



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ISABELA MOTTA FELÍCIO**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA NANOEMULSIONADO CONTENDO ÓLEO  
DE CARVACROL COMO ADITIVO ALIMENTAR ANTIMICROBIANO**

**CAMPINA GRANDE - PB**

**2020**

**ISABELA MOTTA FELÍCIO**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA NANOEMULSIONADO CONTENDO ÓLEO  
DE CARVACROL COMO ADITIVO ALIMENTAR ANTIMICROBIANO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

**Co-orientador:** Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

**CAMPINA GRANDE - PB**

**2020**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

F314d Felício, Isabela Motta.  
Desenvolvimento de sistema nanoemulsionado contendo óleo de carvacrol como aditivo alimentar antimicrobiano [manuscrito] / Isabela Motta Felício. - 2020.  
81 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2020.  
"Orientação : Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira , Departamento de Biologia - CCBS."  
"Coorientação: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura , Departamento de Farmácia - CCBS."  
1. Nanoemulsão. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Óleo de Carvacrol. 4. Patógenos alimentares. I. Título  
21. ed. CDD 615.1

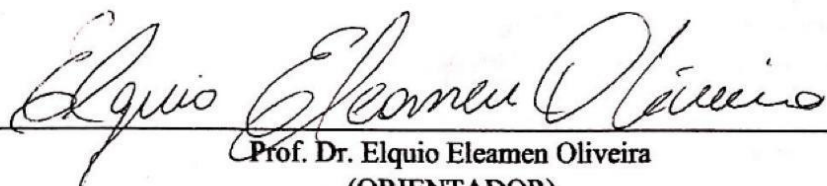
**ISABELA MOTTA FELÍCIO**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA NANOEMULSIONADO CONTENDO ÓLEO  
DE CARVACROL COMO ADITIVO ALIMENTAR ANTIMICROBIANO**

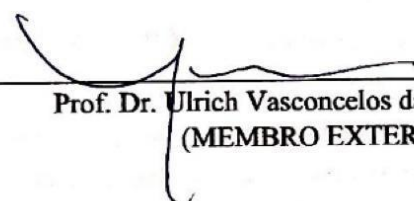
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 04 de março de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira  
(ORIENTADOR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano  
(MEMBRO INTERNO)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
(MEMBRO EXTERNO)

A minha mãe, meu pai e minha  
irmã. DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me iluminado todos esses anos, me dando forças e sabedoria para todos os desafios vencidos. Agradeço também ao meu Guia Espiritual por toda companhia e proteção.

Agradeço à minha família, a meus pais, Maria do Carmo e Irineu por todo investimento, dedicação, amor, carinho e paciência.

À minha irmã Melissa, a melhor parte de mim, minha companheira e parceira, minha melhor amiga que há anos tem compartilhado comigo esse amor que vai além dessa vida.

Agradeço também à minha vó Nevinha e à minha tia Norma por todas as orações e torcida para chegar até aqui.

Aos meus primos, Mariana, Flávia e Eduardo, que mesmo eu não estando em todos os momentos de família, me faziam sentir mais próxima com todas as conversas e fotos compartilhadas. Eu amo muito vocês!

Aos professores, em especial meu orientador, Prof. Elquio Eleamen Oliveira, pela orientação, ensinamentos, confiança e discussões. Sou extremamente grata por todo o incentivo na busca de novos conhecimentos.

Ao meu co-orientador, Prof. Ricardo Olímpio de Moura, por ter acreditado em mim e por me incentivar desde o primeiro momento em que entrei no Mestrado, levarei seus ensinamentos por toda vida.

Aos meus amigos que me ajudaram a chegar até aqui, em especial Rafael e Camila que me ajudaram em experimentos, discussões, dúvidas e trabalhos durante essa jornada, sem contar os momentos que me proporcionaram calma com suas palavras. Meu muito obrigada!

A todos os colegas do LSVM-UEPB, pela parceria durante o Mestrado. Agradeço também a todos os colegas do LASID-UFRN, pela paciência e ajuda nos experimentos.

A meus amigos que acompanham essa minha jornada há anos, o grupo Chora Aurora, formado na época da Faculdade e que permanece o amor e amizade durante todo esse tempo. Obrigada pelos incentivos, conversas, risadas e aprendizados. Vocês são demais!

Agradeço também a minha segunda família formada na cidade de João Pessoa, minha amiga Vivian por todos os momentos, conselhos e conversas; e Natan, meu melhor amigo e irmão de alma, por todas as risadas, conversas, abraços e beijos.

Agradeço também a meu amigo Alisson, por fazer com que os momentos se tornassem mais leves com seu jeito, sempre arrancando um sorriso meu.

Ao meu amigo Vouban, amigo que ganhei no ano 2019 e que se tornou alguém tão especial. Obrigada por todas as risadas, conversas e momentos juntos. Você é incrível.

Ao casal que me conquistou, Amanda e Lucas, vocês são incríveis. Obrigada pela ajuda, conversas e alegrias compartilhadas.

E por último, e não menos importante, ao meu namorado, Matheus, meu amor, companheiro e parceiro. Obrigada por todo incentivo, ajuda, conselho, paciência, carinho, afeto e cuidado. Obrigada por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis. Você faz a minha vida mais leve. Amo você!

À secretaria PPGCF, aos funcionários e ao departamento de Farmácia da UEPB e a CAPES pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que, diretamente ou indiretamente, me ajudaram para a realização dessa dissertação, meu muito obrigada.

“Eu que já não sou assim  
Muito de ganhar  
Junto as mãos ao meu redor  
Faço o melhor que sou capaz  
Só pra viver em paz.”  
*O Vencedor, Los Hermanos*



## RESUMO

Nas últimas décadas, a resistência microbiana frente aos antibacterianos tornou-se um sério risco a saúde coletiva, fenômeno esse decorrente do uso indiscriminado de antibióticos por instituições de saúde, população, na agropecuária e na agricultura, ou de recombinação gênica ou mutação entre as espécies. Com a resistência bacteriana patógenos alimentares são uma grande preocupação para a indústria de alimentos, consumidores e autoridades de segurança. O uso de bioativos derivados de metabolismo secundário dos vegetais correspondem uma alternativa viável, como é o caso do óleo de Carvacrol (CV), um monoterpene fenólico com atividade antimicrobiana comprovada. No entanto, características, como sua hidrofobia, facilidade de oxidação, instabilidade na presença de luz, calor e umidade, podem limitar sua aplicação como aditivo alimentar. Com isso, o uso de sistemas emulsionados, como as nanoemulsão (NEs) surgem como uma alternativa, afim de aumentar a estabilidade desses compostos e aumentar sua solubilidade. Além do mais, a escolha de sistemas nanoemulsionados como agentes antimicrobianos é importante, pois esses interagem com as membranas das células microbianas, fazendo com que interrompa o crescimento das mesmas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana frente as bactérias *Staphylococcus aureus* UFPEDA02, *Escherichia coli* UFPEDA224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416, *Salmonella enteritidis* ATCC13076 e *Salmonella typhimurium* ATCC14028 de uma NE contendo CV. Para obtenção de uma NE estável, primeiramente foi realizado um estudo de identificação de HLB do CV pelo método de microemultócrita, assim ao final encontrou-se um valor de HLB de 11 para o CV empregado neste estudo. Em seguida, foi realizado um estudo para se obter uma NE com uma maior estabilidade, para isso variou-se as proporções de CV (3 e 5%), surfactantes (uma mistura de Tween 80® e Span 80®) (2, 5 e 9%) e água (86, 88, 90, 92 e 95%). Das NEs preparadas, apenas a com 3% de óleo, 9% de surfactante e 88% de água (NECV) permaneceu estável por até 90 dias. A metodologia de alta energia de emulsificação foi utilizada para obtenção dos sistemas, onde as NEs passaram por quatro ciclos de homogeneização no aparelho de sonicação e banho de ultrassom. A quantidade de óleo no sistema NECV foi realizada utilizando metodologia analítica desenvolvida no espectrofotômetro de UV-VIS, a qual obteve uma eficiência de encapsulação de  $99,45\% \pm 0,019$  (equivalente a 2,98 mg de CV por mL de NE). Em seguida, foi caracterizado quanto ao aspecto macroscópico, apresentando aspecto líquido com cor branca. Durante os 90 dias, não foi observada formação de cremação ou separação de fases, na qual a NECV se manteve com um tamanho médio de gotícula ( $D_{90} = 164.5 \pm 0.69$  nm), PDI ( $D_{90} = 0.118 \pm 0.024$ ), potencial zeta ( $D_{90} = -14.6 \pm 0.529$  mV) e pH ( $D_{90} = 5.52 \pm 0.011$ ) esperado. Posteriormente, foi avaliada a atividade antibacteriana do composto isolado e do sistema nanoemulsionado pelo método da microdiluição, na qual foi usado a Rezasurina como indicador visual de metabolismo celular. Da atividade antibacteriana, a NECV (CIM: 256 µg / mL para *E. coli* e *Samonella spp.*, 128 µg / mL para *S. aureus* e *P. aeruginosa*) obteve melhor resultado quando comparado ao composto livre frente as linhagens *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*. Além disso, houve efeito bactericida contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella spp.* Os resultados obtidos indicaram que a NECV pode ser incorporada como aditivo alimentar para prevenir e controlar o crescimento microbiano.

