2007), onde o composto majoritário é a artepilina C (DOS SANTOS et al., 2010) ou ácido caféico (BÚFALO et al., 2009; LEMOS et al., 2007). Por outro lado, os seus óleos essenciais são compostos basicamente por terpenos, sendo os três principais constituintes achados por Cazella et al. (2019) o espatulenol (27%), nerolidol (23%) e β -Pinene (5.41%); por Salazar et al., (2018), o Germacreno D (18.4%), Nerolidol (14.0%) e Mustacone (11.2%); e por de Assis Lage et al. (2015) nerolidol (22.3%), germacreno D (7.2%), limoneno (6.9%). Assim sendo, o componente majoritário dos óleos essenciais do *B. dracunculifolia* DC brasileiro é o espatulenol, por vezes o germacreno D, ou nerolidol. As estruturas dos constituintes majoritários dos extratos hidroalcoólicos e óleos essenciais de partes aéreas do *B. dracunculifolia* DC, colhidos no território brasileiro encontram-se representadas na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química de compostos majoritários presentes no extrato hidroalcoólico ou no óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC (Alecrim-do-campo)



Fonte: adaptada de CESTARI; BASTOS; DI STASI, 2011; MORAIS, CASTANHA, 2011; DE ASSIS LAGE et al., 2015.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC já foi avaliada frente a bactérias e fungos de importância clínica e contra deteriorantes e patógenos de origem alimentar. Com o objetivo de avaliar a atividade do óleo essencial do *B. dracunculifolia* DC no período de floração, Cazella et al. (2019), testaram a ação desse óleo contra 8 espécies de bactérias (*B. cereus*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Micrococcus flavus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *S. aureus*), e 8 espécies de fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, *Penicillium verrucosum*, *Trichoderma viride*), através do método de microdiluição, e verificaram que as bactérias foram sensíveis nas concentrações entre 0,50 mg/mL e 12,65 mg/mL, e os fungos nas concentrações entre 12,65 mg/mL e 16,87 mg/mL. Outro estudo foi conduzido por Salazar et al. (2018), onde avaliaram atividade do óleo essencial do *B. dracunculifolia* DC e antibióticos (Gentamicina, Norfloxacina e Ampicilina) individualmente e combinados, contra isolados clínicos de *E. coli*, *S. aureus*, e *P. aeruginosa*, e culturas ATCC de *E. coli* ATCC 2592, *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, através do método de microdiluição, onde as concentrações do óleo avaliadas variaram de 1024 µg/mL a 0,5 µg/mL. Nessas concentrações, não foram sensíveis as duas cepas de *E. coli*, e *P. aeruginosa* ATCC 9027. Em relação ao efeito sinérgico, foi observado quando o óleo essencial do *B. dracunculifolia* DC foi associado a cada um dos três antibióticos. Outros estudos realizados com este óleo, demonstraram o efeito antimicrobiano frente a 51 linhagens de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*,

e *C. glabrata*, nas concentrações entre 0,2 mg/mL e 6,25 mg/mL (PEREIRA et al., 2011), e a inibição do *Streptococcus mutans* na sua condição planctônica e em biofilme (PEREIRA et al., 2016).

Informações sobre atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* DC disponível na literatura, quando comparado ao óleo essencial desta planta, foram relatados para um número reduzido de micro-organismos. VEIGA et al., 2017 estudaram a atividade antibacteriana de extratos etanólico e hexânico do *B. dracunculifolia* DC, Artepillin C, e própolis verde, frente a 40 linhagens de *S. aureus*, sendo algumas cepas sensíveis e outras resistentes à metilicina, pelo método de microdiluição. Esses autores verificaram que todas as 40 cepas de *S. aureus* foram sensíveis a ambos extratos, nas concentrações entre 256,7 µg/mL e 770,1 µg/mL para o extrato etanólico, e de 197,0 µg/mL a 394,0 µg/mL para o hexânico. A atividade antimicrobiana também foi demonstrada por de Abreu e Onofre (2010), ao avaliarem a atividade de extrato hidroalcoólico dividido em duas frações, uma polar e outra apolar contra *E. coli* e *S. aureus*. O extrato polar inibiu as duas bactérias nas concentrações de 25 % e 6,25 %, respectivamente, em contrapartida o apolar somente inibiu o *S. aureus*, na concentração de 25 %. Duarte et al. (2004) demonstraram ação do extrato contra *Streptococcus faecium* e *S. aureus* nas concentrações de 0,5 mg/mL e 1,6 mg/mL, respectivamente.

Conforme as diversas pesquisas, pode se observar que tanto o óleo do *B. dracunculifolia* DC constituído principalmente por terpenos, assim como os extratos composto maioritariamente por compostos fenólicos, possuem atividade antimicrobiana. Nesse sentido, a planta pode ser considerada uma potencial fonte de antimicrobiano natural para indústria de alimentos, contudo, a aplicação dos seus óleos ou extratos em alimentos enfrenta algumas limitações. Os compostos fenólicos são instáveis a diversos fatores ambientais, podendo sofrer decomposição quando submetidas a altas temperaturas (CHENG et al., 2014), e ocorrer reações de oxidação induzidas pela luz, peróxidos, calor, alta umidade, pH alcalino (ALNAIZY; AKGERMAN, 2000; FRIEDMAN; JÜRGENS, 2000). Além da instabilidade, sabe-se que alguns fenóis possuem sabores adstringentes, os quais podem ser indesejáveis em alimentos. Por outro lado, os terpenos, tal como os compostos fenólicos, são vulneráveis as reações de oxidação induzidas pela luz, oxigênio, altas temperaturas, peróxidos (KHAYYAT; SELVA ROSELIN, 2018; LIBRANDO; TRINGALI, 2005; WEERAWATANAKORN et al., 2015), e alguns dos

produtos de oxidação possuem odores desagradáveis (WEERAWATANAKORN et al., 2015). Além da oxidação, os terpenos sofrem isomerização na presença de luz (KHAYYAT; SELVA ROSELIN, 2018) e são compostos voláteis, hidrofóbicos (REDDY; COUVREUR, 2009). Ademais da degradação, hidrofobicidade, volatilidade, e sabores desagradáveis, sabe-se que a matriz alimentar é muito complexa, já que é constituída por carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas, entre outros compostos, os quais podem reagir com os compostos fenólicos, assim como terpenos, e reduzir sua sua biodisponibilidade, fazendo com que sejam necessárias maiores quantidades para se observar o efeito antimicrobiano. Isso pode aumentar os efeitos organolépticos indesejáveis, além de aumento dos custos de produção. O uso combinado de antimicrobianos naturais provenientes de plantas e bactérias, e nanoencapsulação, podem ser estratégias para superar estes problemas.

2.2.2 Peptídeos Antimicrobianos - Nisina

Em alimentos, a aplicação das bactérias Ácido lácticas (BAL), não se limita apenas no desenvolvimento de produtos fermentados, elas também desempenham um papel significativo na conservação de alimentos devido ao seu efeito antimicrobiano que resulta da competição por nutrientes, e capacidade de produzir diversas substâncias antimicrobianas, como os peptídeos antimicrobianos, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, diacetil, etanol, entre outras (SIEDLER; BALTI; NEVES, 2019). Os peptídeos antimicrobianos são substâncias naturais sintetizados por plantas, micro-organismos e animais, e constituem a primeira defesa dos seres vivos contra patógenos (CHIKINDAS et al., 2018; KOEHBACH; CRAIK, 2019; MARÓTI, 2011; PAPAGIANNI, 2003). Os peptídeos antimicrobianos bacterianos, conforme a sua origem, são agrupados em 2 classes: os de síntese ribossômica (bacteriocinas), e os de síntese não ribossômica (CHIKINDAS et al., 2018).

As bacteriocinas são peptídeos sintetizados ao nível dos ribossomos por certas linhagens de bactérias, que possuem atividade antimicrobiana, geralmente contra espécies relacionadas (FIELD; ROSS; HILL, 2018; WORAPRAYOTE et al., 2016). Tanto as bactérias Gram-positivas, assim como as Gram-negativas podem produzir bacteriocinas, no entanto, as produzidas por BAL tem

recebido maior atenção na indústria de alimentos por serem produzidas por bactérias normalmente adicionadas nos alimentos e consideradas GRAS. Além disso, as BAL apresentam atividade em concentrações nanomolares, não alterarem as propriedades organolépticas, por se tratar de substâncias inodoras, incolores, e insípidas (EGAN et al., 2016; FIELD; ROSS; HILL, 2018; WORAPRAYOTE et al., 2016), e quando ingeridas não causam danos à saúde uma vez que são degradadas pela ação de proteases digestivas tais como tripsina e quimotripsina (EGAN et al., 2016). Dentre as diversas bacteriocinas identificadas até então, as únicas comercializadas parcialmente purificadas são a nisina produzida por *Lactococcus lactis* (exemplo Nisaplin™), a pediocina PA-1 produzida por *Pediococcus acidilactici* (exemplo ALTA™ 2341) e a carnociclina A produzida por *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 (Micocin) (FIELD, ROSS, HILL, 2018). Entre as bacteriocinas comercializadas, a nisina é a única usada como aditivo alimentar em mais de 50 países (PISOSCHI et al., 2018).

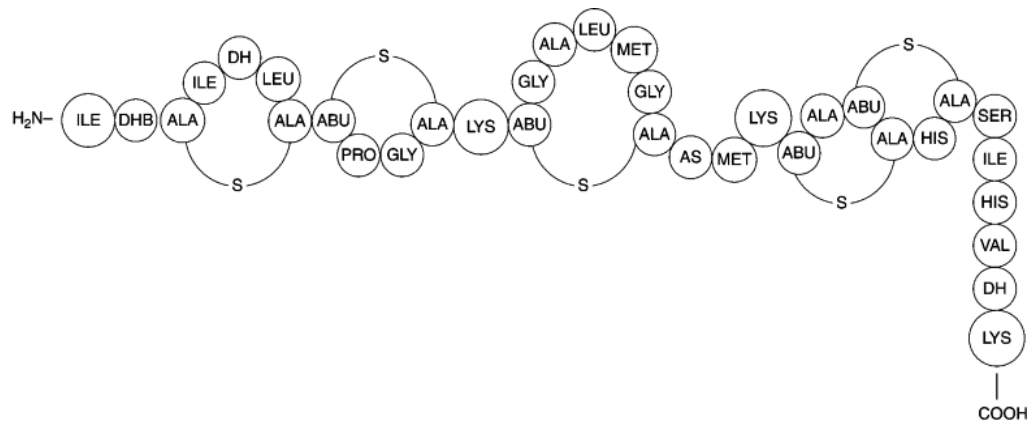
A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, através da fermentação (FAO/ WHO, 2013). A nisina é considerada GRAS, tendo-lhe atribuído esse *status* pela Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) em 1969, e é identificada no Sistema Internacional de Numeração (INS) de aditivos alimentares com o número 234 (MÜLLER-AUFFERMANN et al., 2015). Atualmente, a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de nisina é de até 2 mg/kg de peso corpóreo (FAO/ WHO, 2013). A quantidade máxima a ser aplicada no alimento varia conforme o regulamento interno de cada país, sendo no Brasil de 12,5 mg/kg para queijo pasteurizado (BRASIL, 1996) e 0,0025/100 g para carnes e produtos cárneos (exceto: salsicha tipo Frankfurt) (BRASIL, 2019b), existindo alguns países onde o seu uso é permitido, mas o limite máximo não foi estabelecido, como é o caso da França e Austrália (DE ARAUZ et al., 2009).

A nisina foi descoberta em 1928, quando cepas de *Streptococcus lactis* (posteriormente reclassificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) inibiram o crescimento de outras BAL (CHEN; HOOVER, 2003). Desde a identificação e caracterização da primeira variante de nisina, a nisina A, outras variantes naturais de nisina foram descobertas e caracterizadas, sendo as outras nisininas a Z, F, Q, P, U, U2 e H, existindo atualmente 8 variantes. As variantes A, Z, F e Q são produzidas por cepas de *Lactococcus lactis*, enquanto a U, U2, P e H por *Streptococcus* (O'CONNOR et al., 2015; SHIN et al., 2016; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2018). Além de não serem produzidas pela mesma cepa, as variantes de nisina foram isoladas de ambientes diferentes

que incluem água, laticínios e animais; e apresentam algumas diferenças na estrutura química (O'CONNOR et al., 2015; SHIN et al., 2016). De todas variantes, somente a nisina A, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, é reconhecida como GRAS, sendo geralmente comercializada na concentração de 2,5% (FAO/ WHO, 2013), é a nisina mais ativa, e a mais frequentemente estudada (CHEN; HOOVER, 2003; MÜLLER-AUFFERMANN et al., 2015; O'CONNOR et al., 2015).

A nisina é um polipeptídeo lantibiótico produzido durante a fase exponencial da multiplicação da bactéria (ALVAREZ-SIEIRO et al., 2016; DE ARAUZ et al., 2009; MÜLLER-AUFFERMANN et al., 2015). Na classificação das bacteriocinas produzidas por BAL proposta por Alvarez-Sieiro et al. (2016), pertencem ao grupo dos lantibióticos, os peptídeos antimicrobianos cuja massa molecular é inferior a 10 kDa, e que sofrem modificação pós-traducional, resultando na formação de aminoácidos incomuns, exemplo a lantionina. A nisina A (Figura 3), é um peptídeo pentacíclico, com massa molecular de 3,35 kDa, composto por 34 aminoácidos, contendo na sua estrutura a lantionina no primeiro anel, e β -metil-lantionina nos anéis remanescentes (MÜLLER-AUFFERMANN et al., 2015; WILLIAMS; DELVES-BROUGHTON, 2003). A nisina Z, é a variante que mais se assemelha a nisina A, sendo a única diferença na estrutura, o aminoácido 27, onde na nisina A é histidina enquanto na nisina Z é asparagina (CHEN; HOOVER, 2003; O'CONNOR et al., 2015; SHIN et al., 2016). Esta diferença não interfere na atividade antimicrobiana, mas confere a nisina Z maior solubilidade e difusão em pH mais elevados, em relação a nisina A (DE ARAUZ et al., 2009; FIELD; ROSS; HILL, 2018; PAPAGIANNI, 2003).

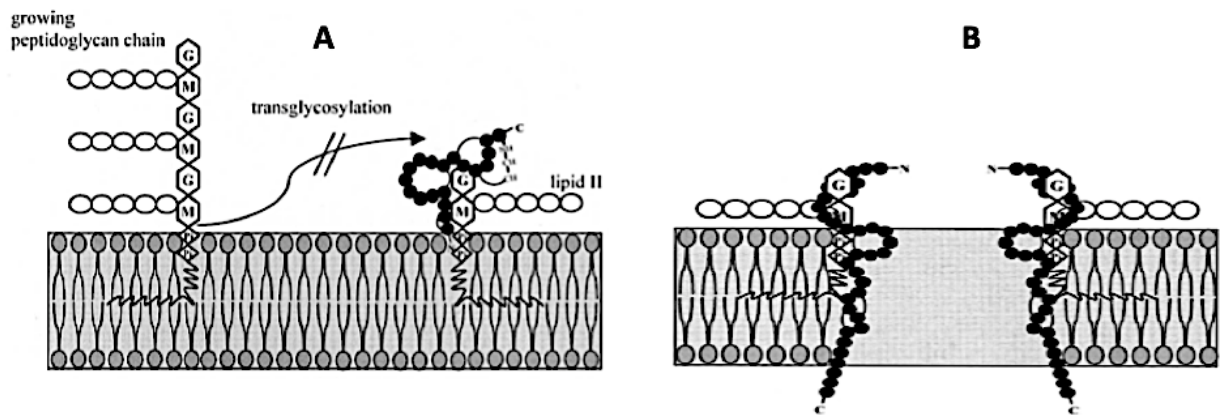
Figura 3 - Estrutura química da nisina A



Fonte: WILLIAMS; DELVES-BROUGHTON, 2003

A Nisina A, normalmente é ativa contra bactérias Gram-positivas não formadoras e formadoras de esporos (CHEN; HOOVER, 2003). A ação antimicrobiana da nisina nas células vegetativas, resulta da interferência com o funcionamento normal da parede celular. Esta ação inicia com a ligação da nisina ao precursor do peptidoglicano, o lipídeo II, ocorrendo em simultâneo a inibição da síntese da parede celular (Figura 4 A), em seguida, a nisina ancorada ao lipídeo II se insere na membrana citoplasmática formando poros, que causarão perda dos constituintes celulares tais como aminoácidos, potássio, ATP, entre outros solutos, originando assim a morte da bactéria (Figura 4 B) (HÉCHARD; SAHL, 2002; MÜLLER-AUFFERMANN et al., 2015; WIEDEMANN et al., 2006; WILLIAMS; DELVES-BROUGHTON, 2003). As bactérias Gram-negativas normalmente não são sensíveis a nisina, devido a estrutura da sua parede celular ser mais complexa em relação as Gram-positivas, apresentando uma camada externa que serve de barreira para nisina. Em relação aos esporos, a ação da nisina é esporostática, e acredita-se que esta resulta da ligação da nisina aos grupos sulfidrilas dos esporos, que causarão inibição de formação de células vegetativas (WILLIAMS; DELVES-BROUGHTON, 2003).

Figura 4 - Mecanismo de ação da nisina sobre células vegetativas



Fonte: adaptada de HÉCHARD; SAHL, 2002

Na indústria de alimentos, a nisina é aplicada em diversos produtos os quais incluem lácteos, carnes, peixes, produtos de panificação, saladas, bebidas, vegetais enlatados, entre outros (DE ARAUZ et al., 2009; MÜLLER-AUFFERMANN et al., 2015; WILLIAMS; DELVES-BROUGHTON, 2003;), sendo geralmente usada para o controle de crescimento de BAL, e de bactérias patogênicas formadoras e não formadoras de esporos como a *Listeria*, *Bacillus* e *Clostridium* (WILLIAMS; DELVES-BROUGHTON, 2003). O efeito sinérgico entre a nisina e antimicrobianos isolados de plantas está documentado, utilizando meio de cultura bem como modelos alimentares, e os resultados revelam que o uso combinado destes antimicrobianos não apenas potencializa a atividade, por reduzir a dose necessária para se observar o efeito desejado, mas também demonstram ampliar o espectro de ação verificando-se a sensibilidade das bactérias geralmente não sensíveis a um dos antimicrobianos utilizados na combinação, como exemplo a sensibilidade de *E. coli* O157:H7 ATCC 10536 a nisina (SHAHBAZI, 2015).

O efeito sinérgico entre a nisina com antimicrobianos extraídos de plantas, foi reportado por Pinilla e Brandelli (2016) ao avaliar atividade antimicrobiana do extrato de alho quando combinado com a nisina na forma livre ou nanoencapsulada. Essa atividade foi testada através da curva de crescimento em leite contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* Enteritidis e *E. coli*, a 37 °C por 24 h, e somente contra *L. monocytogenes* a 7 °C por 25 dias. A 37 °C os antimicrobianos combinados livres ou encapsulados tiveram efeito sinérgico diminuindo as contagens bacterianas para até 6 log UFC/ml para *L. monocytogenes*, 5 log UFC/mL para *S. aureus* e 3 a 4 log UFC/mL para *S. Enteritidis* e *E. coli* após 10 h. Apresentando uma diferença de 1 a 4 log UFC/mL em

relação aos antimicrobianos individuais. A 7 °C, também foi observaram sinergismos, tendo os antimicrobianos associados reduzido 4 a 5 log UFC/mL em relação aos controles.