**Palavras-chave:** Nanoemulsão. Patógenos alimentares. Efeito bactericida.

## ABSTRACT

In recent decades, microbial resistance has become a serious risk to public health, a phenomenon resulting from the indiscriminate use of antibiotic antibiotics by health institutions, the population, in agriculture and agriculture, or by gene recombination or mutation between species. With bacterial resistance, food pathogens are a major concern for the food industry, consumers and safety authorities. The use of bioactive products derived from secondary metabolism of vegetables is a viable alternative, as is the case of Carvacrol oil (CV), a phenolic monoterpene with proven antimicrobial activity. However, characteristics, such as its hydrophobia, oxidation facility, instability in the presence of light, heat and humidity, can limit its application as a food additive. With this, the use of emulsified systems, such as nanoemulsions (NEs) appear as an alternative, in order to increase the stability of these compounds and increase their solubility. Furthermore, the choice of nanoemulsified systems as antimicrobial agents is important, as they interact with microbial cell membranes, causing them to stop growing. Thus, the objective of this work was the development, characterization and evaluation of the antimicrobial activity against the bacteria *Staphylococcus aureus* UFPEDA02, *Escherichia coli* UFPEDA224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416, *Salmonella enteritidis* ATCC13076 and *Salmonella typhimurium* ATCC14028 of a NE containing CV. To obtain a stable NE, a study of HLB identification of the CV by the microemultocrit method was first carried out, so at the end an HLB value of 11 was found for the CV used in this study. Then, a study was carried out to obtain a NE with greater stability, for that, it varied the proportions of CV (3 and 5%), surfactants (a mixture of Tween 80® and Span 80®) (2, 5 and 9%) and water (86, 88, 90, 92 and 95%). From the prepared NEs, just the one with 3% oil, 9% surfactant and 88% water (NECV) remained stable for up to 90 days. The high energy emulsification methodology was used to obtain the systems, where the NEs went through four cycles of homogenization in the sonicator and ultrasound bath. The amount of oil in the NECV system was performed using analytical methodology developed in the UV-VIS spectrophotometer, which obtained an encapsulation efficiency of  $99.45\% \pm 0.019$  (equivalent to 2.98 mg CV per mL of NE). Then, it was characterized as for the macroscopic aspect, presenting liquid aspect with white color. During the 90 days, no creaming formation or phase separation was observed, which NECV remained with an expected average droplet size ( $D_{90} = 164.5 \pm 0.69$  nm), PDI ( $D_{90} = 0.118 \pm 0.024$ ), zeta potential ( $D_{90} = -14.6 \pm 0.529$  mV) and pH ( $D_{90} = 5.52 \pm 0.011$ ). After this, the antibacterial activity of the isolated compound and the nanoemulsified system was evaluated by the microdilution method, in which Rezasurin was used as a visual indicator of cellular metabolism. In terms of antibacterial activity, NECV (MIC: 256  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for *E. coli* and *Samonella spp.*, 128  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for *S. aureus* and *P. aeruginosa*) obtained a better result when compared to the free compound against strains *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *S. typhimurium*. Furthermore, there was a bactericidal effect against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *Salmonella spp.* The results obtained indicated that NECV can be incorporated as a food additive to prevent and control microbial growth.

**Key-words:** Nanoemulsion. Food pathogens. Bactericidal effect.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Revisão da atividade microbiológica do Carvacrol .....	19
<b>Tabela 2.</b> Classificação dos sistemas coloidais.....	22
<b>Tabela 3.</b> Composição de cada formulação de acordo com concentração de surfactante (%)	30
<b>Tabela 4.</b> Microrganismos utilizados na atividade antimicrobiana .....	33

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do Carvacrol .....	17
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**A/O** – água/óleo;

**CBM** – *Minimum Bactericidal Concentrations* – *CBM*;

**cHLB** – HLB crítico;

**CIM** – *Minimum Inhibitory Concentration* - *MIC*;

**CV** – Carvacrol;

**DTAs** – Doenças transmitidas por alimentos;

**HLB** – Balanço hidrófilo-lipófilo;

**LCT** – Triglicerídeo de Cadeia Longa;

**MCT** – Triglicerídeo de Cadeia Média;

**MEs** – Microemulsões;

**NEs** – Nanoemulsões;

**O/A** – óleo/água;

***P. aeruginosa*** – *Pseudomonas aeruginosa*;

**PDI** – Índice de polidispersão;

**UV-VIS** – Espectrofotometria no Ultravioleta-Visível.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1	<i>Objetivo geral</i> .....	15
2.2	<i>Objetivos específicos</i> .....	15
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
3.1	<i>Carvacrol e atividade antimicrobiana</i> .....	16
3.2	<i>Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de bioativos</i> .....	20
3.3	<i>Nanoemulsão (NE)</i> .....	21
3.4	<i>Constituintes do sistema nanoemulsionado</i> .....	24
3.5	<i>Bactérias de interesse alimentar</i> .....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1	<i>ateriais</i> .....	29
4.1.1	<i>Substâncias e Reagentes</i> .....	29
4.1.2	<i>Equipamentos analíticos</i> .....	29
4.2	<i>Métodos</i> .....	29
4.2.1	<i>Análise do Balanço Hidrófilo-Lipófilo (HLB)</i> .....	29
4.2.2	<i>Preparação da nanoemulsão de CV (NECV)</i> .....	31
4.2.3	<i>Determinação da linearidade da curva analítica</i> .....	31
4.2.4	<i>Caracterização da NECV</i> .....	31
4.2.5	<i>Atividade antimicrobiana</i> .....	32
<b>5</b>	<b>ANEXO DO ARTIGO</b> .....	<b>35</b>
5.1	<i>Título do artigo</i> .....	35
	<b>ANEXO 1</b> .....	<b>64</b>
	<b>ANEXO 2</b> .....	<b>65</b>
	<b>ANEXO 3</b> .....	<b>66</b>
	<b>ANEXO 4</b> .....	<b>67</b>
	<b>ANEXO 5</b> .....	<b>68</b>
	<b>ANEXO 6</b> .....	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>
	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos décadas, a resistência microbiana frente aos antimicrobianos tornou-se um sério risco a saúde coletiva, impondo barreiras ao controle de microrganismos patogênicos de interesse médico-sanitário. Esse fenômeno decorre do uso indiscriminado de antibióticos por instituições de saúde, população, na agropecuária e na agricultura, ou de recombinação gênica ou mutação entre as espécies (GARCIA; COMARELLA, 2018; LOUREIRO et al., 2016).

Nesse contexto de resistência bacteriana, patógenos alimentares são uma grande preocupação para a indústria de alimentos, consumidores e autoridades de segurança (DAS et al., 2017, TOPUZ et al., 2016). O interesse por alimentos seguros, livres de contaminantes e mais saudáveis, é crescente no mercado atual, sendo a contaminação de produtos alimentícios por microrganismos patogênicos um desafio para a indústria alimentícia (LIAO et al., 2017).

Diante do aumento de casos de infecção de natureza bacteriana resistente e da dificuldade do controle da proliferação bacteriana na indústria alimentícia, o uso de bioativos oriundos da vegetação nativa tem sido uma opção como possível solução para o problema (LOUREIRO et al., 2016).

Estudos demonstram que óleos essenciais apresentam propriedades antimicrobianas significativas contra uma ampla gama de patógenos, tais como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (JEONG et al., 2018; LEE et al., 2018; ZHANG et al., 2016). Dessa forma, o uso de óleos essenciais vem ganhando atenção como conservantes naturais de alimentos, na qual sua aplicação atrai interesse na indústria, onde muitos consumidores exigem substituição de conservantes sintéticos por produtos naturais (MORAES-LOVISON et al., 2017; LANDRY et al., 2014; VERGIS et al., 2013). O carvacrol (CV) é um monoterpeno fenólico constituinte de óleos essenciais presentes em diversas plantas, na qual possui diversas propriedades farmacológicas tais como, anti-inflamatórias, antibacterianas, antioxidantes, antissépticas, antiespasmódicas, antifúngicas e antivirais (SANTOS et al., 2015; HUSSEIN et al., 2017). Devido às atividades aromatizantes e antimicrobianas, o CV foi proposto como conservante natural de alimentos para esta indústria (SHARIF-RAD et al., 2018).

No entanto, a utilização do CV e de seus derivados na indústria alimentícia pode apresentar algumas desvantagens, no sentido tecnológico, relativas à facilidade de oxidação,

instabilidade na presença de luz, calor e umidade, os quais podem limitar sua aplicação (SANTOS et al., 2015).

A nanotecnologia se apresenta como estratégia para a síntese, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas em escala nanométrica, os quais poderiam ser úteis na preservação das características originais dos óleos essenciais, por exemplo (PINTO, 2014). No contexto, a nanoencapsulação se destaca como uma técnica promissora, uma vez que tem sido empregada para melhorar as características dos princípios ativos quanto à solubilidade em água e estabilidade térmica, com possibilidade de liberação controlada em concentrações reduzidas (FLORES et al., 2011; HABIB et al., 2012).

Dentre os sistemas nanotecnológicos emulsionados, destacam-se as nanoemulsões (NEs). As NEs apresentam características desejáveis à indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia com considerável estabilidade físico-química e sensorial agradável. O tamanho reduzido das gotículas em dispersão pode apresentar maior facilidade em alcançar o substrato desejado para sua ação (PEREIRA, 2008). Tal sistema apresenta o potencial de carrear bioativos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos, uma vez que são, por definição, sistemas dispersos, do tipo água/óleo, bicontínuos ou óleo/água (JAWORSKA et al., 2015).

Os sistemas emulsionados, como as NEs são viáveis para veicular óleos, uma vez que as emulsões são sistemas dispersos constituído de dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso no outro na forma de pequenas gotículas, devido ao uso de agentes emulsificantes (FERREIRA et al., 2010). Além disso, esses sistemas, oferecem também vantagens adicionais, como a minimização do impacto nas propriedades organolépticas dos produtos alimentícios, bem como uma maior bioatividade, devido ao tamanho subcelular e à melhor difusão (DONSI et al., 2012, 2011).

Uma alternativa inovadora e viável seria a utilização do CV na forma de NEs. Dessa forma, possibilitando uma melhor dispersão do bioativo na matriz do alimento. Vários estudos demonstram a atividade do CV em NEs para atividade antimicrobiana (RYU et al., 2018; TASTAN et al., 2016; DONSI; FERRARI, 2016; MAZEREI, RAFETI, 2019).

No entanto, até o momento, apenas pesquisas pioneiras foram realizadas para apoiar o uso de NEs com óleos essenciais antimicrobianos em produtos alimentícios (DONSI; FERRARI, 2016).

Com isso, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver NE contendo CV, bem como avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* UFPEDA0, *Escherichia coli* UFPEDA224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416, *Salmonella enteritidis* ATCC13076 e *Salmonella typhimurium* ATCC14028.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar um sistema nanoemulsionado contendo Carvacrol e avaliar como aditivo alimentar antimicrobiano.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Obter valor do HLB do CV;
- b) Obter NE contendo CV;
- c) Quantificar o CV na NE;
- d) Caracterizar a NECV quanto ao aspecto macroscópico, tamanho médio das gotículas, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e pH;
- e) Avaliar a atividade antimicrobiana, através da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CBM) do CV livre e nanocarreado sob bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* UFPEDA02) e Gram-negativa (*Escherichia coli* UFPEDA224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416, *Salmonella enteritidis* ATCC13076 e *Salmonella typhimurium* ATCC14028).

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Carvacrol e atividade antimicrobiana

As plantas são fontes de moléculas biologicamente ativas, dentre elas os metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Enquanto que os metabólitos secundários protegem as plantas contra patógenos e herbívoros, funcionam como agentes de competição entre as plantas, além de servirem como atrativos para polinizadores. As moléculas provenientes deste metabolismo secundário são os terpenos, compostos fenólicos e alcaloides, que apresentam ma grande diversidade e complexidade estrutural. Dentre estas moléculas encontram-se aquelas que fazem parte da constituição dos óleos essenciais (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019).

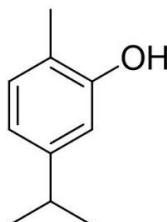
Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos lipofílicos, de baixa massa molecular e geralmente odoríficos (SILVA, 2018). São obtidos por meio de isolamento por destilação por arraste a vapor d'água, pressão ou extração por solvente, como são metabólitos secundários sintetizados a partir de plantas aromáticas, sendo seus principais constituintes fenóis, terpenos e aldeídos (ALMEIDA, 2015). Tais compostos possuem propriedades antioxidantes e antimicrobianas, e por isso, são amplamente utilizados em formulações farmacêuticas, cosméticas e na indústria alimentícia (GUIMARÃES et al., 2015).

Análises físico-químicas dos óleos essenciais demonstram que estes são constituídos por diversos compostos, entres eles, os hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas entre outros, os quais são responsáveis por suas propriedades físico-químicas e biológicas (SIMÕES et al., 2004). O composto majoritário são os terpenóides, sendo classificados pelo número de carbonos, o resultante do número de moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) presentes em sua estrutura. Nos óleos essenciais os compostos terpênicos mais encontrados são monoterpenos (C10) e sequiterpenos (C15), que cada vez mais são estudados devido às diversas propriedades biológicas apresentadas por estes compostos (DUBEY et al., 2003).

O CV (Figura 1), também conhecido como isopropil-*o*-cresol, *p*-cimeno-2-ol, 5-iso-propil-2-timol ou iso-timol, com fórmula molécula de C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O, massa molecular de 150,22 g mol<sup>-1</sup> e LogP 3,52 (DE VINCENZI et al., 2004; ARFA et al., 2006), é um monoterpeno fenólico, líquido à temperatura ambiente, pertencente aos óleos essenciais produzidos por uma grande variedade de plantas aromáticas como, Cominho-Preto (*Nigella sativa* L.), Manjerona

(*Origanum majorana* L.), Orégano (*Origanum vulgare* L.) e Tomilho (*Thymus vulgaris* L.), além de Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e Alecrim-da-chapada (*Lippia gracilis* Schauer), sendo este último encontrado abundantemente no Nordeste brasileiro (SANTOS et al., 2015).

**Figura 1.** Estrutura química do Carvacrol



Esse composto é reconhecido como um aditivo seguro para alimentos e agente aromatizante em bebidas e goma de mascar (OLIVEIRA et al., 2012). Entretanto, possui ações biológicas diversas como: atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica, inseticida, gastroproterora, além de apresentar propriedades ansiolíticas, anti-inflamatórias, antinociceptivas e antitrombóticas (SILVA et al., 2012; PIRES et al., 2013; MORAES et al., 2013; DAMASCENO et al., 2014).

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais está relacionada, principalmente, com a interação que estes compostos possuem com as membranas celulares dos diferentes microrganismos (VALERIANO et al., 2012).

O grupo hidroxila e a presença de um sistema de elétrons livres são importantes para atividade antimicrobiana de compostos fenólicos, como o CV (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002). Dessa forma, o CV, além de ter característica hidrofóbica para o acúmulo de compostos na membrana, atua como trocador de prótons, reduzindo assim o gradiente através da membrana citoplasmática (MARINELLI, DI STEFANO, CACCIATORE, 2018).

Estudos realizados por Helander et al. (1998), avaliaram a atividade antibacteriana do timol e do carvacrol frente a linhagens de bactérias patogênicas *Escherichia coli* O157: H7 e *Salmonella typhimurium* com a finalidade de detectar alterações causadas na permeabilidade da membrana externa destas bactérias, após a incorporação destes compostos. Com o auxílio de um marcador fluorescente, comprovaram a atividade antibacteriana desses compostos. Em outro estudo realizado por Cristani et al. (2007) frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* comprovaram que o mecanismo de ação do timol e do carvacrol estão associados o fato destes compostos atravessarem a membrana celular causando uma

perturbação na membrana plasmática do microrganismo, esta capacidade pode estar associada com as características físico-químicas destas moléculas, tendo em vista suas características lipofílicas (ALMEIDA, 2015).

Além da atividade antibacteriana está relacionada com a capacidade de permeação da membrana externa das bactérias, Xu et al. (2008) atribuiu a ação antimicrobiana destes compostos com as suas capacidades em permeabilizarem e despolarizarem a membrana citoplasmática de *Escherichia coli*. Hammer e Heel (2012) também observaram que o carvacrol despolariza as células das bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus*, de forma dependente do tempo e da concentração.

Diante da importância do CV, a tabela 1 expõe alguns estudos realizados com o CV e seu potencial antimicrobiano.

**Tabela 1.** Revisão da atividade microbiológica do Carvacrol

<i>Bioativo</i>	<i>Microrganismo</i>	<i>Concentração</i>	<i>Resultado</i>	<i>Referência</i>
Carvacrol (Honeywell Fluka)	<i>E. coli</i> O157: H7	3mM	Bacteriostático	Helander et al., 1998
	<i>S. typhimurium</i>	1mM		
Carvacrol (Sigma Aldrich)	<i>E. coli</i>	1250 µg/mL	Bacteriostático	Cristani et al., 2007
	<i>S. aureus</i>	2500 µg/mL		
Carvacrol (Sigma Aldrich)	<i>E. coli</i>	200 µg/mL – 800 µg/mL	Bacteriostático	Xu et al., 2008
Carvacrol (Sigma Aldrich)	<i>E. coli</i> ESBL (C-18, C-21, C-20, C-24, C-25, 24, 65)	1.024 µg/mL - 1 µg/mL	Bacteriostático	Lima et al., 2017
Carvacrol (Sigma Aldrich)	<i>S. aureus</i>	1000 µg/mL	Bacteriostático /Bactericida	Andrade, 2018
	<i>E. coli</i>	2000 µg/mL		
Carvacrol (Honeywell Fluka)	<i>E. coli</i>	250 µg/mL	Bacteriostático /Bactericida	Arfa et al., 2006
	<i>S. aureus</i>			
	<i>B. subtilis</i>			
	<i>S. cerevisiae</i>			
Carvacrol (Honeywell Fluka)	<i>P. fluorescens</i>	1.000 µg/mL	Bacteriostático /Bactericida	Arfa et al., 2006
Carvacrol (SAFC Pharma)	<i>S. aureus</i>	0,025%-0,05%	Bacteriostático	Hammer, Heel, 2012
	<i>S. epidermidis</i>			
	<i>E. faecalis</i>			
Carvacrol (Sigma Aldrich)	<i>P. aeruginosa</i>	7.9 mM / 15 mM	Bacteriostático /Bactericida	Rodriguez et al., 2017

Fonte: Dados da pesquisa, (2020).

No entanto, uma das grandes dificuldades tecnológicas em relação aos monoterpenos, tais como o CV, é a sua preservação durante o processamento e estocagem, devido a sua fácil oxidação. Além de apresentarem insolubilidade em água, limitando sua utilização

(QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013). Com isso, várias abordagens vêm sendo utilizadas para melhorar as propriedades desses monoterpenos, incluindo o nanoencapsulamento, promovendo uma maior estabilidade e liberação controlada desses materiais (CHALLA et al., 2005; HADARUGA, 2012).

### **3.2 Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de bioativos**

A nanotecnologia é um fenômeno recente e se aplica a praticamente todos os setores da pesquisa, havendo uma concordância da nanotecnologia com outras disciplinas como as ciências farmacêuticas, ciência dos materiais, informática, biologia celular e molecular, resultando, assim, em uma revolução tecnológica, que gerará um maior impacto no futuro devido às suas potenciais aplicações no diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças (ROJAS-AGIRRE, AGUADO-CASTREJÓN, GONZÁLES-MÉNDEZ, 2016).

Segundo um estudo realizado por Florêncio et al. (2017), foi constatado que entre os anos de 2007 a 2014 houve o depósito de mais de 3000 patentes na área de nanobiotecnologia, cuja área de maior concentração de registro foi as invenções de preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas, com predominância para a subárea de fármacos, também havendo um número significativo em patentes voltados a área de microrganismos ou enzimas, suas composições, propagação e conservação.

Na indústria de alimentos, a nanotecnologia surge como uma estratégia para solucionar alguns problemas e desafios enfrentados por ela, onde novos sistemas de liberação são utilizados como veículos para a incorporação, proteção, transporte e liberação controlada de bioativos, para aplicações alimentares e farmacêuticas (YU; HANG, 2013). Alguns sistemas de liberação que tem sido objeto de estudo são as nanoemulsões, microemulsões lipossomas, nanopartículas poliméricas e lipídicas, nanotubos de carbono, conjugado de polímeros, entre outros (BAMRUNGSAP et al., 2012; SILVA, 2012; COSTA et al., 2014; LEITE, 2017).

Uma das principais aplicações da nanotecnologia na indústria de alimentos seria desenvolver sistemas de liberação de bioativos à nanoescala, devido ao seu tamanho nanométrico podem melhorar a solubilidade, biodisponibilidade e aspectos sensoriais desses compostos, assim como permitir que estes sejam liberados de uma forma controlada. Isso ocorre pela razão elevada área superficial e volume, e interações físico-químicas entre materiais à nanoescala que influenciam as suas propriedades finais (PINHEIRO et al., 2013).

A uso de óleos essenciais apresentam muitas vezes problemas relacionados com solubilidade, degradação, agregação, coalescência e interação com as matrizes alimentares, que fazem com que o seu efeito funcional seja diminuído e até mesmo perdido antes de chegar ao consumidor (PINHEIRO et al., 2013; RESCH; FARINA, 2016). Assim, a nanotecnologia, por meio do encapsulamento promove proteção dos óleos essenciais contra a degradação por agentes físicos e químicos, tais como umidade, luz, oxigênio ou calor capazes de alterar a sua qualidade, conseqüentemente, resultando na redução da volatilidade, promovendo maior estabilidade dos seus componentes (BASER; BUCHBAUER, 2010; PINTO, 2014).

Outra contribuição no processo de encapsulação é permitir que a liberação do material do núcleo ocorra gradativamente, ou a partir da ocorrência de um certo estímulo, tais como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento ou dissolução. Esse conceito é chamado de *liberação controlada*, e pode-se referir ao controle do início da liberação ou da taxa de liberação (SUAVE et al., 2006; PINTO, 2014).

Assim, a nanotecnologia tem proporcionado novas descobertas para a formação, caracterização e aplicação destes sistemas emulsionados em muitos ramos da ciência e tecnologia (SANTOS et al., 2017). Dessa forma, uma das alternativas viáveis seria a utilização de bioativos na forma de nanoemulsões, a qual possibilita uma maior dispersão do bioativo na matriz do alimento, mantendo-o livre de microrganismos patogênicos e contaminantes por um período superior ao usual (GALVÃO, 2017).