O estudo de Solomakos et al. (2008), foi realizado com propósito de avaliar o efeito sinérgico entre a nisina e óleo essencial de tomilho, em caldo Caldo Soja Trypticaseína (TSB) e em carne bovina, contra *L. monocytogenes*. No meio sintético a avaliação do sinergismo foi realizada na temperatura de 37 °C por 32 h, e em carne a 4 °C e 10 °C por 12 dias. O resultado demonstraram que a associação desses antimicrobianos resulta numa maior atividade, quando comparada a individual, tendo inibido mais o crescimento dos micro-organismos, por prolongar mais a fase lag.

O efeito sinérgico entre a nisina e antimicrobianos oriundos de plantas, também foram reportados por Abdollahzadeh; Rezaei; Hosseini (2014), que verificaram o sinergismos entre o óleo essencial de tomilho e da nisina contra *L. monocytogenes* em peixe. Por Govaris et al. (2010), entre o óleo essencial de orégano, e nisina contra *Salmonella* Enteritidis em carne ovina mantida na temperatura de 4 °C e 10 °C por 12 dias. Por Field et al. (2017), entre nisina e cinamaldeído contra cepas de *E. coli* em meio de cultura.

2.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

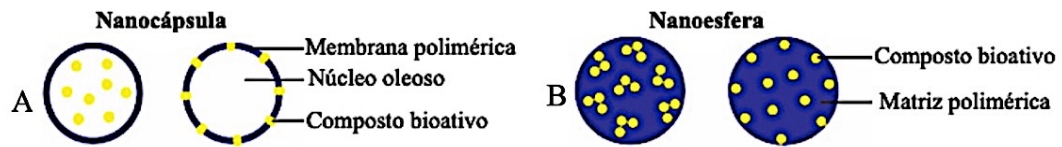
Algumas das estratégias propostas atualmente por vários pesquisadores em diversas partes do mundo para melhorar a aplicação de alguns antimicrobianos extraídos de plantas em alimentos é a nanotecnologia (PRAKASH et al., 2018). A nanotecnologia é definida como sendo a caracterização, fabricação e manipulação de materiais na escala nanométrica (WEISS; TAKHISTOV; MCCLEMENTS, 2006; BRANDELLI; LOPES; BOELTER, 2017). Segundo os dados disponíveis na *Nanotechnology Products Database* (NPD), hoje em dia a nanotecnologia é aplicada em diversos campos incluindo as indústrias farmacêutica, cosmética, eletrônica, têxtil, e de alimentos, sendo a aplicação no setor de alimentos menor em relação aos outros. Na indústria de alimentos, a nanotecnologia pode ser empregada em toda a cadeia, desde produção, processamento, embalagens até no armazenamento (GALLOCCCHIO; BELLUCO; RICCI, 2015). E uma das potenciais aplicações dessa tecnologia é na conservação, desenvolvendo nanoestruturas

contendo antimicrobianos para garantir a segurança e prolongar a vida útil do produto, podendo essas nanoestruturas ser obtidas por vários processos, incluindo a nanoencapsulação (BRANDELLI; LOPES; BOELTER, 2017).

A nanoencapsulação é o processo que consiste no aprisionamento de substâncias ativas em materiais de parede (FATHI; MARTÍN; MCCLEMENTS, 2014) na escala de 1 nm a 1.000 nm (BRANDELLI; LOPES; BOELTER, 2017). Este processo tem despertado bastante interesse no setor de alimentos devido às diversas vantagens que proporciona ao material encapsulado. Por se tratar de substâncias na escala nanométrica, há aumento na atividade por apresentar maior superfície de contato, além das outras propriedades adquiridas pelo fato do material estar encapsulado, dentre estas (I) melhorar a estabilidade e biodisponibilidade por proteger o material de condições ambientais desfavoráveis (umidade, temperatura, pH), evitar evaporação de substâncias voláteis, e evitar interações entre o ativo e componentes da matriz alimentar que podem levar a inativação; (II) controlar a liberação do material ativo, permitindo a disponibilidade do ativo por período de tempo prolongado e/ou fazer a liberação em condições específicas; (III) mascarar sabores e odores desagradáveis; (IV) melhorar a solubilidade, permitindo a mistura de substâncias naturalmente imiscíveis (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016; WEISS; TAKHISTOV; MCCLEMENTS, 2006).

O processo de nanoencapsulação permite obter diversas estruturas do tamanho nano, dependendo do método e material empregado para encapsular. Essas nanoestruturas podem ser nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas metálicas entre outras (PINTO REIS et al., 2006; BRANDELLI; LOPES; BOELTER, 2017). As nanopartículas poliméricas, que são as nanoestruturas desenvolvidas neste trabalho, são partículas coloidais, e conforme o método de preparação podem-se apresentar como nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas (Figura 5A) são caracterizadas por serem vesículas, contendo núcleo oleoso ou aquoso, circunscrito por material de parede, neste caso o ativo pode estar no núcleo ou adsorvida na parede polimérica, ao contrário das nanocápsulas, as nanoesferas (Figura 5B) são sistemas matriciais sólidas que não apresentam núcleo, podendo o ativo estar disperso na matriz polimérica ou adsorvido na parede (BRANDELLI; LOPES; BOELTER, 2017; EL-SAY; EL-SAW, 2017).

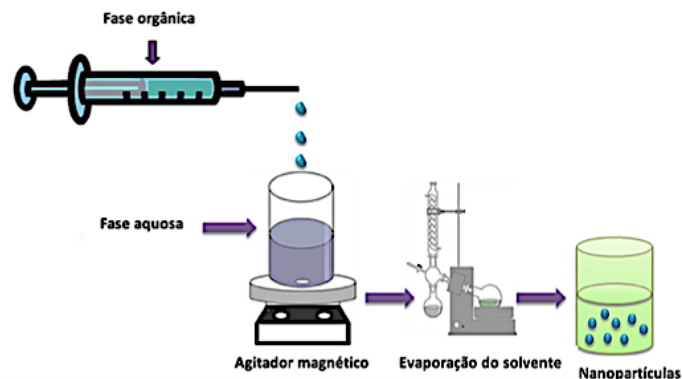
Figura 5 - Estrutura de nanocápsula (A) e nanoesfera (B)



Fonte: BRANDELLI, LOPES, BOELTER, 2017.

As nanopartículas poliméricas podem ser desenvolvidas a partir de vários métodos, os quais são agrupados em duas categorias, que são a polimerização de monômeros e a precipitação de polímeros pré-formados (CRUCHO; BARROS, 2017; PINTO REIS et al., 2006). Tratando-se da precipitação de polímeros pré-formados, um dos métodos mais aplicados devido a facilidade de execução, é o método de nanoprecipitação também conhecido como método de deslocamento do solvente ou deposição interfacial do polímero pré-formado (Figura 6), desenvolvido por Fessi et al., em 1989 (BADRI et al., 2017). Neste método, a síntese das nanopartículas consiste inicialmente em preparar duas fases, uma orgânica e outra aquosa. A fase orgânica pode ser composta pelo polímero, ativo, solvente miscível em água, óleo (opcional), surfactante, enquanto que a fase aquosa é composta por água e surfactante (CRUCHO; BARROS, 2017; PINTO REIS et al., 2006). Após a obtenção das duas fases, geralmente a fase orgânica é adicionada na aquosa, ocorrendo simultaneamente à difusão do solvente na fase aquosa, e as nanopartículas se formam a medida que o polímero tenta evitar a água, e se precipita em forma de nanocápsulas ou nanoesferas, e no final do processo o solvente é eliminado por evaporação para obtenção da suspensão coloidal (CRUCHO; BARROS, 2017). A adição do óleo geralmente induz a formação de nanocápsulas, porque na presença do óleo o polímero deposita-se na interface entre óleo e fase aquosa, ocorrendo espontaneamente a formação das nanocápsulas, e na ausência do óleo formam-se nanoesferas (PINTO REIS et al., 2006; SANTOS et al., 2014). A adição de surfactantes é opcional, sendo apenas úteis para aumentar a estabilidade das suspensões (PINTO REIS et al., 2006).

Figura 6 - Desenvolvimento de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação



Fonte: BADRI et al., 2017

Para a síntese de nanopartículas, atualmente existem diversos polímeros, sendo a albumina, quitosana e caseína alguns exemplos de polímeros naturais, e o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e polimetacrilatos (Eudragit[®]) alguns exemplos de polímeros sintéticos (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018; PINTO REIS et al., 2006). Os polímeros sintéticos quando comparados aos naturais, são mais puros e fáceis de reproduzir (BADRI et al., 2017; PINTO REIS et al., 2006). Um dos aspectos que se deve ter em conta na seleção do polímero, é em relação a sua toxicidade em humanos, para não colocar em risco a saúde.

2.3.1 Eudragit[®] RS 100

Eudragit[®] (nome comercial de um grupo de polímeros derivados do ácido metacrílico), compreende um grupo de polímeros catiônicos e aniônicos obtidos pela polimerização dos ácidos acrílico e metacrílico, ou seus ésteres (KADIAN; HARIKUMAR, 2009). Atualmente, existem diversos tipos Eudragit[®], apresentando solubilidades diferentes, sendo alguns exemplos o E, L, S, FS, RL, RD, RS, NE (KADIAN; HARIKUMAR, 2009; PATRA et al., 2017). Esses polímeros são considerados não tóxicos e não irritantes para saúde, e seu uso foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) em forma de cápsulas ou comprimidos orais (PATRA et al., 2017).

Dentre os diversos tipos de Eudragit[®], o Eudragit[®] RS100 é de particular interesse devido ao tipo de liberação proporcionado. Esse polímero possui superfície porosa permitindo a liberação

do ativo por meio de difusão, além de não ser influenciada por pH (KIM; PARK, 2010; KOLEV et al., 2019). Outra característica desejável é fato de ser catiônico, o que pode permitir a interação entre as nanopartículas carregadas positivamente com a parede celular dos micro-organismos carregada negativamente (FROIIO et al., 2019). O Eudragit[®] RS100 é um polímero granulado, incolor, sintetizado por polimerização de ácido acrílico e ésteres de ácido metacrílico, apresentando na sua estrutura amônio quaternário em forma de sais que torna o polímero permeável a água (PATRA et al., 2017). Este polímero geralmente é usado no revestimento de comprimidos e outras preparações farmacêuticas orais para liberação controlada (KIM, PARK, 2010).

2.3.2 Caracterização das nanopartículas

Após o desenvolvimento é essencial fazer caracterização das nanopartículas sendo o tamanho das nanopartículas, índice de polidispersão (PDI), a eficiência de encapsulação e o potencial zeta alguns dos parâmetros geralmente avaliados (CRUCHO; BARROS, 2017). O tamanho das nanopartículas é essencial por influenciar no comportamento do material. As propriedades de um material na escala nano diferem dos materiais micro ou macro, à medida que o tamanho das partículas diminui, a superfície de contato aumenta, e isso implica maior atividade em relação as partículas maiores (GRANATA et al., 2018). O tamanho médio das nanopartículas poliméricas geralmente está entre 100 nm e 500 nm (BADRI et al., 2017). Já o PDI fornece informação do grau de uniformidade da distribuição do tamanho das partículas, onde valores de PDI inferiores a 0,2 são indicativos de uma distribuição uniforme, e superiores a 0,5, distribuição não uniforme (GRANATA et al., 2018). O parâmetro eficiência de encapsulação, permite estimar quanto material foi encapsulado, considerando-se o método de nanoprecipitação ideal para encapsular substâncias hidrofóbicas, visto que as substâncias hidrofílicas se difundem na fase aquosa durante a formação das nanopartículas, resultando em baixa encapsulação (PINTO REIS et al., 2006; CRUCHO; BARROS, 2017). O potencial zeta é um parâmetro útil para prever a estabilidade da suspensão, sendo este, a diferença de potencial elétrico entre as nanopartículas e o meio líquido onde estão dispersas, e quanto mais afastado do zero for valor do potencial zeta, mais estável será a suspensão, pois as partículas carregadas se repelem evitando a agregação. São consideradas estáveis as suspensões com valores de potencial zeta superiores a + 30 mV e inferiores

a -30 mV (dos SANTOS 2016). As nanopartículas sintetizadas com o Eudragit® RS100 apresentam potencial zeta positivo (SANTOS et al., 2014; FROIHO et al., 2019).

O Eudragit® RS100, tem sido amplamente estudado no desenvolvimento de nanopartículas na área farmacêutica (DALCIN; OURIQUE; GOMES, 2017; PATRA et al., 2017), em contrapartida, menores relatos sobre nanoencapsulação de antimicrobianos isolados de plantas empregando especificamente o método nanoprecipitação utilizando o Eudragit® RS100 como material de parede. SANTOS et al. (2014) desenvolveram nanopartículas de Eudragit® RS100 pelo método de nanoprecipitação, utilizando óleo de coco como núcleo para encapsular clotrimazol, e testaram atividade frente a espécies de cândida. As nanopartículas apresentaram diâmetro médio de 169 nm a 173 nm, PDI entre 0,14 a 0,16, potencial zeta entre 13,3 mV a 14,7 mV, e uma eficiência de encapsulação acima de 99,9%. Essas nanopartículas apresentaram atividade frente as leveduras testadas. Por outro lado, FROIHO et al. (2019) encapsularam óleo essencial de bergamota (*Citrus bergamia*) e óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) pelo método de nanoprecipitação, utilizando Eudragit® RS100 como material encapsulante, e posteriormente testaram a atividade antibacteriana frente a *E. coli*. As nanopartículas apresentaram tamanho médio entre 57 nm a 208 nm, potencial zeta entre 39 mV a 74 mV, e uma eficiência de encapsulação de 28 % a 96 % e as nanopartículas foram ativas contra *E. coli*.

3 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os materiais e métodos utilizados neste trabalho estão apresentados em forma de artigos científicos, juntamente com os resultados, a discussão e conclusões de cada etapa. Os artigos serão submetidos para publicação após a tradução para o inglês.

Artigo 1: Atividade antimicrobiana de metabólitos de *Baccharis dracunculifolia* DC e seu sinergismo com nisina contra bactérias de interesse alimentar.

Artigo 2: Nanopartículas poliméricas carregadas com óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC: produção, caracterização e atividade antibacteriana em leite.

3.1 Artigo 1

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS DE *Baccharis dracunculifolia* DC, E SEU SINERGISMO COM NISINA CONTRA BACTÉRIAS DE INTERESSE ALIMENTAR

RESUMO

Este estudo avaliou a ação antimicrobiana *in vitro* de compostos de *Baccharis dracunculifolia* DC na sua forma individual e combinados com a nisina. Inicialmente foi empregado o teste disco-difusão para avaliar a sensibilidade de 19 cepas de bactérias Gram-positivas, 13 cepas de bactérias Gram-negativas, e 3 cepas de leveduras ao óleo essencial (OE) e ao extrato hidroalcoólico (EH) de *B. dracunculifolia* DC. Neste ensaio, verificou-se efeito antibacteriano, onde as bactérias Gram-positivas foram as mais sensíveis tanto ao OE quanto ao EH da planta. O OE apresentou o maior espectro de ação antimicrobiana por ter inibido 100% das bactérias Gram-positivas testadas. Adicionalmente, testou-se a ação do OE contra misturas de bactérias sensíveis e não sensíveis a este antimicrobiano em ágar leite, tendo se observado efeito inibitório apenas em misturas contendo cepas susceptíveis. Finalmente, avaliou-se o sinergismo entre o OE e a nisina frente à *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, por 24 h a 37 °C, através da curva de crescimento microbiano. Após 24 h de incubação a combinação de OE com nisina mostrou-se eficaz, não tendo se identificado nenhuma colônia na contagem de *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, enquanto para *S. aureus* a contagem foi de 2,81 log UFC/mL, sendo a diferença com os antimicrobianos individuais frente a todas cepas superior a 4 log UFC/mL. Com base no teste de sensibilidade, *B. dracunculifolia* DC pode ser considerada uma potencial fonte de antimicrobianos naturais, e o seu efeito sinérgico com a nisina permitiria reduzir a concentração de uso, minimizando os efeitos organolépticos associados ao uso de antimicrobianos de plantas.

Palavras chave: antimicrobianos naturais, Alecrim-do-campo, óleo essencial, extrato hidroalcoólico, *Baccharis dracunculifolia* DC.

1 INTRODUÇÃO

A presença de micro-organismos nos alimentos tanto de origem vegetal quanto de animal, incluindo água, é de extrema importância na indústria alimentícia. Estima-se que, por ano, 25% dos produtos são degradados por micro-organismos após a colheita ou abate (PETRUZZI et al., 2017). Por outro lado, a ingestão de produtos contendo micro-organismos patogênicos ou suas toxinas podem causar doenças transmitidas por alimentos (DTA) que são de extrema importância do ponto de vista de saúde pública (WHO, 2015). O controle microbiano nos alimentos é uma necessidade, e pode ser realizado pela aplicação de antimicrobianos sintéticos utilizados individualmente ou associados a outros métodos de conservação (PISOSCHI et al., 2018). No entanto, nas últimas décadas tem se observado aumento no número de consumidores em busca de alimentos mais naturais, sendo um dos motivos a preocupação com a saúde (APAOLAZA et al., 2018; DITLEVSEN; SANDØE; LASSEN, 2019; KUSHWAH et al., 2019). Esta crescente demanda incentiva pesquisas sobre antimicrobianos naturais, que podem ser isolados de plantas, para substituir os sintéticos.

Baccharis dracunculifolia DC, popularmente conhecido no Brasil como alecrim-do-campo, alecrim-de-vassoura ou vassoura, é um arbusto de 2 m a 3 m de altura, nativo de alguns países da América, incluindo o Brasil (BARROSO, 1976; GOMES; FERNANDES, 2002), onde é usada empiricamente no tratamento de doenças (KUMAZAWA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007). Entretanto, já foi comprovado que seus metabólitos secundários possuem ação antimicrobiana (CAZELLA et al., 2019; SALAZAR et al., 2018), antiparasitária (DE ASSIS LAGE et al., 2015), anti-inflamatória (FIGUEIREDO-RINHEL et al., 2017) antiviral (BÚFALO et al., 2009) e anti-ulcerogênico (MASSIGNANI et al., 2009). Além disso, tem sido relatado que as abelhas utilizam a sua resina para produzir a própolis verde, um composto com efeito terapêutico (DE ALENCAR et al., 2005). A propriedade antimicrobiana desta planta tem sido associada a terpenos (CAZELLA et al., 2019; SALAZAR et al., 2018), e compostos fenólicos (VEIGA et al., 2017).

Apesar do efeito antimicrobiano do *B. dracunculifolia* DC, uma das grandes limitações para aplicação dos óleos essenciais ou extratos de plantas em alimentos são os seus odores e sabores bastante pronunciados, que em certos casos são indesejáveis. Além disso, a ação antimicrobiana pode ser reduzida, devido as interações com componentes da matriz alimentar, sendo necessário

concentrações maiores para se obter efeito similar ao observado em meio de cultivo (CALO et al., 2015; HAYOUNI et al., 2008; KHORSHIDIAN et al., 2018; ULTEE; SMID, 2001). O uso de compostos de *B. dracunculifolia* DC associados com outros antimicrobianos pode resultar em sinergismo (SALAZAR et al., 2018), podendo considerar este efeito uma estratégia para melhorar sua aplicação em alimentos devido à redução da concentração do antimicrobiano.