### **3.3 Nanoemulsão (NE)**

Avanços na nanotecnologia vem oferecendo oportunidades para inovação na indústria alimentar e afins. Uma das principais aplicações em alimentos é o desenvolvimento de novos ingredientes alimentares funcionais com características aprimoradas, por exemplo, uma maior solubilidade em água, estabilidade térmica e boas características sensoriais (SHANTILAL; BHATTACHARYA, 2014).

Sistemas dispersos consistem em uma fase dispersa, dispersa na forma de partículas ou gotículas na fase contínua. Essas dispersões podem ser do tipo coloidais, na qual o tamanho de médio de gotículas varia entre 1 nm a 1 mm (ATTWOOD, 2016). Exemplos de sistemas coloidais são as nanoemulsões (NEs) e microemulsões (MEs), onde suas principais diferenças são o tamanho do diâmetro da gotícula e estabilidade termodinâmica (Tabela 2) (OSTERTAG, WEISS; McCLEMENTS, 2012; LOVISON, 2017).

**Tabela 2.** Classificação dos sistemas coloidais

<i>Sistemas coloidais</i>	<i>Diâmetro da gotícula</i>	<i>Estabilidade termodinâmica</i>
<b>NEs</b>	200 - 500 nm	Metaestável
<b>MEs</b>	até 150 nm	Estável

Fonte: Adaptado de Silva (2013) e Rolim (2016).

As NEs são dispersões com tamanho de gotícula na faixa de 200 a 500 nm. São constituídas por uma fase hidrofílica, uma fase lipofílica e tensoativos. Apresentam aspecto transparente e/ou translúcido devido ao tamanho reduzido da gotícula e sua aparência e textura tornam-nas atraentes para o consumidor. Tem sido bastante investigada devido a sua simples obtenção, e sua estabilidade, que devido ao tamanho das gotículas, previne processos de instabilidade como cremação, floculação e coalescência. Devido a sua maior área superficial promove um aumento na biodisponibilidade de fármacos veiculados na sua estrutura (SEIBERT, 2015; WALKER et al., 2015, ROLIM, 2016).

Diferentes das MEs, que são sistemas termodinamicamente estáveis, as NEs são sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por um longo período de tempo, além de poderem ser biodegradáveis e biocompatíveis. Tais características, bem como, redução na quantidade de tensoativos e possibilidade de serem diluídas com água sem perda de sua estrutura original são vantagens apresentadas por esse sistema e tornam-no preferência para veicular fármacos lipofílicos quando comparado a outros modelos de liberação de substâncias (MASON et al., 2006; FRAGA, 2007; SEIBERT, 2015; ROLIM, 2016).

Por conseguinte, as NEs tem sido bastante estudada e já possuem aplicações práticas em diversas áreas, como química, farmacêutica, cosmética, alimentícia e agrícola, sendo promissores carreadores de bioativos para muitas aplicações (SEIBERT 2015).

Para a obtenção desses sistemas é necessário o fornecimento de energia. De acordo com a literatura, elas podem ser obtidas por meio de duas técnicas: (1) métodos de alta e (2) método de baixa energia de emulsificação (SOLÉ et al., 2010; SEIBERT, 2015; ROLIM, 2016). Os métodos que utilizam alta energia de emulsificação são baseados na geração de energia mecânica por meio da alta pressão de cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores ou pela utilização de ultrassom ou do potencial químico dos componentes. Essa alta energia empregada é capaz de deformar e quebrar as gotículas da fase interna, formando glóbulos menores (FERNANDEZ et al., 2004; FRAGA, 2007; SEIBERT 2015). Uma das vantagens de utilizar métodos como esse é o melhor controle da



granulometria e a maior possibilidade de escolha dos constituintes da formulação (ROLIM, 2016).

Enquanto os métodos de baixa energia ocorrem a partir da inversão espontânea na curvatura do tensoativo para promover formação de glóbulos menores. Esse fenômeno pode ser alcançado pela mudança de temperatura do sistema, o que faz com que haja uma transição da emulsão A/O em altas temperaturas para uma emulsão O/A em baixas temperaturas, a partir da utilização de tensoativos não iônicos. Porém, essa transição pode ser complexa quando a inversão é atribuída ao aumento da fração volumétrica (*Emulsion Phase Inversion - EPI*) ou transicional. Para reverter a situação, Shinoda (1968) introduziu o método da temperatura de inversão de fases (*Phase Inversion Temperature - PIT*), correlacionando o método de inversão transicional e a capacidade particular das emulsões estabilizadas por tensoativos não iônicos de sofrer uma inversão de fases de acordo com a variação de temperatura (TADROS et al., 2004; SEIBERT 2015).

As NEs têm sido empregadas em estudos para encapsulação de diferentes tipos de óleos essenciais, diversos deles visando investigar a ação antimicrobiana de tais nanosistemas. O encapsulamento de óleos essenciais em nanoescala representa uma abordagem viável e eficaz para aumentar a estabilidade dos compostos bioativos, protegendo-os das interações com os demais componentes da formulação e, devido ao seu tamanho reduzido, as NEs podem aumentar a sua bioatividade através do mecanismo passivo de ativação de absorção celular (WEISS et al., 2009).

Esses sistemas podem interagir com as membranas das células microbianas através de quatro vias principais (DONSÌ; FERRARI, 2016): (1) Transporte passivo através da membrana celular – as gotículas são capazes de transportar o óleo essencial para a superfície da membrana celular, melhorando a acessibilidade às células microbianas e permitindo a ruptura da membrana celular (MOGHIMI et al., 2016 ); (2) Fusão com a bicamada de fosfolípido celular – a fusão das gotículas de NEs com a bicamada fosfolipídica da membrana celular provoca, provavelmente, a liberação direcionada dos óleos essenciais (DONSÌ; FERRARI, 2016); (3) Partição na fase aquosa - a liberação prolongada ao longo do tempo dos óleos essenciais pelas NEs conduzida pela partição do óleo essencial entre as gotículas de óleo e a fase aquosa, prolonga a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (DONSÌ; FERRARI, 2016); e (4) Interação eletrostática com a membrana celular - a interação eletrostática de gotas de NEs positivamente carregadas com paredes de células microbianas carregadas negativamente aumenta a ação do óleo essencial (CHANG; MCLANDBOROUGH; McCLEMENTS, 2015; LOVISON, 2017).

### 3.4 Constituintes do sistema nanoemulsionado

A seleção de constituintes para o sistema nanoemulsionado deve ser feita considerando as características do composto que será incorporado no sistema, além de particularidades como, a via de administração e sua biocompatibilidade. A escolha da fase interna do sistema líquido emulsionado é muito importante uma vez que, permite a obtenção do próprio sistema e das características do bioativo veiculado. Uma grande variedade de triglicerídeos, ésteres oleosos semi-sintéticos, glicerídeos parciais e ésteres semi-sintéticos não-iônicos estão disponíveis para utilização como fase interna (STRECK, 2017).

Os triglicerídeos são altamente lipofílicos e sua capacidade solvente para bioativos é geralmente uma função da concentração eficaz dos grupos ésteres, assim, um triglicerídeo de cadeia média (MCT) geralmente tem maior capacidade solvente que um triglicerídeo de cadeia longa (LCT) (POUTON; PORTER, 2008). O Miglyol<sup>®</sup>812 (MCT), predominantemente C8 e C10, é bastante utilizado em sistemas emulsionados, por ser conhecido como inibidor de amadurecimento de Ostwald. O amadurecimento de Ostwald consiste no crescimento do raio da gotícula e na diminuição do número total das gotículas dispersas, tal efeito evidencia a condição de um sistema termodinamicamente instável, ou seja, um processo que não é espontâneo. Esse efeito leva a separação de fases com o passar do tempo (FRANZOL; REZENDE, 2015).

No entanto, alguns estudos demonstraram que houve alteração na atividade antimicrobiana de óleos essenciais quando emulsificados (CHANG; MCLANDBOROUGH; MCCLEMENTS, 2012; XUE; DAVIDSON; ZHONG, 2015). O MCT é usado para aumentar a estabilidade de emulsões, porém ele não apresenta atividade antimicrobiana (RYU et al., 2018). Em um sistema emulsionado, o MCT pode agir como solvente do óleo, reduzindo a quantidade de óleo para interagir com a célula da membrana (MOGHIMI et al., 2016). Dessa forma, a fase oleosa da NE deste trabalho foi composta apenas pelo próprio bioativo, o CV.

Enquanto que os tensoativos são componentes essenciais para a formação de sistemas do tipo óleo em água (O/A). Os tensoativos não iônicos são os mais aplicados no desenvolvimento de sistemas de liberação de bioativos, uma vez que sua concentração micelar crítica é geralmente muito menor que de tensoativos iônicos, dessa forma sendo menos irritantes e mais tolerados (SHINODA et al., 1969). O uso de tensoativos garante o tamanho pequeno das gotículas, além de evitar a coalescência, amadurecimento de Ostwald e a colisão entre as gotículas das NEs (KOROLEVA; NAGOVITSINA; YURTOV, 2018).

A adição de um tensoativo não iônico, assim como o sinergismo de diferentes tensoativos, como o Tween<sup>®</sup>80 e Span<sup>®</sup>80, melhoram a estabilidade dos sistemas, influenciando os ângulos de contato e forças de interação (TIAN; CHEN; ZHANG, 2015).

Outro fato importante para estabilidade das NEs é o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), um parâmetro adimensional que caracteriza o comportamento de um tensoativo dentro de um sistema composto por tensoativo/óleo/água, na qual considera a influência das propriedades da fase oleosa, como o tipo de óleo, as propriedades de fase aquosa e os fatores ambientais, como a temperatura, na afinidade relativa de um tensoativo para as fases de óleo e água (McCLEMENTS; RAO, 2011).

Griffin (1949) foi o primeiro pesquisador a criar uma técnica baseada no HLB para a escolha ideal de tensoativos para se obter o tipo de emulsão desejada, óleo/água (O/A) ou água/óleo (A/O). Nesse sistema, cada tensoativo é classificado de acordo com seu próprio valor de HLB, onde tensoativos hidrofílicos têm um valor alto de HLB (geralmente acima de 10), enquanto que tensoativos lipofílicos têm valores variando de 1 a 10. Surfactantes com auto-equilíbrio entre as porções lipofílicas e a hidrofílicas são extremamente eficientes como agentes emulsificantes, pois tendem a se concentrar na interface O/A (GALVÃO, 2017).

No entanto, o sistema HLB nunca fornece informações quanto a quantidade de surfactantes deve conter em um sistema emulsionado. Por isso, depois de determinar a mistura correta necessária para gerar o HLB ideal para uma NE, o que é conhecido por HLB crítico (cHLB). Em seguida, várias formulações devem ser preparadas com o mesmo cHLB com concentrações variadas dos componentes. O sistema escolhido deve ser aquele com maior estabilidade (MACEDO, 2006). Por não se conhecer o valor do HLB do sistema, foi feito um estudo com diversas emulsões contendo Tween<sup>®</sup>80, Span<sup>®</sup>80 e CV, para assim verificar o real valor e obter uma formulação com uma maior estabilidade.

### **3.5 Bactérias de interesse alimentar**

O uso indiscriminado de antibióticos resultou no surgimento de diversas bactérias resistentes, sendo um grande problema de saúde pública. Bactérias como a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella* spp, *Shigella*, *Enterococcus* sp. e *E. coli* são consideradas os principais patógenos com uma resistência múltipla a antimicrobianos. Além disso, essas bactérias são responsáveis por diversos tipos de doenças alimentares (COSTA; SILVA-JÚNIOR, 2017; CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) é a consequência devido a ingestão de alimentos contaminados por microrganismos como, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, rotavírus, norovírus e coliformes causam infecções ou intoxicações, se apresentando de forma crônica ou aguda (BRASIL, 2015). Os sintomas dependem do agente etimológico envolvido, porém os mais comuns são dor no estômago, náusea, vômito, diarreia e febre (OLIVEIRA et al, 2010).

As bactérias são classificadas de acordo com a estrutura da membrana, sendo conhecidas como Gram-negativas e Gram-positivas. As Gram-negativas apresentam uma dupla camada, composto por uma fina camada de peptidoglicano entre a membrana citoplasmática e o exterior da membrana. Já as Gram-positivas não apresentam uma parede celular tão complexa quanto as Gram-negativas, porém possuem uma espessa camada de peptidoglicano (RIMOLI, 2015).

As bactérias ainda Gram-negativas são constituídas por uma endotoxina, o LPS, que lhes confere a propriedade de patogenicidade, além disso contribui para a integridade estrutural da bactéria e protegendo sua membrana de certos tipos de ataque químico. Enquanto nas bactérias Gram-positivas a exotoxina, composta pelo ácido lipoteicoico, tem como característica principal a aderência (SANTOS, 2016)

O lipopolissacarídeo (LPS) é o maior fator de virulência, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias. Quando livre para agir, as endotoxinas não causam lesões celulares ou teciduais diretamente, mas eles estimulam as células competentes a liberar substâncias químicas mediadores (HURTADO; IREGUI, 2010). O LPS induz macrófagos e outras proteínas, como as interleucinas e fatores ativadores de plaquetas e prostaglandinas. Dessa forma, mesmo pequenas quantidades de endotoxinas são capazes de induzir resposta inflamatória (REYES et al., 2009).

Assim, por essas bactérias apresentarem uma parede celular mais complexa, conferem uma maior resistência contra certos antibióticos, como a penicilina. Além de liberarem substâncias, como a endotoxina, LPS, que contribuem para a gravidade dos sintomas durante infecções com bactéria Gram-negativas (REYES et al., 2009; RIMOLI, 2015).

O *S. aureus* é uma bactéria que pertence a microbiota humana, responsável por causar infecções simples como espinhas e furúnculos ou até doenças mais graves como por exemplo pneumonia, meningite, endocardite entre outras (DOS SANTOS et al., 2007). As causas mais frequentes em processos de contaminação é a falta de higiene na manipulação, armazenamento, sendo comum em alimentos como leite e seus derivados (TONDO; BARTZ, 2014). Os principais sinais de surto por gastroenterite estafilocócica apresentam sintomas

como, náuseas, vômitos, contrações abdominais, diarreia, sudorese e cefaleia (GUTIÉRREZ et al., 2012).

Já a *E. coli*, da família Enterobacteriaceae, faz parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente, isto é, aves e mamíferos. Tais bactérias fermentam glicose com produção de ácido e gás. Uma vez detectada em alimentos, indicam que o alimento tem contaminação de origem fecal ou por contato de superfícies sujas e/ou com inadequadas condições sanitárias (TONDO; BARTZ, 2014). Uma das principais fontes de contaminação é o consumo de comida contaminada e crua, como por exemplo, carne e leite cru (FRANK et al., 2011; LOPES et al., 2012).

A *P. aeruginosa*, pertencente à família Pseudomonaceae é aeróbia, não fermentadora de glicose, com temperatura para desenvolvimento de 37°C, sendo um microrganismo ocorrente em vários ambientes, como ar, solo e água. Podem ser isoladas das mucosas e fezes de animais. Além de serem responsáveis por formarem biofilmes, capazes de produzir exopolissacarídeos, o que a torna mais resistente à agentes antimicrobianos (MADIGAN et al., 2016; MONTEIRO, 2017). Multiplicam-se em temperaturas de refrigeração indicadas para o armazenamento de alimentos abaixo de 8° C, sendo uma preocupação para os profissionais da área de inspeção de alimentos (SANTOS e FONSECA, 2007).

A *Salmonella spp* é considerada uma enterobactéria, da família Enterobacteriaceae. São anaeróbios facultativos e oxidase negativa, cuja produção de gás é característica (DA SILVA et al, 2007). Sendo frequentemente envolvidos em casos de surtos alimentares, principalmente devido ao consumo de leite, mariscos e vegetais crus (FRANCO, 2008). A *Salmonella spp* é um dos principais causadores de DTAs em diferentes partes do mundo. Estudos demonstram que algumas das principais razões para a ocorrência de salmonelose parecem estar relacionadas ao armazenamento impróprio dos alimentos e também pelo consumo de alimentos sem inspeção devida (FORSYTHE, 2013).

A ocorrência de DTAs é um problema de saúde pública mundial e a atenção na área de segurança alimentar é sempre necessária devido ao perigo causado pelas infecções alimentares. Melhorias nos métodos de processamento de alimentos, além da conscientização a respeito da saúde alimentar de todos os envolvidos na cadeia de produção de alimentos, reduziriam a incidência das doenças de origem alimentar (SORAGNI; BARNABE; MELLO, 2019). Promover a implantação de boas práticas na fabricação de alimentos é um passo importante para garantir a segurança alimentar dos consumidores. Outro passo é a da conscientização da população em relação as DTAs por meio de campanhas alimentícias

apresentando as necessidades de manter padrões de higiene a fim de garantir a segurança dos produtos (SILVA, 2019).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1.1 Substâncias e Reagentes

- Carvacrol (**5-isopropyl-2-metinfenol**), **Sigma – Aldrich (Missouri - EUA)**;
- Triglicerídeos do ácido cáprico/ caprílico (**Miglyol 812®**), **Sasol (Witten - Alemanha)**;
- Polissorbato 80 (**Tween 80®**), **Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro - Brasil)**;
- Monooleato de sorbitano (**Span 80®**), **Sigma – Aldrich (Missouri - EUA)**;
- Etanol, **Merck (Barueri - Brasil)**;
- **Dimetilsulfóxido (DMSO)**, **NEON (Suzano - São Paulo - Brasil)**;
- **Ágar Mueller-Hinton**, **KASVI (Paraná - Brasil)**;
- **Caldo Mueller-Hinton**, **KASVI (Paraná - Brasil)**.

### 4.1.2 Equipamentos analíticos

- Balança analítica (**modelo AUW220D- SHIMADZU**);
- High intensity ultrasonic (**modelo QR200 - ULTRONIQUE**);
- Banho de ultrassom (**modelo 14000<sup>a</sup> – Unique**);
- Microcentrífuga (**modelo Q10.500, Quimis**);
- Espectrofotômetro de Ultravioleta-Visível (**modelo GENESYS 10S, Thermo Scientific**);
- Zetasizer (**modelo Nano ZS, Malvern**);
- pHmetro digital (**modelo pH 250, PoliControl**).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Análise do Balanço Hidrófilo-Lipófilo (HLB)

Para se obter o valor do HLB do CV, foi prepara emulsões seguindo a Tabela 3. Na preparação dessas emulsões foi usado dois surfactantes: um de natureza lipofílica [Span 80®,

HLB = 4.3] e outro de natureza hidrofílica [Tween 80®, HLB = 15]. O valor final do HLB de cada sistema variou entre 8 e 15, de acordo com a proporção relativa de cada surfactante.

**Tabela 3.** Composição de cada formulação de acordo com concentração de surfactante (%)

<i>Formulação</i>	<i>TWEEN 80</i>		<i>SPAN 80</i>		<i>Valor final do HLB</i>
	(%)	HLB	(%)	HLB	
<b>F1</b>	100	15	0	0	15
<b>F2</b>	91	13,65	9	0,39	14
<b>F3</b>	82	12,3	18	0,77	13
<b>F4</b>	72	10,8	28	1,20	12
<b>F5</b>	63	9,45	37	1,59	11
<b>F6</b>	54	8,1	46	1,98	10
<b>F7</b>	44	6,6	56	2,41	9
<b>F8</b>	34,5	5,17	65,5	2,82	8

Fonte: Dados da pesquisa, (2020).

#### 4.1.1.1 *Preparação das emulsões para a análise HLB*

As emulsões foram preparadas pelo método de ultrasonicação, os componentes foram submetidos a quatro ciclos de homogeneização em aparelho de sonicação por 1 minuto a 300W com banho de gelo, seguido de banho de ultrassom por 1 minuto. A composição de cada emulsão era de 5% (p/p) de CV, 2% (p/p) de surfactantes e 93% (p/p) de água. Ao final, foi obtido 8 emulsões do tipo O/A.

Para verificar a estabilidade das emulsões, a metodologia utilizada foi a Estabilidade a Curto Prazo. A estabilidade a curto prazo foi avaliada pela técnica do microemultocrito (MET) (Macedo et al., 2006). As formulações foram armazenadas em recipientes fechados à temperatura ambiente e não foram homogeneizadas antes do teste. Os tubos capilares isentos de heparina foram preenchidos a 75% com cada formulação e colocados em uma microcentrífuga a 10.500 rpm por 10 min. A avaliação foi realizada à temperatura ambiente nos dias de armazenamento 1 (D1) e 30 (D30). Após o ciclo de centrifugação, a formulação com menor índice de cremação foi escolhida de acordo com o valor de HLB para o CV. Todas as experiências foram feitas em triplicado.

#### 4.1.1.3 *Índice de cremação (CI)*



A taxa de cremação foi determinada experimentalmente pela medida do índice de cremação (CI) da Eq.1. Os valores de CI foram obtidos a partir da razão entre a altura total da camada de cremação (CC) e a altura total da camada de emulsão (CT). A CC e a CT foram medidas diretamente do capilar sem heparina com régua.

$$\% \text{ CI} = (\text{CC} / \text{CT}) \cdot 100 \text{ Eq. 1}$$

#### ***4.2.2 Preparação da nanoemulsão de CV (NECV)***

Com os resultados obtidos na análise do HLB, foi possível formular uma NE contendo o óleo com o HLB específico. A NECV foi preparada pelo método de ultrassonicação, os componentes foram submetidos a quatro ciclos de homogeneização em um aparelho de sonicação por 1 minuto a 300 W de potência usando um banho de gelo, seguido de um banho de ultrassom por 1 minuto. A NE selecionada foi composta por 3% de óleo de CV, 9% de surfactantes (mistura de Tween 80® e Span 80® com HLB 11) e 88% de água. Na NE branca, o CV foi substituído pelo Mygliol 812®.