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (FAO/WHO, 2013) que possui atividade contra bactérias Gram-positivas com e sem esporos (KHAN; OH, 2016). A nisina é considerada *Generally Recognized as Safe* (GRAS), e é usada como conservante natural de alimentos em mais de 50 países (PISOSCHI et al., 2018). Diversas pesquisas demonstram que seu uso combinado com antimicrobianos isolados de plantas, resulta em efeito sinérgico (PINILLA; BRANDELLI, 2016; SHI et al., 2017). No entanto, não há relatos sobre o efeito da combinação da nisina com compostos isolados de *B. dracunculifolia* DC frente a patógenos de origem alimentar.

Neste contexto, avaliou-se a atividade antimicrobiana do óleo essencial e extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* DC frente a micro-organismos de interesse alimentar, e o efeito antimicrobiano da combinação deste óleo essencial com a nisina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Antimicrobianos

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC (OE) foi adquirido na empresa Harmonia Natural (Canelinha, SC, Brasil). A composição do OE foi fornecida pelo distribuidor, sendo os três principais componentes o nerolidol (21%), beta-pineno (16%), e D-limoneno (14%), tendo também se identificado menores concentrações o farnesol, pineno, β -selineno, artepilina-C, elixene, α -pineno, cariofileno, germacreno D e espatulenol. Para ensaios em caldo, a solução do OE foi preparada com água ultrapura (obtida em purificador Milli-Q) e Tween 80 (5 mg/mL).

O extrato hidroalcoólico a 7% de *B. dracunculifolia* DC (EH), foi adquirido na empresa Ciclo Farma Indústria Química Ltda. (Serrana, SP, Brasil). Para o uso, foi evaporado todo solvente na estufa a 30 °C, e reconstituído em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (GOUVINHAS et al., 2018).

A nisina (Nisaplin®) foi fornecida pela Danisco Brasil Ltda. (Pirapozinho, SP, Brasil). Segundo o fabricante, a formulação contém 2,5% de nisina pura. A solução estoque, foi preparada de acordo com Pinilla e Brandelli (2016), onde dissolveu-se o Nisaplin® em HCl à 0,01 M para obter 2 mg/mL de nisina e para o uso, foi diluída em tampão fosfato 10 mM (pH 7,0).

Após a aquisição, todos antimicrobianos foram armazenados a 4 °C, e antes dos testes foram esterilizados por membranas filtrantes de 0,22 µm (Millipore; Billerica, MA, EUA).

2.2 Micro-organismos

Foi avaliada a suscetibilidade de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, majoritariamente de interesse alimentar (Tabela 1). As culturas foram provenientes da coleção American Type Culture Collection (ATCC), de fontes comerciais, e isolados de alimentos, manipuladores de alimentos, bancadas de processamento de alimentos, de casos clínicos e do solo.

Tabela 1 - Cepas microbianas testadas em ensaios de atividade antimicrobiana, origem e condições de cultivo de cada micro-organismo

Micro-organismos	Origem	Temperatura (°C)
Bactérias Gram-positivas		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1901	American Type Culture Collection	37
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	American Type Culture Collection	37
<i>Bacillus subtilis</i> FTC01	Comercial	37
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> I3	Solo	37
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	American Type Culture Collection	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 17D78/03	Alimento	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 4C	Alimento	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 4B carcaça	Alimento	37
<i>Listeria monocytogenes</i> QF Oxford - 6	Queijo fatiado	37

Micro-organismos	Origem	Temperatura (°C)
<i>Listeria innocua</i> 6B	Alimento	37
<i>Listeria innocua</i> L07	Leite de búfala	37
<i>Listeria innocua</i> L10	Leite de búfala	37
<i>Listeria innocua</i> L11	Leite de búfala	37
<i>Listeria innocua</i> L13	Leite de búfala	37
<i>Listeria seeligeri</i> BP Palcan - 2	Bancada de processamento de presunto	37
<i>Listeria</i> sp. BQ Oxford - 1	Bancada de processamento de queijo	37
<i>Listeria seeligeri</i> MP Oxford - 4	Mãos manipulador de alimento	37
<i>Listeria</i> sp. BP Oxford - 5	Bancada de processamento de queijo	37
<i>Listeria seeligeri</i> PF Oxford - 3	Presunto fatiado	37
Bactérias Gram-negativas		
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	<i>American Type Culture Collection</i>	37
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	<i>American Type Culture Collection</i>	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>American Type Culture Collection</i>	30
<i>Erwinia psidii</i>	Fitopatógeno	30
<i>Escherichia coli</i> ATCC O157:H7	<i>American Type Culture Collection</i>	37
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>American Type Culture Collection</i>	37
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>American Type Culture Collection</i>	37
<i>Escherichia coli</i> ESBL	Caso clínico	37
<i>Escherichia coli</i> S1	Caso clínico	37
<i>Escherichia coli</i> S2	Caso clínico	37
<i>Escherichia coli</i> S12	Caso clínico	37
<i>Escherichia coli</i> NDM	Caso clínico	37
<i>Escherichia coli</i> KPC	Caso clínico	37
Leveduras		
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>American Type Culture Collection</i>	37
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>American Type Culture Collection</i>	30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial	30

2.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Foi avaliada a sensibilidade de todos os micro-organismos ao OE e ao EH, a fim de verificar o espectro de ação e selecionar o antimicrobiano com maior atividade para os testes subsequentes. O teste de sensibilidade foi realizado em triplicata empregando o método de disco-difusão (CLSI, 2004; CLSI, 2012). A suspensão microbiana foi ajustada em solução salina (0,85 g/L NaCl) para obter-se uma turbidez equivalente a 0,5 McFarland, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para as bactérias (CLSI, 2012), e 10^6 células/mL para as leveduras (CLSI, 2004). O ensaio consistiu em colocar discos de celulose de 6 mm de diâmetro na superfície de placas contendo Ágar *Mueller-Hinton* ou *Sabouraud*, previamente semeadas com *swab* das suspensões de bactérias e leveduras, respectivamente. Sobre os discos foi aplicado 5 µL do OE puro, ou 10 µL EH na concentração de 25 mg/mL, por fim as placas foram incubadas a 30 °C ou 37 °C, por 24 h. Após a incubação, foi feita a leitura dos resultados através da medição do diâmetro dos halos de inibição com paquímetro, e os resultados foram expressos em mm. O ensaio foi realizado em triplicata e o DMSO à 10%, Tween 80 (5 mg/mL), HCl à 0,01 M foram empregados como controles negativos.

2.4 Teste de sensibilidade de culturas mistas de bactérias ao OE

Foi testada a atividade do OE (antimicrobiano com maior espectro de ação) contra 3 misturas de bactérias. Esse ensaio foi realizado em triplicata, pelo método disco-difusão, anteriormente descrito, e o ágar leite foi utilizado como meio de cultivo para simular a matriz alimentar (LOPES; PINILLA; BRANDELLI, 2017). As culturas mistas foram obtidas preparando inicialmente suspensões individuais de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, seguida pela mistura de cada suspensão (1:1, v/v). A primeira cultura mista foi formada por três bactérias do mesmo gênero sensíveis ao OE (*L. monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria seeligeri* MP e *L. innocua* 6B); a segunda por bactérias de gêneros diferentes e sensíveis ao OE (*L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 1901); e a terceira por duas bactérias de gêneros diferentes sendo a *L. monocytogenes* ATCC 7644 sensível e a *E. coli* ATCC 8739 não sensível ao OE.

2.5 Avaliação do potencial sinérgico entre OE e nisina

Foi avaliada a atividade antimicrobiana do OE e nisina, individualmente e combinados para verificar a existência ou não de interações sinérgicas. Para tal, foram selecionados alguns microorganismos patogênicos sensíveis ao OE: *S. aureus* ATCC 1901, *B. cereus* ATCC 9634, *L. monocytogenes* ATCC 7644, e *S. Enteritidis* ATCC 13076. A verificação do sinergismo consistiu inicialmente em determinar os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM), e por último avaliar as interações sinérgicas através da curva de crescimento (*Time-kill curve*).

2.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OE e da nisina individualmente, foi determinada em triplicata pelo método de macrodiluição em caldo (CLSI, 2012). Os valores da CIM foram obtidos testando 12 diluições em serie de cada antimicrobiano, onde o OE foi avaliado em concentrações entre 9000,0 µg/mL e 4,4 µg/mL, e a nisina em concentrações entre 15 µg/mL e 0,007 µg/mL. Este ensaio consistiu basicamente em preparar tubos de cultivo contendo 9 mL de caldo BHI e o antimicrobiano na concentração desejada, onde foi adicionado 1 mL do inóculo bacteriano na concentração de aproximadamente 10^5 UFC/mL. De seguidas os tubos foram incubados em agitador rotativo (150 rpm) a 37 °C por 24 h. Após a incubação, foi realizada a leitura do resultado pela observação visual de turbidez do meio de cultura, indicativo do crescimento bacteriano. O valor da CIM foi definido como a menor concentração do antimicrobiano em que não se observou turvação do meio, e foi expressa em µg/mL. O controle positivo consistiu em meio de cultivo com inóculo bacteriano, e o controle negativo em meio sem inóculo e sem antimicrobiano.

2.5.2 Avaliação do efeito sinérgico

O efeito sinérgico entre o OE e a nisina foi avaliado através da curva de crescimento microbiano, conforme descrito por Pinilla e Brandelli (2016), com algumas alterações. As concentrações dos antimicrobianos testadas foram 50% do CIM do OE e 50% da CIM da nisina, na sua forma individual ou combinados para cada bactéria. As concentrações avaliadas do OE foram de 70,5; 70,5; 35; e 281,5 µg/mL, e as da nisina foram 0,007; 0,469; 1,875; e 15 µg/mL, para *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 1901, *B. cereus* ATCC 9634, e *S. Enteritidis*

ATCC 13076, respectivamente. O ensaio consistiu inicialmente, em preparar Erlenmeyer com 9 mL de caldo BHI contendo antimicrobiano, onde foi adicionado 1 mL da suspensão bacteriana na concentração de aproximadamente 10^5 UFC/mL, seguida pela incubação em agitador rotativo (150 rpm) a 37 °C por 24 h. As amostras foram coletadas no momento 0, e após 2, 4, 6, 8, 10, e 24 h de incubação. Em seguida, foram diluídas em série em solução salina à 0,85% (1:10, v/v), inoculadas em placas de ágar BHI pelo método de espalhamento em placa e incubadas a 37 °C por 24 h. Após a incubação, fez-se a contagem e determinação dos valores das UFC/mL, que foram expressos na escala logarítmica. Considerou-se efeito sinérgico, quando os resultados das contagens microbianas apresentassem diminuição de ≥ 2 log após 24 h, nos tratamentos com os antimicrobianos combinados, em relação aos tratamentos com antimicrobianos individuais (ROCHON-EDOUARD et al., 2000; SHI et al., 2017). O limite de detecção do método é de 2 log UFC/mL (LE; DESBOIS, 2017; LI et al., 2017; MPOFU et al., 2016). O teste foi realizado em duplicata, e o controle positivo consistiu em meio de cultura com inóculo bacteriano, sem antimicrobiano.

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com o software SAS (Versão 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC), e os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças entre as médias foram testadas pelo teste de Análise de Variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey, e foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Os resultados do teste disco-difusão para avaliar o espectro de ação do OE e EH contra diferentes micro-organismos estão representados na Tabela 2. O DMSO a 10%, o HCl (0,01 M) e o Tween 80 (5 mg/mL) foram utilizados como controles negativos e estes não inibiram o crescimento microbiano. O espectro de ação do OE puro e do EH a 25 mg/mL, revelou atividade antibacteriana, mas não contra as leveduras, tendo o OE inibido todas bactérias Gram-positivas e

o EH não inibido 11 cepas de *Listeria* (Tabela 2). Neste ensaio, verificou-se que as bactérias Gram-negativas foram menos sensíveis, tendo os dois antimicrobianos inibido somente duas cepas, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *A. hydrophila* ATCC 7966, das treze cepas de Gram-negativas testadas.

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC (OE) e do extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* DC (EH)

Micro-organismos	Diâmetro do halo de inibição (mm)	
	OE (puro)	EH (25 mg/mL)
Bactérias Gram-positivas		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1901	20,8±1,6 ^{baA}	12,7±0,4 ^{bcB}
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	17±2,2 ^{fecdA}	20,5±2,1 ^{aA}
<i>Bacillus subtilis</i> FTC01	23,6±0,5 ^{aA}	15,7±3 ^{baB}
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> I3	17,8±1,3 ^{ecdA}	17,8±1,3 ^{baA}
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	16,5±0,4 ^{fecdA}	7,7±5 ^{cb}
<i>Listeria monocytogenes</i> 17D78/03	15,7±0,9 ^{fedA}	13±0,7 ^{bcA}
<i>Listeria monocytogenes</i> 4C	15,8±0,6 ^{fecdA}	15,6±0,9 ^{baA}
<i>Listeria monocytogenes</i> 4B carcaça	13,8±1 ^{fghA}	0 ^{dB}
<i>Listeria monocytogenes</i> QF Oxford – 6	13,7±0,5 ^{fghA}	0 ^{dB}
<i>Listeria innocua</i> 6B	10,3±0,9 ^{iA}	0 ^{dB}
<i>Listeria innocua</i> L07	10±0,8 ^{iA}	0 ^{dB}
<i>Listeria innocua</i> L10	11±1,6 ^{ihA}	12,6±1 ^{bcA}
<i>Listeria innocua</i> L11	12,3±0,5 ^{ighA}	0 ^{dB}
<i>Listeria innocua</i> L13	10,3±1,2 ^{iA}	0 ^{dB}
<i>Listeria seeligeri</i> BP Palcan – 2	15,3±1,2 ^{fegA}	0 ^{dB}
<i>Listeria</i> sp. BQ Oxford – 1	14,7±0,5 ^{fegA}	0 ^{dB}
<i>Listeria seeligeri</i> MP Oxford – 4	14,3±0,5 ^{fgA}	0 ^{dB}
<i>Listeria</i> sp. BP Oxford – 5	15±0,8 ^{fegA}	0 ^{dB}
<i>Listeria seeligeri</i> PF Oxford – 3	14,8±0,2 ^{fegA}	0 ^{dB}
Bactérias Gram-negativas		
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	19±0,82 ^{bcA}	8,7±2,4 ^{cb}
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	18,6±0,94 ^{bcdA}	17±2 ^{bcA}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0 ^{iA}	0 ^{dA}
<i>Erwinia psidii</i>	0 ^{iA}	0 ^{dA}
<i>Escherichia coli</i> ATCC O157:H7	0 ^{iA}	0 ^{dA}
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	0 ^{iA}	0 ^{dA}
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0 ^{iA}	0 ^{dA}
<i>Escherichia coli</i> ESBL	0 ^{iA}	0 ^{dA}
<i>Escherichia coli</i> S1	0 ^{iA}	0 ^{dA}
<i>Escherichia coli</i> S2	0 ^{iA}	0 ^{dA}
<i>Escherichia coli</i> S12	0 ^{iA}	0 ^{dA}
<i>Escherichia coli</i> NDM	0 ^{iA}	0 ^{dA}

Micro-organismos	Diâmetro do halo de inibição (mm)	
	OE (puro)	EH (25 mg/mL)
<i>Escherichia coli</i> KPC	0 ^{jA}	0 ^{dA}
Leveduras		
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	0 ^{iA}	0 ^{dA}
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	0 ^{iA}	0 ^{dA}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 ^{iA}	0 ^{dA}

Legenda: Os valores são as médias \pm desvios padrão ($n = 3$). a – j: representam diferenças significativas entre as colunas; A – B: diferenças significativas entre as linhas ($p < 0,05$).

Tem sido descrito que as bactérias Gram-negativas são menos susceptíveis aos óleos essenciais ou extratos, devido a estrutura da sua parede celular ser mais complexa em relação as Gram-positivas, apresentando uma membrana externa que serve de barreira para as substâncias ativas alcançarem a membrana citoplasmática (EPAND et al., 2016; GOUVINHAS et al., 2018; NAZZARO et al., 2013). Nessa análise, o OE apresentou maior espectro de ação em relação ao EH, tendo se associado esse achado a diferença na composição química destes antimicrobianos. Além disso, o OE testado puro, enquanto o EH foi avaliado na concentração de 25 mg/mL.

Os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* DC são compostos basicamente por terpenos (CAZELLA et al., 2019; DE ASSIS LAGE et al., 2015; SALAZAR et al., 2018). Conforme mencionado anteriormente, os três principais terpenos do OE do presente estudo são o nerolidol (21%), beta-pineno (16%), e D-limoneno (14%), estando em menores concentrações outros compostos terpenóides. A ação antimicrobiana do OE provavelmente resulte de interações sinérgicas dos diferentes constituintes, pois tanto os componentes majoritários assim como minoritários exibem essa propriedade, sendo que alguns dos componentes foram associados ao efeito antimicrobiano, como o nerolidol (CHAN et al., 2016), α -pineno (WANG; CHEN; HOU, 2019), espatulenol (CAZELLA et al., 2019), germacreno D (SALAZAR et al., 2018), artepilina C (VEIGA et al., 2017).

Resultados semelhantes, demonstrando atividade do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC foram relatados frente às cepas de *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* NCTC 7973, *Salmonella* (CAZELLA et al., 2019). Embora no presente estudo não se tenha observado a ação do OE frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853, 9 cepas de *E. coli*, *C. krusei* ATCC

6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, outros estudos reportaram efeito sobre Gram-negativas e leveduras. Por exemplo, o OE de *B. dracunculifolia* inibiu *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 35218 (CAZELLA et al., 2019) e diversas cepas de *Candida* spp. de origem clínica, incluindo cepas de *C. parapsilosis* (PEREIRA et al., 2011). A discrepância na ação antimicrobiana foi associada em alguns casos a diferença nas cepas de micro-organismos testadas, e também a variação na composição química deste óleo essencial. Embora o OE de *B. dracunculifolia* DC seja composto por terpenos, estes apresentam variações qualitativas e quantitativas (CAZELLA et al., 2019). Sabe-se que a composição dos extratos ou óleos essenciais de qualquer planta varia naturalmente em termos quantitativos e qualitativos de acordo com idade da planta, parte da planta, localização geográfica, composição química do solo, disponibilidade de água, variações na temperatura, exposição à luz solar, bactérias, vírus, fungos ou parasitas (VERMA; SHUKLA, 2015), método de extração (AZMIR et al., 2013), e condições de armazenamento (KHAYYAT; ROSELIN, 2018). Como exemplo, el-Jalel et al., (2018) verificaram que a variação na composição química do óleo essencial de *Thymus capitatus* L, poderia influenciar na atividade antimicrobiana.

Diversos estudos apontam que os extratos hidroalcoólicos de *B. dracunculifolia* DC colhidos no território brasileiro são constituídos essencialmente por compostos fenólicos, mencionando-se a artepilina C, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, aromadendrina-4-metil éter, baccharina, drupanina, isosakuranetina, 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (BÚFALO et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2010; LEMOS et al., 2007). A ação antimicrobiana do EH provavelmente esteja associada a esses compostos fenólicos. Estudos que investigaram a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* DC também relataram a resistência de cepas de *E. coli* (DUARTE et al., 2004), *P. aeruginosa* (DUARTE et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007) e *Candida* (DUARTE et al., 2004), bem como a sensibilidade de cepas de *S. aureus* (DE ABREU; ONOFRE, 2010; DUARTE et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007; VEIGA et al., 2017) e *B. cereus* (FABRI et al., 2011). Além disso, o presente estudo demonstrou atividade frente ao *B. subtilis* FTC01 e *A. hydrophila* ATCC 7966, não observadas por Oliveira et al. (2007) frente a *B. subtilis* ATCC 6633 e *A. hydrophila* ATCC 7966, onde avaliaram concentrações menores (5 – 0,625 mg/mL). A atividade do EH e assim como do OE foi relatada pela primeira vez frente a *B. amyloliquefaciens* I3, *E. psidii*, *S. cerevisiae*, diversas cepas de

Listeria e cepas de *Escherichia* ampliando o conhecimento do espectro de ação destes antimicrobianos de *B. dracunculifolia* DC.