#### ***4.2.3 Determinação da linearidade da curva analítica***

A linearidade do método analítico, ou seja, a proporcionalidade entre a concentração e a resposta, foi determinada pela obtenção da curva analítica, a partir da diluição da solução padrão do óleo em solução estoque preparada com um diluente (1:1), tampão salino tamponado com fosfato (PBS, pH 7,4) e etanol. A partir desta solução, a curva analítica foi construída nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30 µg/mL, utilizando-se a solução de estoque de PBS e etanol como solvente. A curva analítica foi preparada e analisada em triplicata em um espectrofotômetro. A curva analítica e sua respectiva equação da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear ( $y = 0,0158x - 0,0265$   $R^2 = 0,9965$ ).

#### ***4.2.4 Caracterização da NECV***

##### ***4.2.4.1 Análise macroscópica***

A estabilidade da NECV foi avaliada em 90 dias para aspectos visuais, como cor, cremação e separação de fases. As amostras foram armazenadas a uma temperatura de 8 °C.

#### *4.2.4.2 Determinação do tamanho de gotícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta*

A determinação do tamanho de gotícula, PDI e distribuição foram obtidas em equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern) pela técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS). Antes da medição, as emulsões foram diluídas em água deionizada (1:25 v/v). O potencial zeta das gotículas foi avaliado a partir da mobilidade eletroforética sob um campo elétrico. As amostras foram diluídas em solução de KCL 0,1 mM (1:25) e adicionadas em células eletroforéticas. Todas as medições foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados em média e desvio padrão ( $\pm$ ).

#### *4.2.4.3 Determinação do pH*

O pH das formulações foi avaliado em pHmetro digital com eletrodo de vidro, calibrado previamente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

#### *4.2.4.4 Doseamento do óleo no sistema nanoemulsionado*

A quantificação do óleo na formulação foi realizada utilizando metodologia analítica desenvolvida em espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-Vis). Foram feitas diluições em solução estoque de PBS/etanol (1:1) na proporção de 1:2000, em triplicata. Após as diluições foi feita a leitura em absorbância no espectrofotômetro de UV-Vis em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 276 nm. O valor médio da absorbância foi utilizado para determinação da concentração real da amostra por meio da equação da reta obtida durante a determinação da curva analítica em espectrofotômetro (GUIMARÃES, 2013).

### **4.2.5 Atividade antimicrobiana**

#### *4.2.5.1 Microrganismos*

Os microrganismos utilizados neste experimento foram cedidos pelo Prof. Ulrich Vaconcelos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal da Paraíba (LAMA/UFPB) e pela Prof<sup>a</sup>. Brigida Luckwu do Laboratório de Genética e Biotecnologia (LAGEBI/UEPB).

**Tabela 4.** Microrganismos utilizados na atividade antimicrobiana

<i>Microrganismos</i>	<i>Código</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	UEFPEDA02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UEFPEDA416
<i>Escherichia coli</i>	UEFPEDA224
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC13076
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC14028

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

#### 4.2.5.2 Preparo do Inóculo

A preparação do inóculo consistiu em preparar, com colônias desenvolvidas em ágar Mueller-Hinton incubadas a 37°C/24h, uma suspensão bacteriana em salina, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). A seguir, diluiu-se esta suspensão 1:100 com caldo Muller-Hinton, obtendo-se como inóculo ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) em cada tratamento.

#### 4.2.5.3 Determinação da CIM (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) e CBM (Minimum Bactericidal Concentrations - MBC)

Para avaliação da atividade inibitória e bactericida, foi seguido a metodologia conforme CLSI (2016).

O óleo foi pesado em eppendorfs e diluído em 2 mL de DMSO e homogeneizado em vórtex, formando a **Solução I**, a fim de melhorar a solubilização do composto. A partir da **Solução I** de óleo, foi feita a diluição em meio de cultura (Caldo Mueller-Hinton) em concentrações de 2.024 µg/mL, denominada **Solução II**.

Os sistemas nanoemulsionados só foram formulados a **Solução de Trabalho**, correspondente a diluição da emulsão em meio de cultura, obtendo-se a concentração de 2.048 µg/mL. O teste usou amoxicilina e NE em branco como controle.

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços. O primeiro poço correspondia a 100 µL de meio de cultura acrescido de 100 µL da solução do tratamento, com concentração final de 1024 µg/mL. As sete diluições foram obtidas de forma seriada (1024, 512, 256, 128, 64, 32 e 16 µg/mL), onde 100 µL do primeiro poço foi passado para poço seguinte, onde o último

poço possuiu concentração final de 16 µg/mL do tratamento. O volume final de cada poço foi de 100 µL. Após adição do meio de cultura e diluição das soluções de tratamento, 10µL do inóculo foram adicionados em cada poço. As microplacas foram incubadas a 37 °C/24 h em condição de aerobiose.

A determinação das CIMs consistiu em examinar a placa, registrando-se a menor concentração do tratamento capaz de causar inibição visual total do crescimento (PFALLER et al., 1995). Para a determinação do CBM, 100 µL das amostras de poços sem crescimento visível foram transferidos para o Mueller Hinton Agar (MHA) e foram incubados a 37 °C/24 h. A concentração mais baixa da amostra que poderia matar toda a população bacteriana inicial é relatada como CBMs. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### *4.2.5.4 Ensaio de resazurina*

Para identificação do metabolismo celular, foi utilizado o ensaio de resazurina. Uma porção de 10 µL de resazurina foi adicionada a cada placa e incubada por 2 horas. Após a incubação, a presença do metabolismo celular foi visualmente observada pela mudança de cor de púrpura para rosa.

## 5 ANEXO DO ARTIGO

### 5.1 Título do artigo

Development and evaluation of carvacrol nanoemulsion as antimicrobial food agent

**Artigo submetido a revista:** Letters in Applied Microbiology – Fator de Impacto:

2.173

**Development and evaluation of carvacrol nanoemulsion as antimicrobial  
food agent**

Felício, I. M.<sup>a</sup>, Limongi, R.<sup>a</sup>, Melo, C. O.<sup>a</sup>, Gervazio, K. Y.<sup>b, b</sup>, Vasconcelos, U.<sup>b</sup>, Moura, R.  
O.<sup>a</sup>, & Oliveira, E. E.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Synthesis and Vectorization of Molecules -UEPB; <sup>b</sup> Laboratório de  
Microbiologia Ambiental– UFPB.

**\* Corresponding Author**

Elquio Eleamen Oliveira

Email address: [elquioeleamen@yahoo.com.br](mailto:elquioeleamen@yahoo.com.br)

Address: Universidade Estadual da Paraíba, Rua Horácio Trajano de Oliveira, s/n, Cristo  
Redentor, CEP: 58070-450, João Pessoa- PB, Brazil.

Telephone: +55 83 3223 1128

## Highlights

- CV: Carvacrol oil; NECV: Carvacrol nanoemulsion;
- NECV presented stability during 90 days of analysis;
- The antimicrobial activity was determined by using MIC and MBC;
- The NECV improved the antimicrobial activity of the free oil.

## Abstract

Carvacrol has been reported as an efficient growth inhibitor for food pathogens. However, this oil has low solubility and can be easily oxidized. To overcome these limitations, this work developed a carvacrol nanoemulsion and evaluated its antimicrobial activity for food pathogens. The nanoemulsion containing 3% pure carvacrol oil, 9% of surfactant (HLB 11) and 88% of water, presented a good stability in a period of 90 days. In general, the carvacrol nanoemulsion (MIC: 256µg/mL for *E. coli* and *Salmonella spp.*, 128µg/mL for *S. aureus* and *P. aeruginosa*) improved the antimicrobial activity of the free oil. The carvacrol nanoemulsion also had a bactericidal effect against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *Salmonella spp.* Therefore, the results obtained indicated that the nanoemulsion containing carvacrol oil developed in this study is able to be incorporated into food formulations to evaluate its properties to prevent and control microbial growth.

Keywords: Food pathogens. Bactericidal effect. Drug delivery.

## 1 Introduction

Food pathogens are a major concern for food industry, consumers and safety authorities (Das et al., 2017, Topuz et al., 2016). In the last years, contamination of food products by pathogenic microorganisms can be a challenge for the food industry and academy (Liao et al., 2017). These microorganisms like *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* may emerge and re-emerge for several factors, contaminating canned or fresh produce and beverages (Ma et al., 2019; Das et al., 2017; Mostafa et al., 2018; Stanborough et al., 2018).

Essential oils have been gaining attention as natural food preservative, as many studies have found that they possess significant antimicrobial properties against a broad range of food pathogens, such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* (Salah, Bouaziz, & Allouche, 2019; Jeong et al., 2018; Lee et al., 2018; Zhang et al., 2016; Amaral et al., 2015). The application of these substances as food preservatives has also attracted interest in food industry since many consumers are demanding the replacement of synthetic preservatives by natural products (Moraes-Lovison et al., 2017; Landry et al., 2014; Vergis et al., 2013)

Carvacrol [2-Methyl-5-(1-methylethyl)phenol] is listed as a safe oil by the US Food and Drug Administration (FDA, 2019), that exhibits a multitude of biological activities such as antimicrobial, antioxidant, anticancer, antifungal, anti-inflammatory and analgesic (Costa et al., 2019; Guimarães et al., 2015; Suntres et al., 2014; Chavan & Tupe, 2014, Vergis et al., 2013; Guimarães et al., 2010). Due to the flavoring and antimicrobial activities, carvacrol (CV) has been proposed as a natural food preservative for the food industry (Sharif-Rad et al., 2018). Unfortunately, it has limited application due to low homogeneous dispersion in



hydrophilic food matrix because of its poor solubility in water, possible interaction with other ingredients and low stability (Donsi et al., 2014).

One strategy used to overcome these limitations is the encapsulation of the CV. The nanoemulsions are systems formed by mixing a nonpolar phase, an aqueous phase, surfactants, and, sometimes a co-surfactant (Singh et al., 2017). They can be typically formulated using less surfactant concentrations than other colloidal systems (such as microemulsions) and becoming increasingly more attractive economically (Moura et al., 2019). The nanoemulsions are related to increase the chemical and physical stability of essential oils, improve their antimicrobial activity and minimize organoleptic changes (Chuesiang et al., 2019; Moraes-Lovison et al., 2017; Ribes et al., 2016). The essential oil nanoemulsions are evaluated as having a broad spectrum of antimicrobials in several food contaminating microbials (Chuesiang et al., 2019; Ryu et al., 2018; Noori et al., 2018; Moghimi et al., 2016; Salvia-Trujilo et al., 2015; Severino et al., 2015; Donsi et al., 2011).