3.2 Teste de sensibilidade de culturas bacterianas mistas ao OE

Em alimentos, a ocorrência de micro-organismos frequentemente não é de forma isolada, podendo coexistir vários gêneros em uma matriz alimentar. Em qualquer ecossistema que os micro-organismos habitam, eles criam mecanismos de sobrevivência através de interações intra e interespecíficas que podem induzir a resistência aos antimicrobianos os quais incluem a transferência de genes de resistência e formação de biofilmes (VERRAES et al., 2013). Nesse contexto, empregou-se um teste qualitativo para verificar se a presença de vários micro-organismos afetaria a atividade antimicrobiana, utilizando o ágar leite como meio de cultivo para simular um alimento. O OE foi o antimicrobiano que inibiu maior número de micro-organismos, sendo selecionado para este teste, e os subsequentes. Foram avaliadas três culturas bacterianas mistas, onde a cultura mista I foi formada por mistura de três bactérias do mesmo gênero, sensíveis ao OE; a cultura mista II foi formada por duas bactérias de gêneros diferentes, sensíveis ao OE, e a cultura mista III por mistura de duas bactérias de gêneros diferentes, sendo uma sensível, e a outra não sensível ao OE. Com esse ensaio, verificou-se que a presença de mais de um micro-organismo não interferiu na suscetibilidade antimicrobiana, tendo o OE inibido as culturas mistas formadas por bactérias sensíveis, e não tendo efeito sobre aquela contendo a cepa resistente (Tabela 3). Acredita-se que a ausência de inibição se deve a presença da cepa resistente, pois em torno do disco foi possível observar colônias isoladas, sugerindo-se que a cepa sensível foi inibida, e que não houve transferência de genes de resistência. No entanto, testes moleculares usando técnicas de PCR, empregado por Poey e Laviña (2018), são mais adequados para confirmar esse tipo de observação.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC (OE) em ágar leite contra culturas bacterianas mistas

Cultura mista	Micro-organismos	Halo de inibição (mm)
		OE (puro)
I	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644, <i>L. innocua</i> L11, <i>L. seeligeri</i> MP	13,3±1,7 ^a
II	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644, <i>S. aureus</i> ATCC 1901	12,1±1,0 ^a
III	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644, <i>E. coli</i> ATCC 8739	0±0 ^b

Legenda: valores das médias ± desvios padrão (n = 3). ^{a,b} diferenças significativas ($p < 0,05$).

3.3 Avaliação do potencial sinérgico entre o óleo essencial (OE) e nisina

3.3.1 Concentração Inibitória Mínima

Para o estudo do sinergismo, foi necessário determinar os valores da CIM do OE e da nisina para utilizar na avaliação das interações sinérgicas. Os resultados da CIM do OE e da nisina estão demonstrados na Tabela 4. Em relação a suscetibilidade ao OE, verificou-se que *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi a bactéria menos sensível com a CIM de 563 µg/mL, e *B. cereus* ATCC 9634 foi mais sensível com CIM de 70 µg/mL. Em relação à suscetibilidade à nisina, *S. Enteritidis* ATCC 13076 também foi a menos sensível, não sendo inibida. Por outro lado, a nisina teve um forte efeito antimicrobiano frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644 tendo inibido o seu crescimento na concentração de 0,015 µg/mL. Esses achados corroboram com os disponíveis na literatura, que afirmam que as bactérias Gram-negativas geralmente não são inibidas pela nisina (CHEN; HOOVER, 2003) ou são menos sensíveis ao óleo essencial (NAZZARO et al., 2013).

Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC (OE) e da nisina

Micro-organismos	OE (µg/mL)	Nisina (µg/mL)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	141	0,015
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1901	141	0,93
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	70	3,75
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	563	N.D

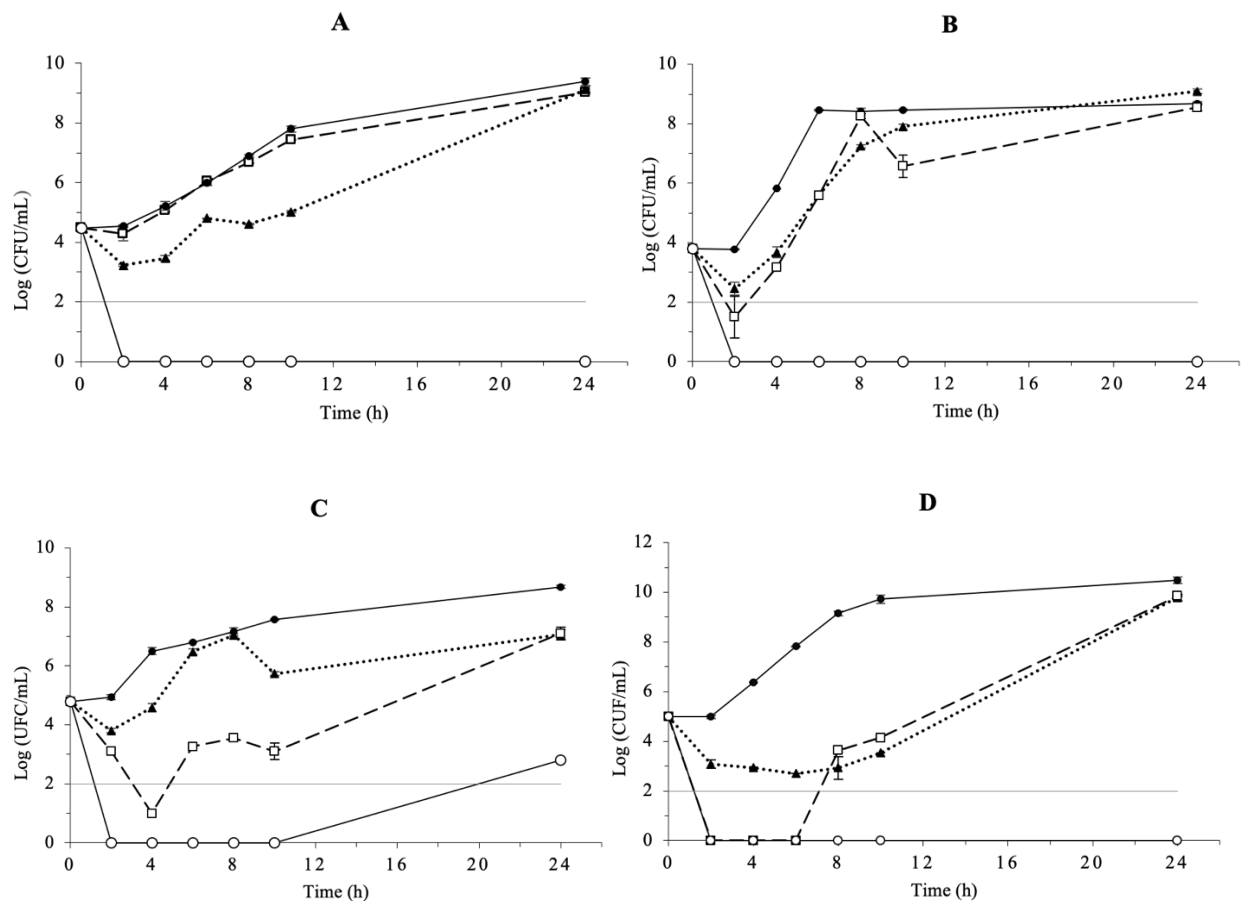
N.D: não definida.

3.3.2 Avaliação do efeito sinérgico

No uso combinado de antimicrobianos naturais os compostos podem agir de forma independente, ou interagir entre si resultando em efeito antagônico ou sinérgico (SEMENIUC; POP; ROTAR, 2017). Neste estudo, investigou-se o efeito sinérgico entre o OE e a nisina testando 50% da CIM dos antimicrobianos individualmente e em combinação através da curva de crescimento microbiano frente *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. Enteritidis*. A curva de crescimento microbiano é considerada uma das análises mais apropriadas para verificar o efeito sinérgico, pois permite visualizar o efeito ao longo do tempo (ALBANO et al., 2016; WHITE et al., 1996). Após 24 h de incubação, a combinação de OE com a nisina mostrou-se eficaz não tendo se identificado nenhuma colônia na contagem de *B. cereus*, *L. monocytogenes*, e *S. Enteritidis*, apresentando diferença média com os antimicrobianos individuais superior a 8 log UFC/mL. Entretanto, para *S. aureus* a contagem foi de 2,81 log UFC/mL, apresentando uma diferença com os antimicrobianos individuais superior a 4 log UFC/mL (Figura 1). A combinação do OE com a nisina teve efeito sinérgico sobre todas as bactérias testadas. Tal fato se enquadra no critério que considera o efeito sinérgico a redução ≥ 2 log UFC/mL após 24 h, na contagem das colônias bacterianas tratadas com antimicrobianos combinados em relação aos seus compostos isolados (ROCHON-EDOUARD et al., 2000; SHI et al., 2017). Por outro lado, o OE e a nisina individualmente não tiveram efeito significativo sobre as bactérias, sendo o número de bactérias presentes nesses tratamentos próximos ao do grupo controle (meio sem antimicrobiano) após 24 h,

com a exceção do *S. aureus* ATCC 1901 onde os antimicrobianos individuais tiveram uma diferença de 2,1 log UFC/mL em relação ao grupo controle (Figura 1).

Figura 1 - Efeito da nisina e do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC (OE), utilizados isoladamente ou combinados no crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A), *B. cereus* ATCC 9634 (B), *S. aureus* ATCC 1901 (C), e *S. Enteritidis* ATCC 13076 (D).



Legenda: 50% MIC OE + 50% MIC nisina (—○—), 50% MIC OE (...▲...), 50% MIC nisina (---□---), Controle (—●—). Limite de detecção (—).

Em geral, a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de plantas não é associada a um mecanismo de ação específico, devido ao grande número de compostos presente. No entanto, o óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC é composto principalmente por terpenos (SALAZAR et al., 2018). Devido à alta lipofilicidade, os terpenos reagem facilmente com a membrana celular, causando danos estruturais e funcionais, que resultam na sua expansão e aumento da

permeabilidade permitindo a liberação de constituintes intracelulares (BHAVANIRAMYA et al., 2019; GUIMARÃES et al., 2019; OZ et al., 2015). Por outro lado, o efeito da nisina sobre a membrana é bastante reconhecido. A nisina é uma molécula catiônica, o que facilita a sua interação com a membrana bacteriana carregada negativamente. Na membrana celular, a nisina liga-se especificamente ao precursor do peptidoglicano, o lipídeo II, resultando na inibição da síntese da parede celular e na formação de poros que causam o extravazamento dos constituintes celulares (HÉCHARD; SAHL, 2002; MÜLLER-AUFFERMANN et al., 2015; WIEDEMANN et al., 2006). Alguns estudos reportam o efeito sinérgico entre óleos essenciais e nisina, mas o mecanismo de ação envolvido não está estabelecido (ROHANI et al., 2011; SHI et al., 2017). Porém, os terpenos assim como a nisina têm como alvo de ação a membrana celular. Acredita-se que os terpenos aumentem o tamanho e número de poros formados pela nisina, resultando em maior dano à membrana (POL; SMID, 1999). O efeito sinérgico observado no presente estudo é importante porque reduz a quantidade do OE necessária para produzir o efeito antimicrobiano, conseqüentemente menores concentrações serão necessárias para se aplicar em alimentos, o que reduz o efeito organoléptico indesejável. Ademais, a associação com a nisina tem a vantagem de não exercer nenhum efeito nas propriedades do alimento por ser uma substância inodora, incolor, e insípida (EGAN et al., 2016; FIELD; ROSS; HILL, 2018; WORAPRAYOTE et al., 2016).

4 CONCLUSÕES

Este estudo avaliou o espectro de ação antimicrobiana do OE e EH de *B. dracunculifolia* DC sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Verificou-se que ambos antimicrobianos possuem alta atividade antibacteriana, mas não antifúngica. As bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis a ambos antimicrobianos, e o OE foi antimicrobiano com maior espectro de ação por ter inibido todas 19 cepas de bactérias Gram-positivas. Além disso, avaliou-se a sensibilidade das culturas bacterianas mistas ao OE em ágar leite, e observou-se que a presença de mais de uma bactéria e componentes presentes no leite não interferem na atividade antimicrobiana.

Com relação ao efeito sinérgico entre o OE e a nisina, onde observou-se que o uso combinado do OE com a nisina, potencializou a atividade de ambos antimicrobianos frente a *S. aureus* ATCC 1901, *B. cereus* ATCC 9634, *L. monocytogenes* ATCC 7644, e *S. Enteritidis* ATCC 13076, por apresentar maior eficácia em relação aos antimicrobianos individuais. Como base nesse resultado, o OE e a nisina podem ser utilizados em simultâneo em alimentos, como uma estratégia para reduzir os efeitos organolépticos indesejáveis do óleo essencial e se obter um aumento da inocuidade do alimento.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albano, M., Alves, F.C.B., Andrade, B.F.M.T., Barbosa, L.N., Pereira, A.F.M., da Cunha, M.L.R.S., Rall, V.L.M., Junior, A.F., 2016. Antibacterial and Anti-Staphylococcal Enterotoxin Activities of Phenolic Compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 38, 83–90.
- Apaolaza, V., Hartmann, P., D’Souza, C., López, C.M., 2018. Eat Organic – Feel Good? The Relationship between Organic Food Consumption, Health Concern and Subjective Wellbeing. *Food Quality and Preference*. 63, 51–62.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N, Omar, A.K.M, 2013. Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review. *Journal of Food Engineering*. 117, 426–36.
- Barroso, G. M., 1976. Compositae – Subtribo Baccharidinae Hoffmann – Estudo Das Espécies Ocorrentes No Brasil. *Rodriguésia*. 28, 1-273.
- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M.S., Vijayakumar, R., Baskaran, D., 2019. Role of Essential Oils in Food Safety: Antimicrobial and Antioxidant Applications. *Grain & Oil Science and Technology*. 2, 49–55.
- Búfalo, M. C., Figueiredo, A.S., de Sousa, J.P.B., Candeias, J.M.G., Bastos, J.K., Sforcin, J.M., 2009. Anti-Poliiovirus Activity of *Baccharis Dracunculifolia* and Propolis by Cell Viability Determination and Real-Time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1669–1680.
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O’Bryan, C.A., Ricke, S.C., 2015. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems - A Review. *Food Control*. 54, 111–19.
- Cazella, L.N., Glamoclija, J., Soković, M., Gonçalves, J.E., Linde, G.A., Colauto, N.B., Gazim, Z.C, 2019. Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Baccharis Dracunculifolia* DC

- (Asteraceae) Aerial Parts at Flowering Period. *Frontiers in Plant Science*. 10, 1–9.
- Chan, W.K., Tan, L.T.H., Chan, K.G., Lee, L.H., Goh, B.H., 2016. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. *Molecules*. 21, 529.
- Chen, H., Hoover, D., 2003. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2, 82–100.
- CLSI, 2004. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. *Clinical and Laboratory Standards Institute M44-A*. 24, 4.
- CLSI, 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute M07-A9*. 32, 2.
- De Abreu, A.P.; Onofre, S.B., 2010. Atividade Antimicrobiana Dos Extratos De Baccharis Dracunculifolia D. C. (Asteraceae). *Sabios: Rev. Saúde E Biol*. 5, 1–6.
- de Alencar, S.M., de Aguiar, C.L., Paredes-Guzmán, J., Park, Y.K., 2005. Composition of Baccharis Dracunculifolia, the Botanical Source of Propolis from the States Of. *Ciência Rural*. 35435, 909–15.
- de Assis Lage, T.C., Montanari, R.M., Fernandes, S.A., Monteiro, C.M.O., Senra, T.D.S., Zeringota, V., Matos, R.S., Daemon, E., 2015. Chemical Composition and Acaricidal Activity of the Essential Oil of Baccharis Dracunculifolia De Candolle (1836) and Its Constituents Nerolidol and Limonene on Larvae and Engorged Females of Rhipicephalus Microplus (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*. 148, 24–29.
- Denver, S., Christensen, T., 2015. Organic Food and Health Concerns: A Dietary Approach Using Observed Data. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*. 74–75, 9–15.
- Ditlevsen, K., Sandøe, P., Lassen, J., 2019. Healthy Food Is Nutritious, but Organic Food Is Healthy Because It Is Pure: The Negotiation of Healthy Food Choices by Danish Consumers of Organic Food', *Food Quality and Preference*. 71, 46–53.
- Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Pereira, B., Magalhães, P.M., Delarmelina, C, 2004. Atividade Antimicrobiana de Extratos Hidroalcolicos de Espécies Da Coleção de Plantas Medicinais CPQBA/UNICAMP. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 14, 06–08.
- Egan, K., Field, D., Rea, M.C., Ross,R.P., Hill, C., Cotter, P.D., 2016. Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems?. *Frontiers in Microbiology*. 7, 461.
- El-Jalel, L.F.A., Elkady, W.M., Gonaid, M.H., El-Gareeb, K.A., 2018. Difference in Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Thymus Capitatus L. Essential Oil at Different Altitudes. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4, 156–60.

- Eband, R.M., Walker, C. Eband, R.F., Magarvey, N.A., 2015. Molecular Mechanisms of Membrane Targeting Antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858, 980–87.
- Fabri, R.L., Nogueira, M.S., Dutra, L.B., Bouzada, M.L.M., Scio, E., 2011. Potencial Antioxidante e Antimicrobiano de Espécies Da Família Asteraceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 13, 183–89.
- FAO/WHO, 2013. *Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Seventy-Seventh Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Rome.
- Field, D., Ross, P. Hill, C., 2018. Developing Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria into next Generation Biopreservatives. *Current Opinion in Food Science*. 20, 1–6.
- Figueiredo-Rinhel, A.S.G., de Melo, L.L., Bortot, L.O., Everton, Santos, O.L., Andrade, M.F., Azzolini, A.E.C.S., Kabeyaa, L.M., Caliria, A., Bastosc, J.K., Lucisano-Valima, Y.M., 2017. Baccharis Dracunculifolia DC (Asteraceae) Selectively Modulates the Effector Functions of Human Neutrophils. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 69, 1829–1845.
- Gomes, V., Fernandes, G.W., 2002. Germinação De Aquênios De Baccharis Dracunculifolia D.C. (Asteraceae) Vania. *Acta Bot. Bras.* 16, 421–27.
- Gouvinhas, I., Santos, R.A., Queiroz, M., Leal, C., Saavedra, M.J., Domínguez-Perles, R., Rodrigues, M., Barros, A.I.R.N.A., 2018. Monitoring the Antioxidant and Antimicrobial Power of Grape (*Vitis Vinifera* L.) Stems Phenolics over Long-Term Storage. *Industrial Crops and Products*. 126, 83–91.
- Guimarães, A.C, Meireles, L.M, Lemos, M.F., Guimarães, M.C.C., Endringer, D.C. Fronza, M., Scherer, R., 2019. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*. 24, 1–12.
- Hayouni, E.A., Ichraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.Y., Mohammed, H., Mamdi, M., 2008. Tunisian *Salvia Officinalis* L. and *Schinus Molle* L. Essential Oils: Their Chemical Compositions and Their Preservative Effects against *Salmonella* Inoculated in Minced Beef Meat. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 242–51.
- Héchar, Y., Sahl, H.G., 2002. Mode of Action of Modified and Unmodified Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. *Biochimie*. 84, 545–57.
- Khan, I., Oh, D.H., 2016. Integration of Nisin into Nanoparticles for Application in Foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 34, 376–84.
- Khayyat, SA., Roselin, L.S., 2018. Recent Progress in Photochemical Reaction on Main Components of Some Essential Oils. *Journal of Saudi Chemical Society*. 22, 855–75.
- Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, E., Mortazavian, A.M., 2018. Potential Application of

- Essential Oils as Antimicrobial Preservatives in Cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 45, 62–67.
- Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2003. Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis Shigenori. *Chem. Pharm. Bull.* 51, 740–42.
- Kushwah, S., Dhir, A., Sagar, M., Gupta, B., 2019. Determinants of Organic Food Consumption. A Systematic Literature Review on Motives and Barriers. *Appetite*. 143, 104402.
- Le, P.N.T., Desbois, A.P., 2017. Antibacterial Effect of Eicosapentaenoic Acid against *Bacillus Cereus* and *Staphylococcus Aureus*: Killing Kinetics, Selection for Resistance, and Potential Cellular Target. *Marine Drugs*. 15, 334.
- Lemos, M., de Barros, M.P., Sousa, J.P.B., da Silva Filho, A.A., Bastos, J.K., de Andrade, S.F., 2007. *Baccharis Dracunculifolia*, the Main Botanical Source of Brazilian Green Propolis, Displays Antiulcer Activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59, 603–608.
- Li, D., Yang, Y., Tian, Z., Lv, J., Sun, J., Wang, Q., Liu, Y., Xia, P., 2017. Synergistic Antibiotic Effect of Looped Antimicrobial Peptide CLP-19 with Bactericidal and Bacteriostatic Agents. *Oncotarget*. 8, 55958–55966.
- Lopes, N.A., Pinilla, C.M.B., Brandelli, A., 2017. Pectin and Polygalacturonic Acid-Coated Liposomes as Novel Delivery System for Nisin: Preparation, Characterization and Release Behavior. *Food Hydrocolloids*. 70, 1–7.
- Massignani, J.J., Lemos, M., Maistro, E.L., Pedro, H., Jorge, R.F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., de Andrade, S.F., 2009. Antiulcerogenic Activity of the Essential Oil of *Baccharis Dracunculifolia* on Different Experimental Models in Rats. *Phytotherapy Research*. 1360, 1355–1360.
- Mpofu, A., Linnemann, A.R., Nout, M.J.R., Zwietering, M.H., Smid, E.J., den Besten, H.M.W., 2016. Inactivation of Bacterial Pathogens in Yoba Mutandabota, a Dairy Product Fermented with the Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* Yoba. *International Journal of Food Microbiology*. 217, 42–48.
- Müller-Auffermann, K., Grijalva, F., Jacob, F., Hutzler, M., 2015. Nisin and Its Usage in Breweries: A Review and Discussion. *Journal of the Institute of Brewing*. 121, 309–319.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., de Martino, L., Coppola, R., de Feo, V., 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*. 6, 1451–1474.
- Oliveira, D. F., Pereira, A.C., Figueiredo, H.C.P., Carvalho, D.A., Silva, G., Nunes, A.S., Alves, D.S., Carvalho, W.P., 2007. Antibacterial Activity of Plant Extracts from Brazilian Southeast Region. *Fitoterapia*. 78, 142–145.

- Oz, M., Lozon, Y., Sultan, A., Yang, K.H.S., Galadari, S., 2015. Effects of Monoterpenes on Ion Channels of Excitable Cells. *Pharmacology and Therapeutics*. 152, 83–97.
- Pereira, C.A., da Costa, A.C.B.P., Machado, A.K.S., Júnior, M.B., Zöllner, M.S.A.C., Junqueira, J.C., Jorge, A.O.C., 2011. Enzymatic Activity, Sensitivity to Antifungal Drugs and Baccharis Dracunculifolia Essential Oil by Candida Strains Isolated from the Oral Cavities of Breastfeeding Infants and in Their Mothers' Mouths and Nipples. *Mycopathologia*. 171, 103–109.
- Petruzzi, L., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., 2017. Microbial Spoilage of Foods: Fundamentals, in *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*, ed. by Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. Elsevier (Foggia, Italy), Chap. 1, p. 2.
- Pinilla, C.M.B, Brandelli, A., 2016. Antimicrobial Activity of Nanoliposomes Co-Encapsulating Nisin and Garlic Extract against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria in Milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 36, 287–293.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N.K., Mathe, E., 2018. An Overview of Natural Antimicrobials Role in Food. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 143, 922–935.
- Poey, M.E., Laviña, M., 2018. Horizontal Transfer of Class 1 Integrons from Uropathogenic Escherichia Coli to E. Coli K12. *Microbial Pathogenesis*. 117, 16–22.
- Pol, I. E., Smid, E.J., 1999. Combined Action of Nisin and Carvacrol on Bacillus Cereus and Listeria Monocytogenes. *Letters in Applied Microbiology*. 29, 166–70.
- Rohani, S.M.R, Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S., Griffiths, M.W., 2011. The Effect of Nisin and Garlic (Allium Sativum L.) Essential Oil Separately and in Combination on the Growth of Listeria Monocytogenes. *LWT - Food Science and Technology*. 44, 2260–2265.
- Rochon-Edouard, S., M. Pestel-Caron, J. F. L., Caron, F., 2000. In Vitro Synergistic Effects of Double and Triple Combinations of β -Lactams, Vancomycin, and Netilmicin against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44, 3055–3060.
- Salazar, G.J.T., de Sousa, J.P. Lima, C.N.F., Lemos, I.C.S. da Silva, A.R.P. de Freitas, T.S., Coutinho, H.G.M., da Silva, L.E., do Amaral, W., Deschamps, C., 2018. Phytochemical Characterization of the Baccharis Dracunculifolia DC (Asteraceae) Essential Oil and Antibacterial Activity Evaluation', *Industrial Crops and Products*. 122, 591–595.
- Semeniuc, C.A., Pop, C.R., Rotar, A.M., 2017. Antibacterial Activity and Interactions of Plant Essential Oil Combinations against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*. 25, 403–408.

- Shi, C., Zhang, X., Zhao, X., Meng, R., Liu, Z., Chen, X., Guo, N., 2017. Synergistic Interactions of Nisin in Combination with Cinnamaldehyde against *Staphylococcus Aureus* in Pasteurized Milk. *Food Control*. 71, 10–16.
- Ultee, A., Smid, E.J., 2001. Influence of Carvacrol on Growth and Toxin Production by *Bacillus Cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. 64, 373–378.
- Veiga, R.S., de Mendonça, S., Mendes, P.B., Paulino, N., Mimica, M.J., Lagareiro Netto, A.A., Lira, I.S, Lopez, B.G.C., Negrão, V., Marcucci, M.C., 2017. Artepillin C and Phenolic Compounds Responsible for Antimicrobial and Antioxidant Activity of Green Propolis and *Baccharis Dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*. 122, 911–920.
- Verma, N., Shukla, S., 2015. Impact of Various Factors Responsible for Fluctuation in Plant Secondary Metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2, 105–113.
- Verraes, C., Boxstael, S.V., Meervenue, E.V., Coillie, E.V., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M., Huffel, X.V., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., de Block, J, Dewulf, J, Herman, L., 2013. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 10, 2643–2669.
- Wang, C., Chen, Y. Hou, C., 2019. Antioxidant and Antibacterial Activity of Seven Predominant Terpenoids. *International Journal of Food Properties*. 22, 230–238.
- White, R.L., Burgess, D.S. Manduru, M., Bosso, J.A., 1996. Comparison of Three Different in Vitro Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E Test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40, 1914–1918.
- World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. World Health Organization, Geneva, 2015. <<https://www.who.int/publications-detail/who-estimates-of-the-global-burden-of-foodborne-diseases>>. (accessed December 12, 2019).
- Wiedemann, I., Böttiger, T., Bonelli, R.R., Schneider, T., Sahl, H.G., Martínez, B., 2006. Lipid II-Based Antimicrobial Activity of the Lantibiotic Plantaricin C. *Applied and Environmental Microbiology*. 72, 2809–2814.
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, Swetwivathana, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., 2016. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria and Their Applications in Meat and Meat Products. *Meat Science*. 120, 118–132.

3.2 Artigo 2

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARREGADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis dracunculifolia* DC: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM LEITE

RESUMO

Este estudo teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar atividade antibacteriana de nanopartículas de Eudragit® RS100 contendo óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (N-OE). As N-OE foram desenvolvidas pela técnica de nanoprecipitação, e apresentaram diâmetro médio de 151,6 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,08, potencial zeta (ζ) de + 51,7 mV, e eficiência de encapsulação (EE) de 99,4%. A atividade antibacteriana das N-OE e do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC livre (OE) foi avaliada através da curva de crescimento microbiano em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), leite ultrapasteurizado integral e desnatado, a 37 °C por 24 h. Em BHI, a ação foi testada contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, e *Salmonella* Enteritidis. No BHI, não foi detectada nenhuma célula viável na contagem de colônias para todas cepas testadas até às 4 h de incubação. O mesmo efeito foi alcançado pelas N-OE às 24 h, sugerindo uma liberação controlada do OE encapsulado. No leite, a ação foi testada somente contra *L. monocytogenes*. No leite integral as N-OE e o OE não demonstraram efeito antibacteriano, enquanto no leite desnatado as N-OE e o OE apresentaram efeito bacteriostático. O OE foi o mais ativo, tendo reduzido em 2 log UFC/mL a contagem de colônias de *L. monocytogenes* em relação aos controles após 24 h de incubação em leite. A partir dos resultados obtidos, sugere-se que a nanoprecipitação pode ser empregada para encapsular óleos essenciais e permitir sua liberação controlada. No entanto, devido a redução do efeito antibacteriano das N-OE no leite, sugere-se mais estudos sobre a interação dessas nanoestruturas com os componentes da matriz alimentar.

Palavras-chave: Eudragit® RS100, nanocápsulas, Alecrim-do-campo, atividade antimicrobiana, *Baccharis dracunculifolia* DC, óleo essencial.

1. INTRODUÇÃO

O leite e os produtos lácteos estão entre os produtos mais consumidos no mundo tendo se alcançado em 2018, uma produção mundial de aproximadamente 843,2 milhões de toneladas (FAO, 2019). O leite é um produto suscetível à contaminação, que pode ocorrer em toda a cadeia produtiva, desde antes da ordenha, se o animal estiver doente, até seu armazenamento. Por ser rico em nutrientes, este produto pode permitir o crescimento de várias bactérias patogênicas, como *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. (ALEGBELEYE et al., 2018; SADIQ et al., 2018). As doenças transmitidas por alimentos causadas por bactérias são consideradas um problema global por colocar em risco a saúde e causar perdas econômicas (BARTSCH et al., 2018). A pasteurização é o método geralmente empregado para alcançar segurança microbiológica de produtos lácteos (MELINI et al., 2017; SADIQ et al., 2018). No entanto, a demanda crescente do consumidor por produtos com alto teor de nutrientes, naturais e locais, aumenta a procura por laticínios não pasteurizados o que pode representar um risco a saúde (ALEGBELEYE et al., 2018; DADAR et al., 2019; MELINI et al., 2017). Nesse sentido, métodos não térmicos e naturais surgem como alternativos ao método convencional para alcançar a inocuidade microbiológica de produtos lácteos.

Os óleos essenciais são compostos obtidos de material vegetal por processo de destilação a vapor, destilação a seco, ou por prensagem, e têm sido amplamente estudados como potenciais antimicrobianos para alimentos (SILVESTRE et al., 2019). Entre os diversos óleos essenciais, o de *Baccharis dracunculifolia* DC, composto particularmente por terpenos, se destaca por apresentar atividade contra espécies de bactérias patogênicas veiculadas por alimentos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (CAZELLA et al., 2019; SALAZAR et al., 2018), *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* (CAZELLA et al., 2019). Contudo, a sua aplicação em alimentos é limitada, pois os terpenos são lipofílicos e voláteis (OZ et al., 2015). Por outro lado, devido as interações com os componentes da matriz alimentar a efetividade dos óleos essenciais ou seus componentes é reduzida em diversos produtos incluindo o leite (ALVES et al., 2016) e produtos lácteos (AMATISTE et al., 2014; DE CARVALHO et al., 2015).

A nanoencapsulação de óleos essenciais tem sido amplamente investigada para melhorar a solubilidade, proteger os bioativos contra interações indesejáveis e a volatilização, controlar a

liberação do ativo, e mascarar sabores e odores (PRAKASH et al., 2018; RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016; WEISS; TAKHISTOV; MCCLEMENTS, 2006). Atualmente existem vários materiais para encapsular esses compostos (DE MATOS; LUCCA; KOESTER, 2019), sendo o Eudragit® RS100 de particular interesse por apresentar superfície porosa, o que permite a liberação do bioativo por meio de difusão, e não ser tóxico. Sendo o uso desse material encapsulante permitido na indústria farmacêutica, pela *Food and Drug Administration* (KIM; PARK, 2010; KOLEV et al., 2019; PATRA et al., 2017). As nanopartículas de Eudragit® RS100 são bastante investigadas na área farmacêutica, onde demonstram ser eficazes (CHAVES et al., 2017; DALCIN et al., 2017, 2019; SANTOS et al., 2014). No entanto, na área de alimentos este polímero é pouco explorado, não existindo informação sobre nanoencapsulação de óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC com Eudragit® RS100. Assim sendo, a nanoencapsulação do OE pode ser estratégia para melhorar sua estabilidade, melhorar asolubilidade, e permitir a liberação controlada em alimentos.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver nanopartículas de Eudragit® RS100 contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana contra patógenos de origem alimentar, em caldo BHI, e em leite ultrapasteurizado integral e desnatado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismos

A atividade antibacteriana foi testada contra quatro cepas bacterianas padrão obtidas da American Type Culture Collection (ATCC): *S. aureus* ATCC 1901, *B. cereus* ATCC 9634, *L. monocytogenes* ATCC 7644, e *S. Enteritidis* ATCC 13076. Os micro-organismos foram mantidos em ágar BHI a 4 °C. Para o uso, foram utilizadas culturas frescas de 24 h. A suspensão de bactérias de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 escala de McFarland) foi padronizado em solução salina estéril a 0,85% para atingir a concentração de 10^5 UFC/mL.

2.2. Produtos químicos

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC foi adquirido da empresa Harmonia Natural (Canelinha, Brasil), e a composição deste foi fornecida pelo distribuidor sendo o nerolidol (21%), beta-pineno (16%) e D-limoneno (14%) os três principais componentes deste. O Eudragit® RS100 foi fornecido por Evonik Healthcare (Dossenheim, Alemanha). O polissorbato 80 (Tween 80®) foi adquirida na Synth (Diadema, Brasil). A acetona foi fornecida pela Nuclear (Diadema, Brasil). O triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico foi fornecido por Delaware (Porto Alegre, Brasil). A água ultrapura foi obtida utilizando um purificador Milli-Q.

2.3. Preparação das nanopartículas

As nanopartículas foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação, também conhecida como deslocamento do solvente ou deposição interfacial do polímero pré-formado (BADRI et al., 2017), segundo o procedimento descrito por Santos et al., (2014) com algumas alterações. Inicialmente, foram preparadas duas fases, uma orgânica e outra aquosa. A fase orgânica foi obtida pela dissolução de 13,33 mg/mL de OE e 3,7 mg/mL de Eudragit® RS100 em 27 mL acetona. De outra parte, a fase aquosa foi obtida pela dissolução de 1,45 mg/mL de polissorbato 80 em 53 mL de água ultrapura. Ambas fases foram homogeneizadas individualmente por 25 minutos sob agitação magnética moderada, a temperatura ambiente. Na sequência, a fase orgânica foi adicionada na fase aquosa sob agitação magnética e mantida por mais 10 min. Por fim a acetona e uma parte da água foram eliminados em rotaevaporador a 130 rpm, a 40 °C para atingir um volume final de 10 mL, contendo 36 mg/mL de OE. Além das nanopartículas contendo OE (N-OE), também foram preparadas formulações que serviram de controle, onde o OE foi substituído por triglicerídeo de ácido cáprico (N-B).

2.4. Caracterização das nanopartículas

2.4.1. Tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ)

Para obtenção do tamanho (diâmetro médio), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ), as suspensões das nanopartículas foram diluídas em água ultrapura (1:100, v/v). O tamanho e o PDI foram obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering*, DLS), utilizando um Zetasizer Nano ZS-90 (Malvern Instruments, Great Malvern, Reino Unido). O potencial zeta (ζ), foi determinado pela técnica de mobilidade eletroforética usando Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, Herrenberg, Alemanha). Esse ensaio foi realizado em triplicata.

2.4.2. Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada em triplicata pela técnica de filtração-centrifugação, conforme descrito por Pereira et al. (2018), com algumas modificações. Para determinar a EE foi preciso determinar o comprimento de onda de máxima absorvância (λ_{\max}) do OE, e construir a curva padrão. O valor de λ_{\max} foi obtido diluindo o OE em metanol, seguida de varredura no espectrofotômetro UV/VIS, onde a absorvância máxima foi detectada em $\lambda = 230$ nm. Por outro lado, a curva padrão foi obtida diluindo o OE nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; e 0,03 mg/mL em metanol, onde o coeficiente de correlação (r^2) foi de 0,994, e a equação: $y = 8,6686x - 0,0049$.

Para a determinação da EE, 500 μ L da suspensão das nanopartículas foram adicionadas em filtros de centrifuga (Ultracel[®]-3k, Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland), seguida pela centrifugação por 40 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi diluído em metanol, seguida pela leitura da absorvância em UV/VIS a 230 nm, e quantificado através da curva padrão. A EE do OE foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Eficiência de encapsulação (EE)} = \frac{\text{ONP} - \text{OS}}{\text{ONP}} * 100$$

Onde: ONP é a quantidade total de OE usada na preparação das nanopartículas (mg/mL), e o OS é a quantidade total de OE no sobrenadante (mg/mL).

2.5. Avaliação da atividade antibacteriana das nanopartículas

2.5.1. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do OE

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) do OE foi determinada em triplicata pelo método de microdiluição de acordo com Chrysargyris et al., (2017), com algumas modificações. Para melhorar a solubilidade do OE em caldo, a solução estoque do OE foi obtida diluindo o OE em caldo BHI contendo Tween 80 (5 mg/mL). O ensaio consistiu inicialmente em diluir em serie (1:1, v/v) o OE nas concentrações de 36000 µg/mL a 70,3 µg/mL, em microtubos de 1,5 mL contendo caldo BHI. Feitas diluições, foram retirados 90 µL de cada diluição para cada poço da microplaca, onde foram adicionados 10 µL de inóculo bacteriano de 10⁵ UFC/mL, resultando em um volume final por poço de 100 µL. A microplaca foi incubada à 37 °C por 24 h. Passado esse período, foi realizado o sub-cultivo de 10 µL de amostra de cada poço sem crescimento visível em placas de ágar BHI, posteriormente incubadas à 37 °C por mais 24 h. O valor da CBM foi definido como a menor concentração de antimicrobiano, sem crescimento bacteriano após o sub-cultivo, e foi expressa em µg/mL. O controle positivo consistiu em caldo BHI e inóculo bacteriano, e o negativo em caldo BHI sem bactéria.