The purpose of the current study was to develop a carvacrol nanoemulsion (NECV) and evaluate the antimicrobial activity of NECV and compare with bulk CV against common bacteria associated with foodborne illness including *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*.

## 2 Material and Methods

### 2.1 Materials

Carvacrol oil (5-isopropyl-2-methoxyphenol), sorbitan monostearate 80 (Span 80<sup>®</sup>) and Sodium dihydrogen phosphatemonohydrate were purchased from Sigma–Aldrich (Missouri - USA), polysorbate 80 (Tween 80<sup>®</sup>) was provided by Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro – Brazil), medium chain triglycerides (Mygliol 812<sup>®</sup>) was acquired from

Sasol (Witten - Germany), Ethanol from Merck (Barueri – Brazil) and dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from NEON (Suzano – São Paulo – Brazil). Mueller-Hinton agar and Mueller-Hinton broth were purchased from KASVI (Paraná – Brazil).

## 2.2 Test bacteria

The microorganisms tested in the study were one Gram-positive (*Staphylococcus aureus* UFPEDA02) and four Gram-negatives (*Escherichia coli* UFPEDA224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis* ATCC13076 and *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* ATCC14028) bacteria. Stock cultures of bacteria were grown in Mueller-Hinton agar at 37 °C for 24h, before using in bioassays.

## 2.3 Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) Spreadsheet Design

The emulsions were prepared following a spreadsheet design (see supplementary material for more details). This spreadsheet includes two surfactants: one of lipophilic nature [Span 80<sup>®</sup>, HLB=4.3] and the other of hydrophilic nature [Tween 80<sup>®</sup>, HLB=15]. The final HLB value of each system varied between 8 and 15 according to the relative proportion of each surfactant.

### 2.3.1 Preparation of the Emulsions for the HLB analysis

The emulsions were prepared by ultrasonication method, the components were submitted to four homogenization cycles in a sonication apparatus (model QR200, Ultronique, São Paulo - Brazil) for 1 minute at 300W power using an ice bath, followed by an ultrasonic bath for 1 minute. This can be achieved by choosing the surfactant with a non-ionic appropriate HLB value for the system. The oil in water emulsion composition was 5% (w/w) of Carvacrol, 2% (w/w) of surfactants, and 93% (w/w) of water.

### 2.3.2 Analysis of Hydrophilic-Lipophilic Balance

To verify the stability of the emulsions, the methodology used was the Short-Term Stability. The short-term stability was evaluated by the micro-emultocrit technique (MET) (Macedo et al., 2006). The formulations were stored in closed tubes at room temperature and were not homogenized before testing. The heparin-free capillary tubes were filled to 75% with each formulation and placed in a micro-centrifuge (Quimis, model Q10.500, São Paulo - Brazil) at 10,500rpm for 10 min. The evaluation was performed at room temperature on the storage days 1 (D1) and 30 (D30). After the centrifugation cycle, the formulation with the smaller creaming index was chosen according to HLB value for the carvacrol oil. See topic 2.3.3. All experiments were made in triplicate.

### 2.3.3 Creaming Index

The creaming rate was determined experimentally by the measurement of the creaming index (CI) from Eq.1. The CI values were obtained from the ratio between the total height of cream layer (CC) and the total height of emulsion layer (CT). CC and CT were measured directly from the heparin-free capillary with a ruler.

$$\%CI = \left(\frac{CC}{CT}\right) \cdot 100 \text{ Eq. 1}$$

### 2.4 Carvacrol nanoemulsion preparation

With the results obtained from the HLB analysis, it was possible to formulate a nanoemulsion containing the oil with the specific HLB. Carvacrol nanoemulsion (NECV) was prepared by ultrasonication method, the components were submitted to four homogenization cycles in a sonication apparatus (model QR200, Ultronique) for 1 minute at 300W power using an ice bath, followed by an ultrasonic bath for 1 minute. The selected nanoemulsion was

composed of 3% carvacrol oil, 9% surfactants (mix of Tween 80<sup>®</sup> and Span 80<sup>®</sup> with HLB 11) and 88% water. In blank nanoemulsion, the carvacrol was replaced by Mygliol 812<sup>®</sup>.

## *2.5 Characterization of carvacrol nanoemulsion*

### *2.5.1 Determination of carvacrol content in the nanoemulsion*

The amount of carvacrol in nanoemulsion was measured by using an analytical methodology developed in ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-Vis) (model Genesys 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific) at a wavelength ( $\lambda$ ) of 276 nm. Linearity was achieved with the construction of the analytical curve, where the stock solution was prepared with a diluent (1: 1), phosphate-buffered saline buffer (PBS, pH 7.4) and ethanol. After that, six concentrations (5, 10, 15, 20, 25, 30  $\mu\text{g/mL}$ ) were obtained using the same diluent and read on a spectrophotometer. ( $y = 0.0158x - 0.0265$   $R^2 = 0.9965$ ).

### *2.5.2 Macroscopic analysis*

The stability of the nanoemulsion was evaluated over 90 days for visual aspect such as color, creaming formation and phase separation. The samples were stored at a temperature of 8 °C.

### *2.5.3 Particle size, polydispersity index and zeta potential measurements*

Particle size and polydispersity index were determined using a Zetasizer equipment (Nano ZS, Malvern) by the dynamic light scattering technique (DLS). Prior to measurement, the nanoemulsions were diluted in deionized water (1:25 v/v). The zeta potential of the emulsions was evaluated from electrophoretic mobility under an electric field using the same equipment. Samples were diluted with a solution of 1 mM KCl (1:25). All measurements were performed in triplicate and the results presented as mean and standard deviation ( $\pm$ ).

#### 2.5.4 pH

The pH values of the NECV was measured using a multipurpose autotitrator (model MPT-2, Malvern) previously calibrated with buffer solutions at pH 4.0 and 7.0.

### 2.6 Evaluation of antimicrobial activity

#### 2.6.1 Determination of minimum inhibitory (MIC) concentration and bactericidal (MBC) concentrations by visual turbidity

A microdilution assay was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of CV and NECV against the bacteria (CLSI, 2016). The CV was weighed and diluted using DMSO to form Solution I. After that, a portion of Solution I was diluted in Muller-Hinton broth (MHB), forming Solution II at a concentration of 2048 µg/mL. Seven dilutions of CV were prepared ranging from 1024 to 16 µg/mL. The final volume injected in a 96-well plate was 100 µL of MHB and oil dilution and 10 µL of microbial suspensions for each one. The microbial suspension was prepared with saline at  $10^6$  CFU/mL (colony forming units according to 150 McFarland turbidity standards) of standardized microorganism. For NECV there was no dilution in DMSO, only in MHB at 2048 µg/mL concentration. The same test was performed simultaneously using amoxicillin and blank nanoemulsion as control. Plates were incubated at 37 °C for 24 h and each experiment together with control sets was replicated three times. The lowest concentration that inhibited the visible growth of bacteria (MIC) after incubation was recorded (Pfaller et al., 1995). For MBC determination, 10 µL of the samples from wells without visible growth were transferred onto Mueller Hinton Agar (MHA) and were incubated for 24 h at 37 °C. The lowest concentration of the sample that could kill all the initial bacterial population is reported as the MBCs.

#### 2.6.2 Resazurin assay

For cell metabolism identification, it was used resazurin assay. A portion of 10  $\mu$ L of resazurin was added to each one of the plate and incubated for 2 hours. After incubation, the presence of cellular metabolism was visually observed by the color change from purple to pink (Cariri et al., 2019; Rodrigues et al., 2017).

### **3. Results**

#### *3.1 Effect of different HLB values*

To produce stable emulsions, surfactants are added to the system, so the selection of the surfactant used is fundamental for the good stability of the system. A significant step in the selection of the correct surfactant(s) for the emulsion system is the identification of the HLB value of the oil fraction. The concept of the hydrophile-lipophile balance [HLB] was first described by Griffin (1949). A simple methodology to identify the HLB of essential oils is the study of short-term stability of a bath of emulsions produced with the essential oil and ranging the HLB value of the surfactants. The HLB value of the more stable emulsion is considered the HLB of the essential oil (Macedo et al., 2006, Xavier-Júnior et al., 2012; Lopes et al., 2017).

In order to determine the best HLB system, Carvacrol nanoemulsions were prepared by sonication using a surfactant mixture of Tween 80<sup>®</sup> and Span 80<sup>®</sup> with HLB values ranging from 8 to 15. The nanoemulsions were submitted to the micro-emultocrit technique (MET), that was first described by Macedo (2006), as an appropriate tool to evaluate and predict influences provided by small variations in the HLB values on emulsions. It's a simple method that uses low amounts of sample in a short time of execution, being an excellent tool to optimize formulation parameters. The results of the short-term stability study are show in Figure 1.

As expected, the emulsions showed different behaviors to creaming after the centrifugation, according to the HLB values of the mixture of surfactants. The cream index (CI) reflects the emulsion stability by measuring the height of the separated cream layer with time, but also indirectly demonstrates the process of separation of droplets in the creaming. Regarding the CI in Table 1, the lowest CI rates observed at time D1 was F5 with 1.61%. After 30 days (D30), also the lowest CI was observed to F5 (1.96%). Accordingly, the combination of surfactants (Span 80<sup>®</sup> and Tween 80<sup>®</sup>) leads to a required HLB value of 11 to the carvacrol oil used in this study.

### 3.1 Preparation and characterization of carvacrol oil loaded nanoemulsion

From the results obtained from the HLB analysis, it was possible to formulate a nanoemulsion containing the oil with the specific HLB. Previously, several CV nanoemulsions were prepared by sonication method varying the proportions of CV (3 and 5%), surfactants (2, 5 and 9%) and water (86, 88, 90, 92 and 95%) (data not showed). From the prepared nanoemulsions, that one containing 3% oil, 9% surfactant and 88% of water was stable for up to 90 days. The system had an entrapment efficiency of  $99.45\% \pm 0.019$  (equivalent to 2.98 mg of carvacrol per mL of nanoemulsion). The NECV showed a liquid aspect with a white color (Figure 2). During the 90 days of analysis no cream formation or phase separation was observed.

### 3.2 Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of CV and NECV against *E. coli* UFPEDA-224, *P. aeruginosa* UFPEDA-416, *Salmonella enteritidis* ATCC-13076, *Salmonella typhimurium* ATCC-14028 and *S. aureus* UFPEDA-02 was evaluated by the determination of MIC and MBC values using the microdilution test (CLSI, 2016). It was observed that the CV presented visual inhibition at 256 $\mu$ g/mL for *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. enteritidis*, and 512 $\mu$ g/mL for

*S. typhimurium*. Carvacrol did not demonstrate inhibition for *S. aureus* (Table 3). Considering the antimicrobial activity of CV, no differences in the MIC and MBC values were observed, except to *S. enteridis* ATCC-13076.