2.5.2. Atividade antibacteriana do óleo essencial encapsulado (N-OE)

A atividade antibacteriana foi avaliada em caldo BHI e em leite ultrapasteurizado integral e desnatado. O óleo essencial encapsulado (N-OE), assim como o livre (OE) foi testado na concentração de 1,8 mg/mL. Essa concentração foi selecionada levando em consideração a liberação gradual do óleo essencial encapsulado, estando o valor de 1,8 mg/mL ligeiramente acima da CBM do micro-organismo menos sensível (*S. Enteritidis* ATCC 13076) ao OE. No caldo BHI, a atividade foi avaliada contra *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, e *Salmonella* Enteritidis. No leite, o efeito foi avaliado somente contra *L. monocytogenes*. A *L. monocytogenes* foi selecionada para o ensaio realizado em sistema modelo (leite) por que diferente dos outros patógenos seus surtos apresentam alta taxa de mortalidade (GANDHI; CHIKINDAS, 2007; ZHU et al., 2017) e é capaz de se multiplicar em condições de refrigeração (BUCHANAN et al., 2017; PINILLA; BRANDELLI, 2016).

Nos três meios a atividade antibacteriana foi avaliada através da curva de crescimento microbiano, conforme descrito por Pinilla e Brandelli (2016), com algumas alterações. O ensaio antibacteriano consistiu em preparar erlenmeyer com 9 mL de meio (caldo ou leite), contendo 1,8 mg/mL do N-OE ou OE, onde foi adicionado 1 mL do inóculo bacteriano (10^5 UFC/mL). De seguida, as preparações foram incubadas em agitador rotativo (150 rpm) a 37 °C por 24 h. As amostras foram coletadas no tempo 0, e após 2, 4, 6, 8, 10 e 24 h de incubação, sendo as contagens das colônias bacterianas foram determinadas em placas de ágar BHI pela técnica de espalhamento. Os resultados das contagens foram expressos na escala logarítmica em UFC/mL. O limite de detecção do método é de 2 log UFC/mL (LE; DESBOIS, 2017; MPOFU et al., 2016). O teste foi realizado em duplicata, e foram feitos dois controles positivos, onde o primeiro consistiu em meio (leite ou caldo BHI) com bactéria e sem adição do antimicrobiano, e o segundo meio (leite ou caldo BHI) com bactéria e nanopartículas sem o OE (N-B).

2.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas através de análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias foram comparados pelo teste de Tukey, sendo consideradas significativas quando $p < 0,05$. O software estatístico utilizado, foi SAS (Versão 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das nanopartículas

A nanoprecipitação, técnica empregada neste estudo, permite obter nanopartículas as quais são designadas de nanocápsulas, quando a estrutura apresenta núcleo, ou nanoesferas, quando não apresentam núcleo (CRUCHO; BARROS, 2017). A adição do óleo na formulação das nanopartículas geralmente induz a formação de nanocápsulas, e na sua ausência formam-se nanoesferas (EL-SAY; EL-SAWY, 2017; PINTO REIS et al., 2006; SANTOS et al., 2014). Nesse estudo foram desenvolvidas nanopartículas de Eudragit® RS100 contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC (N-OE), e as nanopartículas controle, onde o óleo essencial foi substituído por triglicerídeo de ácido cáprico (N-B). A EE, foi determinado logo após a produção, e os restantes parâmetros um dia após a síntese.

3.1.1. Tamanho (diâmetro médio) e índice de polidispersão (PDI)

As N-OE apresentaram um diâmetro médio de partícula de aproximadamente 151 nm, com PDI de 0,08, enquanto as N-B tiveram um tamanho de 148 nm, com PDI de 0,10 (Tabela 1). Valores próximos a estes, foram relatados em outros estudos, situação em que houve o desenvolvimento de nanopartículas com mesma técnica e material de parede, sendo que foram obtidos tamanho de 162 nm e PDI de 0,13 encapsulando óleo de semente de uva (CHAVES et al., 2017), ou tamanho de 170 nm e PDI de 0,14 quando o óleo de coco foi encapsulado (SANTOS et al., 2014). O tamanho das partículas é um fator que influencia diretamente na atividade, sendo que quanto menor o tamanho, maior relação superfície-volume, consequentemente maior ação (GRANATA et al., 2018; PRAKASH et al., 2018). Por outro lado, os valores do PDI são usados para descrever o grau de uniformidade de distribuição de tamanho das partículas (DOS SANTOS et al., 2016). Tendo em conta o critério que considera que valores de PDI inferiores a 0,2 indicativos de uma distribuição estreita (GRANATA et al., 2018), as nanoestruturas deste estudo apresentaram alta uniformidade, como pode ser observado na Figura 1A, onde o gráfico de uma análise das N-OE exibe uma distribuição monomodal.

3.1.2. Potencial zeta (ζ)

O potencial zeta foi determinado pela técnica de mobilidade eletroforética, sendo seu valor para as N-OE de +51,7 mV e para N-B de +54,1 mV (Tabela 1). As nanopartículas de Eudragit® RS100 geralmente apresentam carga positiva devido aos grupos de amônio quaternário presentes na estrutura deste polímero (DALCIN et al., 2019; SANTOS et al., 2014). Valores elevados de ζ , também foram reportados em nanopartículas de Eudragit® RS100 contendo óleo de bergamota ou laranja, onde o ζ esteve entre +39 a +74 mV (FROIIO et al., 2019). Este parâmetro é útil para prever a estabilidade de suspensões coloidais, e o seu valor corresponde à diferença de potencial elétrico entre as nanopartículas e o meio líquido onde estão dispersas (DOS SANTOS et al., 2016). Suspensões com ζ superior a + 30 mV ou inferior a -30 mV são consideradas estáveis, por apresentar maior repulsão entre as partículas, o que evita agregação (DOS SANTOS et al., 2016; LOPES; PINILLA; BRANDELLI, 2019; PINILLA; BRANDELLI, 2016). Nesse âmbito, as formulações produzidas devem exibir alta estabilidade, por apresentar ζ superior a + 30 mV (Figura 1B).

3.1.3. Eficiência de encapsulação (EE)

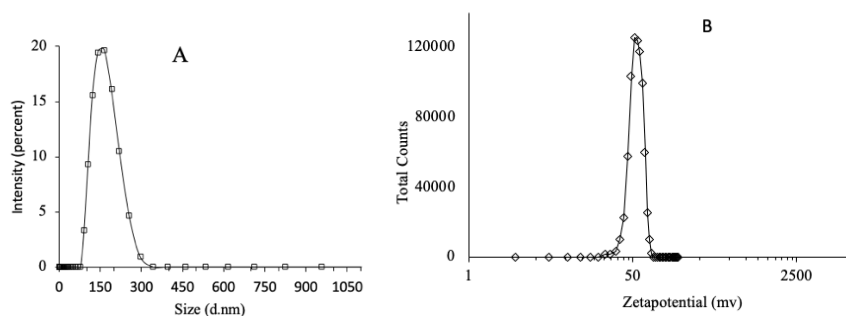
A eficiência de encapsulação, permite estimar quanto material foi encapsulado, e este parâmetro foi determinada pela técnica de filtração-centrifugação. A EE foi alta, tendo se encapsulado 99,4% do OE (Tabela 1). Outros estudos empregando o mesmo método e polímero, obtiveram EE variando de 58% a 96% encapsulando óleo de bergamota ou laranja nas concentrações similares as do estudo, 300 mg e 400 mg (FROIIO et al., 2019), e EE superiores a 99,9%, encapsulando fármaco hidrofóbico (SANTOS et al., 2014). A nanoprecipitação é considerada ideal para encapsular substâncias hidrofóbicas devido a sua baixa difusão na fase aquosa durante a produção (CRUCHO; BARROS, 2017; PINTO REIS et al., 2006). Assim sendo a alta EE observada, foi associada a alta hidrofobicidade do OE.

Tabela 1 - Características físico-químicas de suspensões de nanopartículas contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC (N-OE) e nanopartículas controle (N-B)

Nanopartículas	Parâmetros			
	Tamanho (nm)	PDI	ζ (mV)	EE (%)
N-OE	151,6 ^a ± 2,7	0,08 ^a ± 0,02	+51,7 ^a ± 4,7	99,4
N-B	148,1 ^a ± 1,4	0,10 ^a ± 0,01	+54,1 ^a ± 1,4	-

Legenda: os valores são as médias ± desvios padrão. ^a: representa diferenças significativas entre as colunas ($p < 0,05$). *PDI: Índice de polidispersão; ζ: Potencial zeta; EE: Eficiência de Encapsulação.

Figura 1 - Representação gráfica da distribuição de tamanho (A) e do potencial Zeta (B) das nanopartículas contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC (N-OE)



3.2 Atividade antibacteriana

3.2.1 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os resultados da CBM do OE estão demonstrados na Tabela 2, onde se verificou que *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi a bactéria menos sensível com a CBM de 1125 µg/mL, e *B. cereus* ATCC 9634 foi mais sensível com CBM de 141 µg/mL. Esses achados corroboram com os disponíveis na literatura, que afirmam que as bactérias Gram-negativas são menos susceptíveis a óleos essenciais, por apresentarem além da membrana citoplasmática um membrana externa que pode servir de barreira para as substâncias antimicrobianas (NAZZARO et al., 2013).

Tabela 2 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC (OE).

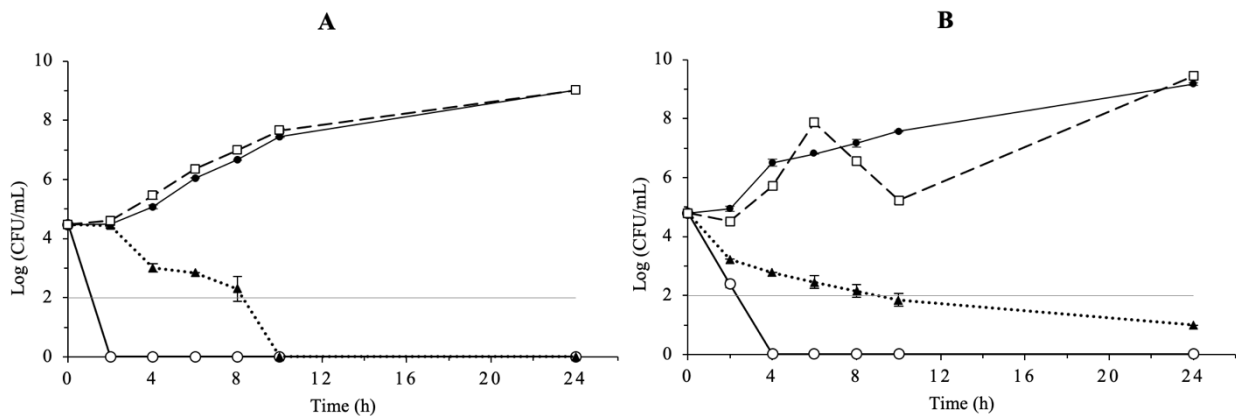
Bactérias	OE (mg/mL)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	0,56
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1901	0,28
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	0,14
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	1,13

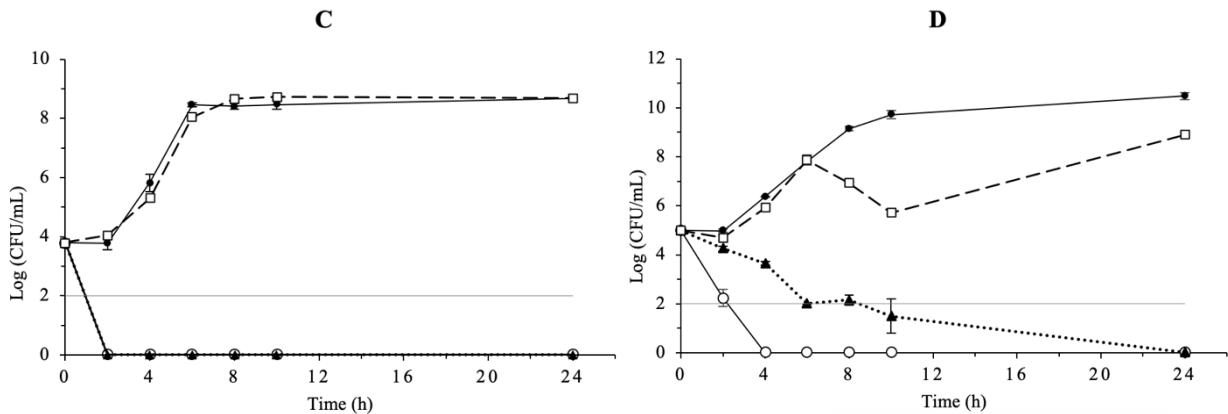
3.2.2 Atividade antimicrobiana das nanopartículas

Em caldo BHI, o efeito do OE e N-OE foi avaliado contra *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, sendo os resultados deste ensaio apresentados na Figura 3. O OE mostrou-se potente agente antibacteriano por não ter se detectado nenhuma célula viável na contagem de *B. cereus* e *L. monocytogenes*, em até 2 h de incubação, e para *S. aureus* e *S. Enteritidis*, em até 4 h de incubação. Por outro lado, a mesma redução pelo N-OE, foi alcançada às 2 h de incubação para *B. cereus*, às 10 h para *L. monocytogenes*, e às 24 h para *S. aureus* e *S. Enteritidis*. A ação do antimicrobiano não encapsulado (livre) foi mais rápida em relação ao antimicrobiano encapsulado, devido a menor disponibilidade, que esta associada à sua liberação gradual (DALCIN et al., 2017). Esse fato explica a ação rápida do OE em relação ao N-OE, sugerindo uma liberação controlada dos compostos antimicrobianos. Nesta análise, foram feitos dois controles positivos, onde o primeiro foi formado por meio contendo bactéria e nanopartículas

controle (N-B), e o segundo por meio contendo bactéria (controle). Nas bactérias tratadas com N-B, não foi observado diferença significativa no crescimento de *B. cereus* e *L. monocytogenes* tratadas com N-B em relação ao grupo controle. Entretanto, foi observado algum efeito inibitório de N-B contra *S. aureus* e *S. Enteritidis*, com redução de 2,3 log e 4 log em relação ao controle, respectivamente, as 10 h. A ligeira ação inibitória das N-B, pode estar relacionada ao Eudragit® RS100, que devido a sua característica catiônica pode interagir facilmente com as bactérias carregadas negativamente, causando danos na parede celular ocasionando a morte (DALCIN et al., 2017; FROIIO et al., 2019). Recentemente, este polímero foi correlacionado a ação antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (DALCIN et al., 2017) e *Escherichia coli* (FROIIO et al., 2019). Nesse cenário, o Eudragit® RS100, como material de parede, além de proteger o material encapsulado, pode ter exercido algum efeito sinérgico na ação antibacteriana do N-OE.

Figura 2 - Efeito do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC livre (OE) e encapsulado (N-OE) no crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A), *S. aureus* ATCC 1901 (B), *B. cereus* ATCC 9634 (C) e *S. Enteritidis* ATCC 13076 (D).





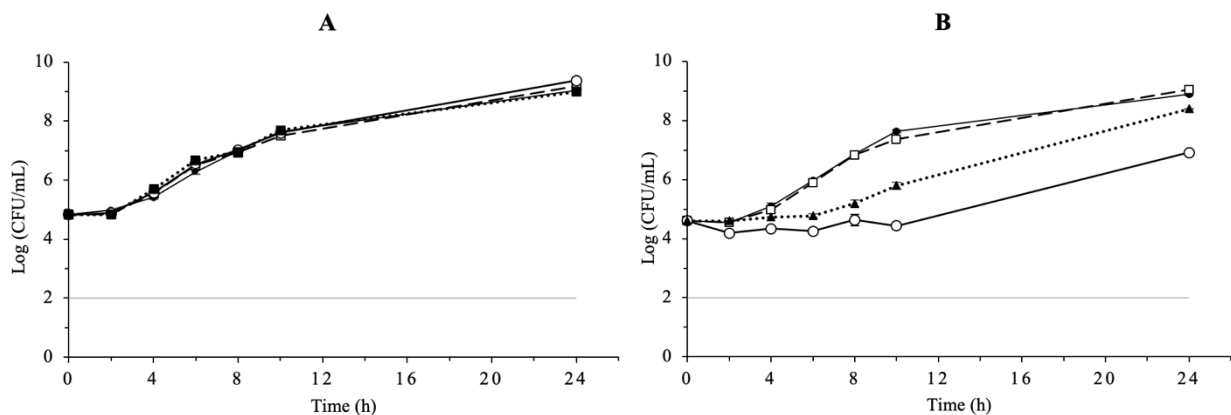
Legenda: curva de crescimento microbiano tratada com N-OE (—○—), OE (---▲---), N-B (---□---). Controle (—●—). Limite de detecção (—).

Em leite integral e desnatado, a ação do OE e das N-OE foi avaliada contra *L. monocytogenes*, e estes resultados são apresentados na Figura 4. No leite integral (3% de gordura) o OE e as N-OE não apresentaram atividade antibacteriana, sendo o crescimento microbiano com estes tratamentos, idêntico aos controles. Por outro lado, no leite desnatado (<0.5% de gordura), o OE e as N-OE, demonstraram atividade bacteriostática pela capacidade de prolongar a fase lag da *L. monocytogenes*. No leite desnatado tratado com OE, a bactéria apresentou crescimento a partir das 10 h, sendo que após 24 h de incubação a redução na contagem de células foi de 2,0 log UFC/mL em relação aos controles. Em contrapartida, o grupo tratado com N-OE, o crescimento iniciou as 6 h de incubação, tendo uma redução de 0,5 UFC/mL em relação aos controles após 24 h. Comparando os resultados da atividade do OE e N-OE em leite com os obtidos em caldo BHI, observa-se claramente uma redução da ação antibacteriana no leite. Comparando os resultados da atividade do OE e N-OE em leite com os obtidos em caldo BHI, observa-se claramente uma redução da ação antibacteriana no leite. A baixa eficácia do OE e do N-OE no leite pode estar associada a composição bastante complexa deste meio em relação ao meio sintético.

O leite é um produto que contém gordura, proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas (PEREIRA, 2014) que podem interagir com as bactérias, OE e nanopartículas comprometendo a atividade antibacteriana. Os componentes da matriz alimentar destacando-se as gorduras e proteínas, interagem com os bioativos presentes nos óleos essenciais reduzindo sua biodisponibilidade, conseqüentemente sua ação (BURT, 2004; CALO et al., 2015; GILL et al., 2002; KHORSHIDIAN et al., 2018). O que está de acordo com os achados deste estudo, onde

verificou-se que os constituintes do leite exerceram efeito negativo na ação antibacteriana do OE, principalmente a gordura por ter se observado melhor ação no leite desnatado em relação ao integral. Alguns autores sugerem que os constituintes do alimento podem induzir a reparação de bactérias danificadas, tornando as células menos susceptíveis aos antimicrobianos (BURT, 2004; GILL et al., 2002). Por outro lado, as interações entre as nanopartículas com moléculas como proteínas, gordura ou carboidratos são possíveis (CAI et al., 2017). No entanto, as relações com as proteínas são as mais estudadas, onde se descreve que estas moléculas se adsorvem na superfície das nanopartículas, formando a proteína corona (BAI et al., 2017; CAI et al., 2017; XIAO; GAO, 2018). A interação entre proteínas e nanopartículas de Eudragit® RS100 resulta na alteração das propriedades físico-químicas destas nanoestruturas (CHAVES et al., 2017). Diante disso, a interação entre as N-OE com os componentes presentes no leite pode ter reduzido a taxa de liberação do óleo essencial pelas N-OE, consequentemente menor concentração do OE disponível, e menor efeito antimicrobiano neste produto. Ademais, não se pode descartar a possibilidade de existir a liberação do OE encapsulado e a posterior interação entre seus compostos com o leite, levando a uma aparente ineficiência das N-OE como sistema de liberação controlada do OE no leite. Entretanto, mesmo em temperatura de abuso (37 °C) houve uma redução de aproximadamente 2 log UFC/mL no número de células viáveis em relação aos controles as 10 h, sugerindo que o sistema apresenta potencial para seu uso como antimicrobiano.

Figura 3 - Efeito do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC livre (OE) e encapsulado (N-OE) no crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 em leite integral (A) e desnatado (B)



Legenda: curva de crescimento microbiano tratada com N-OE (—○—), OE (...▲...), N-B (-□-). Controle (—●—). Limite de detecção (—).

4. CONCLUSÕES

A técnica de nanoprecipitação permitiu desenvolver nanopartículas de Eudragit® RS100 contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC, com ótimas características físico-químicas, e alta eficiência de encapsulação. Essas nanoestruturas demonstraram liberação sustentada, e ótima atividade antimicrobiana quando testadas em caldo BHI. No entanto, o comportamento de liberação controlada não foi observado no leite integral e desnatado, somado a isso, a ação antibacteriana não foi verificada no leite integral, e foi limitada no leite desnatado. A nanoencapsulação é uma tecnologia bastante promissora para o setor de alimentos, em particular na conservação, onde diversos estudos *in vitro* demonstram seu potencial por melhorar a estabilidade, aumentar o efeito antimicrobiano, permitir a liberação controlada, entre outras vantagens. Portanto, são necessárias mais investigações sobre o comportamento das nanoestruturas em relação a cada tipo de componente dos alimentos a fim de determinar as interações que podem dificultar a ação antibacteriana das N-OE.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegbeleye, O.O., Guimarães, J.T., Cruz, A.G., Sant’Ana, A.S., 2018. Hazards of a ‘healthy’ trend? An appraisal of the risks of raw milk consumption and the potential of novel treatment technologies to serve as alternatives to pasteurization. *Trends Food Sci. Technol.* 82, 148–166. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.10.007>
- Alves, F.C.B., Barbosa, L.N., Andrade, B.F.M.T., Albano, M., Furtado, F.B., Marques Pereira, A.F., Rall, V.L.M., Júnior, A.F., 2016. Short communication: Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. *J. Dairy Sci.* 99, 1831–1836. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10025>
- Amatiste, S., Sagratioli, D., Giacinti, G., Rosa, G., Carfora, V., Marri, N., Tammaro, A., Bovi, E., Rosati, R., 2014. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* in fresh

- sheep cheese. *Ital. J. Food Saf.* 3, 148–150. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2014.1696>
- Badri, W., Miladi, K., Nazari, Q.A., Fessi, H., Elaissari, A., 2017. Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 516, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.12.029>
- Bai, X., Liu, F., Liu, Y., Li, C., Wang, S., Zhou, H., Wang, W., Zhu, H., Winkler, D.A., Yan, B., 2017. Toward a systematic exploration of nano-bio interactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 323, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.03.011>
- Bartsch, S.M., Asti, L., Nyathi, S., Spiker, M.L., Lee, B.Y., 2018. Estimated Cost to a Restaurant of a Foodborne Illness Outbreak. *Public Health Rep.* 133, 274–286. <https://doi.org/10.1177/0033354917751129>
- Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C., 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* 75, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cai, K., Wang, A.Z., Yin, L., Cheng, J., 2017. Bio-nano interface: The impact of biological environment on nanomaterials and their delivery properties. *J. Control. Release* 263, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.034>
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Cazella, L.N., Glamoclija, J., Soković, M., Gonçalves, J.E., Linde, G.A., Colauto, N.B., Gazim, Z.C., 2019. Antimicrobial activity of essential oil of *baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) aerial parts at flowering period. *Front. Plant Sci.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00027>
- Chaves, P. dos S., Ourique, A.F., Frank, L.A., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Beck, R.C.R., 2017. Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 114, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.007>
- Chrysargyris, A., Xylia, P., Botsaris, G., Tzortzakis, N., 2017. Antioxidant and antibacterial activities, mineral and essential oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L.) affected by the potassium levels. *Ind. Crops Prod.* 103, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.010>
- Crucho, C.I.C., Barros, M.T., 2017. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables

- and characterization methods. *Mater. Sci. Eng. C* 80, 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>
- Dadar, M., Shahali, Y., Whatmore, A.M., 2019. Human brucellosis caused by raw dairy products: A review on the occurrence, major risk factors and prevention. *Int. J. Food Microbiol.* 292, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.009>
- Dalcin, A.J.F., Santos, C.G., Gündel, S.S., Roggia, I., Raffin, R.P., Ourique, A.F., Santos, R.C.V., Gomes, P., 2017. Anti biofilm effect of dihydromyricetin-loaded nanocapsules on urinary catheter infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 156, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.029>
- Dalcin, A.J.F., Vizzotto, B.S., Bochi, G. V., Guarda, N.S., Nascimento, K., Sagrillo, M.R., Moresco, R.N., Schuch, A.P., Ourique, A.F., Gomes, P., 2019. Nanoencapsulation of the flavonoid dihydromyricetin protects against the genotoxicity and cytotoxicity induced by cationic nanocapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 173, 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.066>
- de Carvalho, R.J., de Souza, G.T., Honório, V.G., de Sousa, J.P., da Conceição, M.L., Maganani, M., de Souza, E.L., 2015. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiol.* 52, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.003>
- de Matos, S.P., Lucca, L.G., Koester, L.S., 2019. Essential oils in nanostructured systems: Challenges in preparation and analytical methods. *Talanta* 195, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.029>
- dos Santos, P.P., Flôres, S.H., de Oliveira Rios, A., Chisté, R.C., 2016. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. *Trends Food Sci. Technol.* 53, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.005>
- El-Say, K.M., El-Sawy, H.S., 2017. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 528, 675–691. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.052>
- FAO, 2019. Food Outlook- Biannual Report on global Food Markets, Global information and early warning system on food and agriculture. Rome. <https://doi.org/10.1044/leader.PPL.19102014.18>
- Froiiio, F., Ginot, L., Paolino, D., Lebaz, N., Bentaher, A., Fessi, H., Elaissari, A., 2019. Essential oils-loaded polymer particles: Preparation, characterization and antimicrobial property. *Polymers (Basel)*. 11, 1017. <https://doi.org/10.3390/polym11061017>
- Gandhi, M., Chikindas, M.L., 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008>

- Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A., 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 83–92. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00712-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00712-7)
- Granata, G., Stracquadanio, S., Leonardi, M., Napoli, E., Consoli, G.M.L., Cafiso, V., Stefani, S., Geraci, C., 2018. Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chem.* 269, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.140>
- Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, E., Mortazavian, A.M., 2018. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 45, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.020>
- Kim, K.S., Park, S.J., 2010. Characterization and release behaviors of porous PCL/Eudragit RS microcapsules containing tulobuterol. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 76, 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.015>
- Kolev, I.N., Ivanova, N., Marinov, M.K., Alexieva, G.E., Strashilov, V.L., 2019. A QCM-based assay of drug content in Eudragit RS 100-based delivery systems. *Talanta* 202, 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.033>
- Le, P.N.T., Desbois, A.P., 2017. Antibacterial effect of eicosapentaenoic acid against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*: Killing kinetics, selection for resistance, and potential cellular target. *Mar. Drugs* 15. <https://doi.org/10.3390/md15110334>
- Lopes, N.A., Barreto Pinilla, C.M., Brandelli, A., 2019. Antimicrobial activity of lysozyme-nisin co-encapsulated in liposomes coated with polysaccharides. *Food Hydrocoll.* 93, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.009>
- Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ruzzi, M., 2017. Raw and Heat-Treated Milk: From Public Health Risks to Nutritional Quality. *Beverages* 3, 54. <https://doi.org/10.3390/beverages3040054>
- Mpofu, A., Linnemann, A.R., Nout, M.J.R., Zwietering, M.H., Smid, E.J., den Besten, H.M.W., 2016. Inactivation of bacterial pathogens in yoba mutandabota, a dairy product fermented with the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* yoba. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.016>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6, 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Oz, M., Lozon, Y., Sultan, A., Yang, K.H.S., Galadari, S., 2015. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. *Pharmacol. Ther.* 152, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.006>
- Patra, C.N., Priya, R., Swain, S., Kumar Jena, G., Panigrahi, K.C., Ghose, D., 2017. Pharmaceutical

- significance of Eudragit: A review. *Futur. J. Pharm. Sci.* 3, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.02.001>
- Pereira, K. de C.P., Quintela, E.D., da Silva, D.J., do Nascimento, V.A., da Rocha, D.V.M., Arruda e Silva, J.F., Forim, M.R., Silva, F.G., de Melo Casal, C., 2018. Characterization of Nanospheres Containing *Zanthoxylum riedelianum* Fruit Essential Oil and Their Insecticidal and Deterrent Activities against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Molecules* 23, 2052.
- Pereira, P.C., 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* 30, 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>
- Pinilla, C.M.B., Brandelli, A., 2016. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 36, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.017>
- Pinto Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P.P., Dubey, N.K., 2018. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control* 89, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.018>
- Ray, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R., 2016. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Biosci.* 13, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>
- Sadiq, F.A., Flint, S., He, G.Q., 2018. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. *Int. Dairy J.* 85, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.003>
- Salazar, G.J.T., de Sousa, J.P., Lima, C.N.F., Lemos, I.C.S., da Silva, A.R.P., de Freitas, T.S., Coutinho, H.D.M., da Silva, L.E., do Amaral, W., Deschamps, C., 2018. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. *Ind. Crops Prod.* 122, 591–595. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.052>
- Santos, S.S., Lorenzoni, A., Pegoraro, N.S., Denardi, L.B., Alves, S.H., Schaffazick, S.R., Cruz, L., 2014. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 116, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.011>
- Silvestre, W.P., Livinalli, N.F., Baldasso, C., Tessaro, I.C., 2019. Pervaporation in the separation of essential oil components: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 93, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.003>

- Weiss, J., Takhistov, P., McClements, D.J., 2006. Functional materials in food nanotechnology. *J. Food Sci.* 71, 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x>
- Xiao, W., Gao, H., 2018. The impact of protein corona on the behavior and targeting capability of nanoparticle-based delivery system. *Int. J. Pharm.* 552, 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.011>
- Zhu, Q., Gooneratne, R., Hussain, M., 2017. *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods* 6, 21. <https://doi.org/10.3390/foods6030021>

6. DISCUSSÃO GERAL

O *B. dracunculifolia* DC é uma planta geralmente utilizada para fins terapêuticos, e nos últimos anos tem sido objeto de estudos a fim de verificar as suas propriedades farmacológicas. Nesse estudo, foi investigada a propriedade antimicrobiana dos bioativos desta planta, como uma potencial fonte de antimicrobianos naturais para serem aplicados em alimentos. Adicionalmente, foram investigadas duas estratégias para melhorar seu uso, onde a primeira consistiu em combinar os bioativos da planta com a nisina, e a segunda em nanoencapsular os bioativos da planta.

A avaliação da propriedade antimicrobiana do *B. dracunculifolia* DC foi realizada, testando a ação do seu EH na concentração de 25 mg/mL, e seu OE puro. O OE e EH demonstram atividade contra diversas cepas de bactérias pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Salmonella* e *Aeromonas*, onde o OE inibiu maior número de cepas, e por este motivo foi selecionado o OE para as etapas posteriores. A ação do OE foi associada aos terpenos, por ser os principais constituintes deste. Por outro lado, a ação do EH, foi associada aos compostos fenólicos, por ser as substâncias geralmente isoladas nesta formulação para esta planta (BÚFALO et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2010; LEMOS et al., 2007).

Em seguida, somente com OE puro, avaliou-se a sensibilidade de culturas bacterianas mistas, utilizando ágar leite como meio de cultivo. Em relação a composição das culturas mistas, algumas foram formadas apenas por cepas sensíveis ao OE, e outras por junção de uma cepa sensível ao OE e outra não sensível ao OE. Neste teste, o OE inibiu as culturas mistas contendo apenas cepas sensíveis, e não inibiu aquelas contendo a cepa resistente. A ausência da suscetibilidade da cultura mista não sensível, foi atribuída a cepa resistente, constatando-se que a presença de mais de um micro-organismo não exerce efeito sobre a suscetibilidade ao OE. Além disso, observou-se que os componentes do leite presente no ágar não interferiram na ação do OE puro sobre as culturas mistas avaliadas.

O OE foi combinado com a nisina com objetivo de potencializar sua ação antimicrobiana, conseqüentemente reduzir seus efeitos organolépticos indesejáveis. Essa análise foi avaliada em caldo BHI, por 24 h a 37 °C, contra *S. aureus* ATCC 1901, *B. cereus* ATCC 9634, *L. monocytogenes* ATCC 7644, e *S. Enteritidis* ATCC 13076. O uso combinado do OE e a nisina

resultou em sinergismo sobre todas cepas, apresentando uma diferença superior a 4 log UFC/mL em relação aos antimicrobianos individuais as 24 h. O OE de *B. dracunculifolia* DC é composto particularmente por terpenos (CAZELLA et al., 2019). Os terpenos assim como a nisina agem na membrana celular, considerando-se que o sinergismo entre estes compostos seja resultado de danos intensos dessa estrutura (POL; SMID, 1999).

OE foi encapsulado em Eudragit® RS100 para melhorar sua estabilidade e solubilidade, permitir liberação controlada, e reduzir a interação com os componentes do alimento. As nanopartículas foram produzidas pela técnica de nanoprecipitação, sendo na sequência caracterizadas e testado seu efeito antimicrobiano. As N-OE foram caracterizadas quanto ao tamanho, PDI, potencial zeta e EE. O tamanho achado foi de 151 nm, o que proporciona maior relação superfície-volume, e possivelmente maior ação antimicrobiana (GRANATA et al., 2018; PRAKASH et al., 2018). Além disso, a distribuição do tamanho foi uniforme, apresentando valor de PDI de 0,08, onde geralmente se considera valores de PDI inferiores a 0,2 indicativos de uma distribuição de tamanho estreita (GRANATA et al., 2018). O potencial zeta foi +51,7 mV, sendo essa carga positiva atribuída aos grupos de amônio quaternário presentes na estrutura de Eudragit® RS100 (DALCIN et al., 2019; SANTOS et al., 2014), e o valor encontrado indica que as estruturas tem alta estabilidade, pois as suspensões coloidais com potencial zeta superior a + 30 mV, são consideradas estáveis devido a maior repulsão entre as partículas, evitando agregação (DOS SANTOS et al., 2016; LOPES; PINILLA; BRANDELLI, 2019). A EE foi alta, tendo sido alcançada aproximadamente 99,4% de encapsulação do OE. A alta EE foi associada a técnica empregada, sendo a nanoprecipitação considerada ótima para encapsular substâncias hidrofóbicas devido a sua baixa difusão destas na fase aquosa, durante a produção (CRUCHO; BARROS, 2017; PINTO REIS et al., 2006, SANTOS et al., 2014).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC encapsulado (N-OE) e livre (OE), foi avaliada na concentração de 1,8 mg/mL, através da curva de crescimento microbiano em caldo BHI, leite integral, e leite desnatado a 37 °C por 24 h. Em BHI, a atividade foi testada contra *S. aureus* ATCC 1901, *B. cereus* ATCC 9634, *L. monocytogenes* ATCC 7644, e *S. Enteritidis* ATCC 13076. Nesse meio de cultivo, OE reduziu a contagem de colônias para todas cepas até abaixo do limite de detecção do método (1 log UFC/mL) até as 4 h, e a mesma redução pelo N-OE, foi alcançada às 24 h. A lenta ação do N-OE em relação ao OE pode ser explicado pela

liberação controlada dos bioativos encapsulados (DALCIN et al., 2017). Por outro lado, no leite foi avaliada apenas contra *L. monocytogenes* ATCC 7644. No que no leite integral (3% de gordura), o OE e as N-OE não demonstraram efeito antimicrobiano. Já no leite desnatado (<0.5% de gordura), o OE e as N-OE, prolongaram a fase lag da bactéria e OE foi o mais ativo por apresentar uma redução na contagem de células de 2,0 UFC/mL após 24 h em relação a controle. Comparando a atividade antimicrobiana do N-O e OE no BHI e no caldo, verificou-se que o efeito no leite foi menor. A menor ação do OE nessa matriz foi associada a interação dos seus bioativos com os componentes do alimento (CALO et al., 2015; KHORSHIDIAN et al., 2018) destacando-se as gorduras, pelo fato da redução do efeito ter sido severo no leite integral. A redução do efeito do N-OE também foi associada a composição complexa do leite. Sugere-se que constituintes do alimento podem ter induzido a reparação de bactérias danificadas, tornando as células menos sensíveis aos antimicrobianos (BURT, 2004; GILL et al., 2002). Por outro lado, os constituintes do leite podem ter interferido na liberação dos bioativos, tendo já sido reportado que as nanopartículas de Eudragit® RS100 interagem com proteínas, causando alterações nas suas propriedades físico-químicas (CHAVES et al., 2017). Além disso, não se pode descartar a possibilidade de existir a liberação do OE encapsulado e a posterior interação entre seus compostos com o leite, levando a uma aparente ineficiência das N-OE como sistema de liberação controlada do OE no leite. Entretanto, no leite desnatado, mesmo na temperatura de abuso (37 °C), as N-OE inibiram o crescimento da *L. monocytogenes* até as 10 h, onde a redução foi de 2 log UFC/mL em relação aos controles, sugerindo que o sistema apresenta potencial para o uso como antimicrobiano.

7. CONCLUSÕES GERAIS

OE e EH de *B. dracunculifolia* DC possuem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o que torna esta planta uma potencial fonte de antimicrobianos naturais para serem aplicados em alimentos. O efeito do OE contra culturas mistas em ágar leite, mostra que a presença de mais de um micro-organismos não interfere na ação do OE. Os resultados do uso combinado do OE com nisina, mostram que a nisina potencializa a atividade do OE, podendo se considerar este efeito uma estratégia para minimizar os efeitos organolépticos indesejáveis do OE, quando aplicados em alimentos.

A técnica de nanoprecipitação, permitiu produzir nanopartículas de Eudragit® RS100 carregadas de OE, com ótimas características físico químicas, alta eficiência de encapsulação, e com efeito antimicrobiano. Estas nanopartículas apresentaram tamanho <155 nm, PDI $<0,2$, $\zeta > +30$, EE $>99\%$, o que indica que as nanoestruturas apresentaram tamanho pequeno, com distribuição de tamanho estreita, alta estabilidade e alta eficiência de encapsulação, respectivamente. Os resultados da atividade antimicrobiana das nanopartículas em meio sintético, mostram que este sistema permite a mistura entre compostos hidrofóbicos e hidrofílicos; permite proteger os bioativos das diversas condições desfavoráveis do meio ambiente, e permite a liberação controlada dos bioativos encapsulados. No entanto, devido a redução do efeito antimicrobiano observado no leite, sugerem-se mais estudos sobre as interações entre as essas nanoestruturas com os componentes da matriz alimentar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, p. 177–183, 2014.
- AIJUKA, M.; BUYS, E. M. Persistence of foodborne diarrheagenic *Escherichia coli* in the agricultural and food production environment: Implications for food safety and public health. **Food Microbiology**, v. 82, p. 363–370, 2019.
- ALEGBELEYE, O. O. et al. Hazards of a ‘healthy’ trend? An appraisal of the risks of raw milk consumption and the potential of novel treatment technologies to serve as alternatives to pasteurization. **Trends in Food Science and Technology**, v. 82, p. 148–166, 2018.
- ALLEN, K. J. *et al.* *Listeria monocytogenes* - An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v. 54, p. 178-189, 2016.
- ALNAIZY, R.; AKGERMAN, A. Advanced oxidation of phenolic compounds. **Advances in Environmental Research**, v. 4, p. 233–244, 2000.
- ALVAREZ-SIEIRO, P. *et al.* Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 2939–2951, 2016.
- ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 16, 2015.
- ANULIKA, N. P. *et al.* The Chemistry Of Natural Product: Plant Secondary Metabolites. **International Journal Of Technology Enhancements And Emerging Engineering Research**, v. 4, p. 2347–4289, 2016.
- ARRIEL, D. A. A. *et al.* Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology**, v. 44, n. 4, p. 255–265, 2014.
- AZHAR, S. H. M. *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.
- AZMIR, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426–436, 2013.
- BADRI, W. *et al.* Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 516, p. 238–244, 2017.
- BARROSO, G. M. *Compositae – Subtribo Baccharidinae Hoffmann – Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. Rodriguésia*, v.28, p.1–273, 1976

BEATTIE, S. H.; WILLIAMS, A. G. Bacillus: Detection of Toxins. **Encyclopedia of Food Microbiology**, 2nd ed, Elsevier, p. 144–150, 2014.

BENIE, C. K. D. et al. Characterization of virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine meat, fresh fish, and smoked fish . **European Journal of Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 55–64, 2017.

BINTSIS, T. Lactic acid bacteria: their applications in foods. **Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access**, v.6, p. 89–94, 2018.

BOURDICHON, F. *et al.* Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology journal**, v.164, p. 87-97, 2012.

BRANDELLI, A.; LOPES, N. A.; BOELTER, J. F. Food applications of nanostructured antimicrobials. In: GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). **Nanotechnology in the Agri-Food Industry**. London: Elsevier, 2017. v. 6p. 35–74.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5mg/kg. **Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Portaria%2Bn%2B29%2Bde%2B22%2Bde%2Bjaneiro%2Bde%2B1996.pdf/8b0c3906-aa5b-4f16-ad1c-544b7c9e2586>>. Acesso em: 20 out. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução- RDC nº 272, de 14 de março de 2019**. Aditivos alimentares para uso em carnes e produtos cárneos, suas respectivas funções, limites máximos e condições de uso. 2019b. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3437262/RDC_272_2019_.pdf/b39e2979-4b68-4f9c-adbd-d8be6c0be543>. Acesso em: 20 out. 2019.

BRASIL. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil Informe 2018. **Ministério da Saúde**. 2019a Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta---o-Surtos-DTA--Fevereiro-2019.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2019.

BUCHANAN, R. L. *et al.* A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 75, p. 1-13, 2017.

BÚFALO, M. C. *et al.* Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1669–1680, 2009.

BURKEPILE, D. E. *et al.* Chemically mediated competition between microbes and animals: microbes as consumers in food webs. **Ecology**, v. 87, p. 2821–2831, 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a

review. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 94, p. 223–253, 2004.

CADORET, F. *et al.* Noncontiguous finished genome sequences and description of *Bacillus massiliglaeici*, *Bacillus mediterraneensis*, *Bacillus massilinigleriensis*, *Bacillus phocaeensis* and *Bacillus tuaregi*, five new species identified by culturomics. **New Microbes and New Infections**, v. 19, p. 45–59, 2017.

CALDERA, L. *et al.* Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. October, p. 142–153, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.004>>

CALO, J. R. *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.

CAMPOS, F. R. *et al.* *Baccharis* (Asteraceae): Chemical Constituents and Biological Activities Chemistry and Biodiversity. **Chem. Biodiversity**, v. 13, p. 1-17, 2016.

CAZELLA, L. N. *et al.* Antimicrobial activity of essential oil of *baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) aerial parts at flowering period. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 27, 2019.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Foodborne Illnesses and Germs. **Centers for Disease Control and Prevention**, update 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>>. Acesso em: 20 out. 2019.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations. **Centers for Disease Control and Prevention**, update 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>>. Acesso em: 20 out. 2019.

CESTARI, S. H.; BASTOS, J. K.; DI STASI, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of *baccharis dracunculifolia* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

CHAI, W. T. *et al.* First report of *Erwinia psidii* associated with papaya dieback disease in Malaysia. **Malaysian Journal of Microbiology**. v. 13, p. 20–25, 2017.

CHAVES, P. dos S. *et al.* Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 88–95, 2017.

CHEN, H.; HOOVER, D. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 82–100, 2003.

CHENG, Y. *et al.* Decomposition of Five Phenolic Compounds in High Temperature Water. **Article J. Braz. Chem. Soc**, v. 25, n. 11, p. 2102–2107, 2014.

CHIKINDAS, M. L. *et al.* Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 23–28, 2018.

COPETTI, M. Yeasts and molds in fermented food production: an ancient bioprocess. **Current Opinion in Food Science**, v. 25, p. 57–61, 2019.

COUTINHO, T. A. *et al.* A new shoot and stem disease of eucalyptus species caused by erwinia psidii. **Australasian Plant Pathology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 55–60, 2011.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 771–784, 2017.

DALCIN, A. J. F. *et al.* Nanoencapsulation of the flavonoid dihydromyricetin protects against the genotoxicity and cytotoxicity induced by cationic nanocapsules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 798–805, 2019.

DALCIN, A. J.; OURIQUE, A. F.; GOMES, P. Cationic Nanocapsules Containing Eudragit Rs100 ® and Its Potential for Application in Nanomedicine 1. **Disciplinarum Scientia**, v. 18, p. 545–566, 2017.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v. 17, p. 474–483, 2006.

DAVIDSON, P. M.; BRANEN A.L. Food Antimicrobials — An Introduction. In: DAVIDSON. P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. **Antimicrobials in food**. 3rd ed, 2005. Chap. 1, p. 1–13.

DE ABREU, A. P. P.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* d. C. (asteraceae). **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, v. 5, p. 1–6, 2010.

DE ALENCAR, S. M. *et al.* Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of. **Ciência Rural**, v. 35, p. 909–915, 2005.

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

DE ASSIS LAGE, T. C. *et al.* Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 24–29, 2015.

DE FRANCISCO, L. *et al.* Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-product. **Food Research International**, v. 105, p. 537–547, 2018.

- DENAYER, S. *et al.* Food-borne outbreak investigation and molecular typing: High diversity of *Staphylococcus aureus* strains and importance of toxin detection. **Toxins**, v. 9, p. 1–13, 2017.
- DOS SANTOS, D. A. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 543-550, 2010.
- DOS SANTOS, P. P. *et al.* Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 53, p. 23–33, 2016.
- DUARTE, M. C. T. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 06–08, 2004.
- EFSA; ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**. v. 16, p. 262, 2018.
- EGAN, K. *et al.* Bacteriocins: Novel solutions to age old spore-related problems? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. April, p. 461, 2016.
- EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, p. 675–691, 2017.
- ELSHAGHABEE, F. M. F. *et al.* *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. AUG, p. 1–15, 2017.
- FAO. **Global food losses and food waste - Extent, causes and prevention**. Roma, 2011.
- FAO/WHO. **Evaluation of certain food additives and contaminants: Seventy-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Roma, 2013.
- FATHI, M.; MARTÍN, Á.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, p. 18–39, 2014.
- FDA. **Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**. 2nd ed. *Listeria monocytogenes*. 2012. Atualizado em 24 de outubro de 2017.
- FIELD, D. *et al.* Nisin in Combination with Cinnamaldehyde and EDTA to Control Growth of *Escherichia coli* Strains of Swine Origin. **Antibiotics**, v. 6, p. 35, 2017.
- FIELD, D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 1–6, 2018.

- FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G. *et al.* M. *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) selectively modulates the effector functions of human neutrophils. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. August, p. 1829–1845, 2017.
- FIRA, D. *et al.* Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 44–55, 2018.
- FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2101–2110, 2000.
- FROIIO, F. *et al.* Essential oils-loaded polymer particles: Preparation, characterization and antimicrobial property. **Polymers**, v. 11, p. 1017, 2019.
- GALLOCCCHIO, F.; BELLUCO, S.; RICCI, A. Nanotechnology and Food: Brief Overview of the Current Scenario. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 85–88, 2015.
- GILL, A. O. *et al.* Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 83–92, 2002.
- GOMES, T. A. T. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3–30, 2016.
- GOMES, V.; FERNANDES, G. W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* d.c. (Asteraceae). **Acta bot. bras.** v. 16, p. 421–427, 2002
- GOVARIS, A. *et al.* The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 175–180, 2010.
- GRAM, L. *et al.* Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 79–97, 2002.
- GRANATA, G. *et al.* Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. **Food Chemistry**, v. 269, p. 286–292, 2018.
- GRANUM, P. E.; STENFORS ARNESEN, L.; FROM, C. Bacteria: *Bacillus cereus* and Other Pathogenic *Bacillus* Species. **Encyclopedia of Food Safety**, Elsevier, v. 1, p. 356–364, 2014.
- HÉCHARD, Y.; SAHL, H. G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie**, v. 84, p. 545–557, 2002.
- HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 815–836, 2012.

HOWELL, K. Spoilage: Yeast Spoilage of Food and Beverages. **Encyclopedia of Food and Health**, Elsevier, p. 113–117, 2016.

HUGAS, M.; BELOEIL, P. A. Controlling salmonella along the food chain in the European Union - Progress over the last ten years. **Eurosurveillance**, v. 19, p. 1–4, 2014.

IGBINOSA, I. H. *et al.* Emerging Aeromonas species infections and their significance in public health. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–13, 2012.

Instituto de Biociência-Universidade de São Paulo. **Flora da cerra do cipó minas gerais: Baccharis dracunculifolia DC.** Disponível em: <https://www.ib.usp.br/botanica/serradocipo/angiosperma/245-asteraceae/astereae/2315-baccharis-dracunculifolia-dc.html>. Acesso em: 31 ago.18.

JARVIS, N. A. *et al.* A review of minimal and defined media for growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 66, p. 256–269, 2016.

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

KADIAN, S. S.; HARIKUMAR, S. L. Eudragit and its Pharmaceutical Significance. **Eudragit and its Pharmaceutical Significance**, v. 247667, p. 17, 2009.

KHAYYAT, S. A.; SELVA ROSELIN, L. Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 22, p. 855–875, 2018.

KHORSHIDIAN, N. *et al.* Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 45, n. September 2017, p. 62–72, 2018.

KIM, K. S.; PARK, S. J. Characterization and release behaviors of porous PCL/Eudragit RS microcapsules containing tulobuterol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, p. 404–409, 2010.

KIMURA, K.; YOKOYAMA, S. Trends in the application of Bacillus in fermented foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 36–42, 2019.

KOEHBACH, J.; CRAIK, D. J. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 40, p. 517–528, 2019.

KOLEV, I. N. *et al.* A QCM-based assay of drug content in Eudragit RS 100-based delivery systems. **Talanta**, v. 202, p. 531–539, 2019.

- KVASNICKOVA, E. *et al.* Evaluation of baicalein, chitosan and usnic acid effect on *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* biofilm using a Cellavista device. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 106–112, 2015.
- LAMAS, A. *et al.* A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. **Microbiological Research**, v. 206, p. 60–73, 2018.
- LEMOS, M. *et al.* F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 603–608, 2007.
- LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M. Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism. **Plant Science**, v. 176, p. 161–169, 2009.
- LEYVA-GÓMEZ, G. *et al.* Approaches in polymeric nanoparticles for vaginal drug delivery: A review of the state of the art. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1–19, 2018.
- LIBRANDO, V.; TRINGALI, G. Atmospheric fate of OH initiated oxidation of terpenes. Reaction mechanism of α -pinene degradation and secondary organic aerosol formation. **Journal of Environmental Management**, v. 75, p. 275–282, 2005.
- LOPES, N. A.; BARRETO PINILLA, C. M.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of lysozyme-nisin co-encapsulated in liposomes coated with polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 93, n. January, p. 1–9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.009>>
- LOVEDAY, H. P. *et al.* Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: A rapid systematic review. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 7–15, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.010>>
- MARÓTI, G. *et al.* Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 363–374, 2011.
- MARQUES, A. S. A. *et al.* Guava bacterial blight due to *Erwinia psidii*: Incidence levels and epidemiological aspects. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 488–493, 2007.
- MASSIGNANI, J. J. *et al.* De. Antiulcerogenic Activity of the Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* on Different Experimental Models in Rats. **Phytotherapy research**. v. 1360, p. 1355–1360, 2009.
- MELINI, F. *et al.* Raw and Heat-Treated Milk: From Public Health Risks to Nutritional Quality. **Beverages**, v. 3, n. 4, p. 54, 2017

MEUNIER-GODDIK, L.; SANDRA, S. Liquid Milk Products: **Pasteurized Milk. Reference Module in Food Sciences**, Elsevier, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00876-3>> Acesso em: 31 ago.19.

MORAIS, L.A.S.; CASTANHA, R.F. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja (*Baccharis* sp.) coletadas em Paty do Alferes – Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.13, p.628-632, 2011.

MÜLLER-AUFFERMANN, K. *et al.* Nisin and its usage in breweries: A review and discussion. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, p. 309–319, 2015.

NAIR M. S. *et al.* Antimicrobial Food Additives and Disinfectants: Mode of Action and Microbial Resistance Mechanisms. in: SINGH, O. V. **Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance**. John Wiley & Sons, 2017. Chap. 10, p. 275 -301.

NÚÑEZ-MONTERO, K. *et al.* *Listeria costaricensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 844-850, 2018

O'CONNOR, P. M. *et al.* Nisin H is a new nisin variant produced by the gut-derived strain streptococcus hyointestinalis DPC6484. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 3953–3960, 2015.

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

PATRA, C. N. *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 33–45, 2017.

PEREIRA, C. A. *et al.* Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Journal of Infection and Public Health**, v. 9, p. 324-330, 2016.

PEREIRA, C. A. *et al.* Enzymatic Activity, Sensitivity to Antifungal Drugs and *Baccharis dracunculifolia* Essential Oil by *Candida* Strains Isolated from the Oral Cavities of Breastfeeding Infants and in Their Mothers' Mouths and Nipples. **Mycopathologia**, v. 171, p. 103–109, 2011.

Petruzzi, L. *et al.* Microbial Spoilage of Foods: Fundamentals. In: BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. **The Microbiological Quality of Food Foodborne Spoilers**. Italy: Elsevier, 2017. Chap. 1, p. 2.

PINILLA, C. M. B.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 287–293, 2016.

PINTO REIS, C. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 8–21, 2006.

- PISOSCHI, A. M. *et al.* An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922–935, 2018.
- POL, I. E.; SMID, E. J. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 166–170, 1999.
- PRAKASH, B. *et al.* Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1–11, 2018.
- RAI, A. K. *et al.* Production of bioactive protein hydrolysate using the yeasts isolated from soft chhurpi. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 219, n. July, p. 239–245, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.129>>
- RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A. Typing and virulence factors of food-borne *Candida* spp. isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 279, p. 57–63, 2018.
- RAPOSO, A. *et al.* Food Spoilage by *Pseudomonas* spp.—An Overview. In: SINGH, O. V (Ed.). **Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2017. p. 41–58.
- RAWAT, S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 5, p. 47–56, 2015.
- RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76–83, 2016.
- REDDY, L. H.; COUVREUR, P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1412–1426, 2009.
- REDERO, M. *et al.* Susceptibility to R-pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 73, n. 10, p. 2770–2776, 2018.
- RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C.F.; YAMASHIRO, T. A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.12, p.345–350. 1987.
- RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, D. M. Bacteria: *Aeromonas*. **Encyclopedia of Food Safety**, Elsevier, v. 1, p. 342–343, 2014.
- SADIQ, F. A.; FLINT, S.; HE, G. Q. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 85, p. 159–168, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.003>>
- SAIKIA, D. *et al.* Hypocholesterolemic activity of indigenous probiotic isolate *Saccharomyces cerevisiae* ARDMC1 in a rat model. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, p. 154–162, 2018.

- SALAZAR, G. J. T. *et al.* Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 591–595, 2018.
- SANTOS, S. S. *et al.* Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270–276, 2014.
- SAUDERS, B. D. *et al.* Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4420–4433, 2012.
- SCHROTH, M. N. *et al.* Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural areas. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 8, p. 1191–1201, 2018.
- SHAHBAZI, Y. *Ziziphora clinopodioides* Essential Oil and Nisin as Potential Antimicrobial Agents against *Escherichia coli* O157:H7 in Doogh (Iranian Yoghurt Drink). **Journal of Pathogens**, v. 2015, p. 1–7, 2015.
- SHIN, J. M. *et al.* Biomedical applications of nisin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 1449–1465, 2016.
- SHIN, J. M. *et al.* Biomedical applications of nisin. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 120, n. 6, p. 1449–1465, 2016.
- SIEDLER, S.; BALTI, R.; NEVES, A. R. Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 138–146, 2019.
- SILVA, C. C. G.; SILVA, S. P. M.; RIBEIRO, S. C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 594, 2018.
- SOLOMAKOS, N. *et al.* The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 120–127, 2008.
- STENFORS ARNESEN, L. P.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 579–606, 2008.
- TORTORA, J. G.; FUNKE, R. B., CASE, C. L. **Microbiologia**. 10^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 714.
- VEIGA, R. S. *et al.* Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, p. 911–920, 2017.
- VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary

metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, p. 105–113, 2015.

VIDAL, L. *et al.* Relationship between astringency and phenolic composition of commercial Uruguayan Tannat wines: Application of boosted regression trees. **Food Research International**, v. 112, p. 25–37, 2018.

VINCEKOVIĆ, M. *et al.* Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. **Trends in Food Science and Technology**, v. 69, p. 1–12, 2017.

WEERAWATANAKORN, M. *et al.* Reactivity and stability of selected flavor compounds. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 176–190, 2015.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, D. J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 107–116, 2006.

WIEDEMANN, I. *et al.* Lipid II-based antimicrobial activity of the lantibiotic plantaricin C. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2809–2814, 2006.

WILLIAMS, G. C.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2nd ed, Elsevier, p. 4128–4135, 2003.

WORAPRAYOTE, W. *et al.* Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, v. 120, p. 118–132, 2016.

World Health Organization (WHO). E. coli. **World Health Organization**, update 2018 (2018b). Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>>. Acesso em: 20 out. 2019.

World Health Organization (WHO). Food safety. **World Health Organization**, update 2019 (2019). Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>. Acesso em: 20 out. 2019

World Health Organization (WHO). Listeriosis. **World Health Organization**, update 2018 (2018a). Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>>. Acesso em: 20 out. 2019.

World Health Organization (WHO). Salmonella (non-typhoidal). **World Health Organization**, update 2018 (2018c). Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))>. Acesso em: 20 out. 2019

World Health Organization (WHO). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. **World Health Organization**, Geneva, 2015. Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail/who-estimates-of-the-global-burden-of-foodborne-diseases>>. Acesso em: 15 out. 2019.

ZAYNAB, M. *et al.* Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 198–202, 2018.

ZHU, Q.; GOONERATNE, R.; HUSSAIN, M. *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. **Foods**, v. 6, p. 21, 2017.