The methods used to evaluate the antimicrobial activity showed that the incorporation of CV into the nanoemulsion result in the increase of inhibitory activity of CV, except with *E. coli* UFPEDA-224 and *S. enteritidis* ATCC-13076. In addition, NECV showed inhibition concentration for *S. aureus* UFPEDA-02, not observed with free carvacrol. Besides that, the results shown above indicated that Gram-negative microorganisms showed more sensitivity to NECV. In addition, amoxicillin achieved expected results by inhibiting microbial growth. For nanoemulsion without CV (blank nanoemulsion), cell growth was observed, showing that the formulation components do not interfere with the bacterial cell in the concentration used in this study.

It has been reported that the visual aspect of nanoemulsions can interfere with the accuracy of the turbidity's visual identification of the culture media used in the microdilution tests (Tastan et al., 2016). To complement the microdilution test by visual observation, the resazurin oxide-reduction indicator was applied to evaluate the MIC and MBC values of CV and NECV. It was observed that the bacteria incubated at the minimum inhibitory concentrations of the test did not show viability.

#### 4. Discussion

Food contamination is a constant public health problem. Contamination of food by pathogens can occur from food harvest to its distribution, for example (Yeni et al., 2016). These contaminated foods can infect the human population and induce symptoms such as diarrhea, vomiting, abdominal pain, fever, headaches, and muscle aches, or even more severe symptoms, such as, bloody diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome



(Mikhail et al., 2017). The use of molecules of natural origin appears as a strategy to prevent the proliferation of microorganisms in food matrices. The applicability of CV as a natural antimicrobial in the food industry has been demonstrated in several articles (Engel et al., 2017; Moon et al., 2017; Espina et al., 2017; Moon & Rhee, 2016; De Oliveira et al., 2015; Landry et al., 2014). However, the use of free carvacrol can be interfere with organoleptic characteristics and, when in high concentrations, can cause toxicity. The use of essential oil nanoemulsions as a strategy to control antimicrobial activity has been reported. (Donsi et al., 2012; Landry et al., 2014; Landry et al., 2016; Chang et al., 2013). We develop and evaluate the antimicrobial activity of CV loaded nanoemulsion against five microorganisms correlated with food infections.

In this study, we develop a formulation that had stability and antimicrobial activity superior to free carvacrol. Thus, some tests were used to determine the HLB and the stability of the nanoemulsion over 90 days. The microdilution assay was used to evaluate the antimicrobial activity of both bulk CV oil and NECV. About the visual turbidity method, the results indicated that the NECV showed better antimicrobial activity than the free carvacrol against *P. aeruginosa* UFPEDA-416, *S. typhi* ATCC-14028 and *S. aureus* UFPEDA-02. The bacteria *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* and *S. typhi* are commonly found in food matrices, corresponding to the fraction of gram-negative bacteria that cause foodborne and food spoilage. This inhibitory behavior of NECV is corroborated by others works that reported that CV acts on the outer membrane permeability gram-negative bacteria (Cristani et al., 2007; Helander et al., 1998; Tapia-Rodriguez et al., 2017; Althunibat et al., 2016; Landry et al., 2014 Engel et al., 2017; Nostro et al., 2017; Rodrigues et al., 2017; Nostro, 2007). We consider NECV activity below expectations, as it did not significantly increase the biological activity of carvacrol, with MIC values similar to free oil. However, these results are in agreement with previous studies that indicated nanoemulsions have similar antimicrobial

activity to the oil with some bacteria (Ghaderi, Moghimi, Aliahmadi, McClement, & Rafati, 2017; Landry et al., 2014; Mazerei & Rafati, 2019). Other authors found antimicrobial activity at moderate to high concentrations of the CV (Lima et al., 2017; Landry et al. 2014; Freitas et al., 2013; Arfa et al., 2006). The antimicrobial activity of essential oils is widely recognized as involving multiple targets within the cell (Seow et al., 2014). A possible target for the carvacrol nanoemulsion is the cell wall composed of a thin layer of peptidoglycan and an outer membrane formed by a double layer of phospholipids in gram-negative bacteria (Marinelle et al., 2019). Due to the hydrophobic nature, this oil moves through the peptidoglycan layer on the gram-negatives, acting on the cytoplasmic membrane, induces the permeability modifications, changes in the fluidity by the influence the incorporated proteins such as proteins that form efflux pumps, integrity and functionality of the cells with more intensity than in the gram-positive (Zhang et al., 2018; La Stora et al., 2011). This effect is attributed to the presence of hydroxyl groups on the phenolic rings of carvacrol (Xu et al., 2008). When carvacrol enters the bacterium's cytoplasm, the proton is released from the hydroxyl group, increasing the acidity of the cytoplasm. The mechanism to maintain pH close to neutral, ATP-dependent proton efflux pumps are activated, leading to cellular energy depletion (Zhang et al., 2018).

We observed that the tested gram-positive bacteria showed no inhibitory activity for any of the carvacrol concentrations evaluated in this work. This result is in contradiction when compared to *S. aureus* growth inhibition tests, where carvacrol showed growth inhibition (Marinelle et al., 2019; Vasconcelos et al., 2017; Engel et al. 2017). It has also been observed that carvacrol depolarizes most gram-positive bacterial membranes in a concentration-dependent manner (Hammer & Heel, 2012). However, a NECV showed minimal inhibitory activity with 128 µg/mL, showing that the nanoemulsion improved the inhibitory activity against *S. aureus* UFPEDA-02. The nanoemulsions are an alternative in order to deliver

essential oils to the biological membranes, and can also provide protection against their oxidation and evaporation, while the incorporation of food antimicrobials could aid in the protection of food products against growth of spoilage and pathogenic microorganisms (Liolios, Gortzi, Lalas, Tsaknis, & Chinou, 2009; Flores et al., 2011). In general, the nanoemulsification of CV resulted in a similar antimicrobial activity compared with oil free carvacrol (Tastan et al., 2016; Landry, 2014; Chang et al., 2013; Donsi et al., 2012). However, nanoemulsification prevents reactivity of bioactive component with environment, such as water, oxygen, light, and decreases the evaporation or the transfer rate to the outside region (Flores et al., 2011).

The results presented in this work have differences in the composition of the nanoemulsions. All cited work here used a second oil in the nanoemulsion formulation, like medium chain triglycerides (MCT), which is associated to reduce the antimicrobial efficacy of carvacrol (Chang et al, 2013). Furthermore, the enhancement of the antimicrobial activity of essential oils loaded in nanoemulsions are associate with the promotion of the interaction with the microbial cell membranes due an increase in the surface area; an influence of the emulsifiers with the phospholipid in microorganisms membranes; a controlled release of the essential oil for the nanosystem or an increasing in their miscibility in aqueous media (Amaral & Bhargava, 2015; Lu et al., 2018).

One of the requirements for characterizing a nanoemulsion is that it has a drop size between 20-500 nm with a polydispersity index of up to 20%. However, nanoemulsions can undergo destabilization, where stability is one of the most important parameters to be evaluated (Gupta et al., 2016). After 90 days, NECV maintained the average diameter and PDI values in storage test (Table 2). Moreover, the average diameter presented acceptable value and the macroscopic study indicates that the NECV was stable during the 90 days storage at room temperature, exhibiting no visible evidences of creaming or phase separation.

This could be correlated to the high surfactant concentration used to prepare nanoemulsions that led to the aggregation of surfactant molecules around the oil droplets and due to a mixture of surfactants with an HLB value close to the HLB of the carvacrol oil (Pavoni, Perinelli, Bonacucina, Cespi & Palmieri, 2020).

Another important parameter associated with the stability of nanoemulsions is the superficial charge. The nanoemulsion is considered stable when a dominant role is played by the forces causing mutual repulsion of the droplets (Ostoska & Wisniewska, 2014). The Zeta potential value can be related to the stability of colloidal dispersions, indicating the degree of repulsion between the adjacent droplets (Silva, Cerqueira & Vicente, 2012). This value determines the surface charge at the interface of the droplets oriented by the charge of surfactants adsorbed around them, which can be of anionic, cationic or non-ionic nature.

The nanoemulsion prepared in this study contained non-ionic surfactant, then, it would be expected an electrical charge close to zero. However, a negative zeta potential was registered (D60:  $-14.6 \pm 0.529$  mV). Studies involving nanoemulsions with essential oils showed a negative charge of the surface (Acevedo-Fani, Salvia-Trujillo, Rojas-Graü & Martín-Belloso, 2015; Noori et al., 2018). The negative values of the zeta potential contribute to the storage stability of the nanoemulsion, since the repulsive forces exceed the attractive forces between droplets and this droplet repulsion prevents the coagulation and / or coalescence of the dispersed phase of the emulsions (McClements, 2012). When emulsions are exposed to severe mechanical stresses such as ultrasonication, it might cause the releasing of free hydroxyl and carboxyl groups from the oil's chemical composition that move toward the surface of droplets and are available to bind with water (Chen, Gao, Yang, & Gao, 2013). These deprotonated alcohols (R-O<sup>-</sup>) or carboxylic acids (R-COO<sup>-</sup>) contribute to increase the negative charge in the interface of the droplets after the ultrasonication process. The negative

zeta potential of the droplets could also be correlated with the pH and ionic strength of the aqueous phase (Klinkesorn, Sophanodora, Chinachoti, & McClements, 2004).

In view of the results presented, it was observed that the nanoemulsification of the oil did not present significant differences in relation to the biological activity of the tested bacteria, mainly of other gram-positive strains. Time-killer assay should be carried out to check the time of action of the nanoemulsion, such as modification and also checks on the bacterial cell wall.

## 5 Conclusion

The goal of the present study was to develop a carvacrol nanoemulsion from the study of Hydrophilic Lipophilic Balance (HLB) and to evaluate its antimicrobial activity against *Escherichia coli* UFPEDA-224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA-416, *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02, *Salmonella typhimurium* ATCC-13076 and *Salmonella enteritidis* ATCC-14028. We observed that the NECV with 3% carvacrol oil, 9% surfactants, 88% water and HLB 11 demonstrated the same inhibitory activity against *E. coli* UFPEDA-224 and *S. enteritidis* ATCC-14028 than free oil. However, when evaluated this nanoemulsion against *S. aureus* UFPEDA-02, *P. aeruginosa* UFPEDA-416 and *S. typhimurium* ATCC-13076 the inhibiting activity was improved in comparison with the free oil CV. The carvacrol nanoemulsion remained stable during the 90 days of evaluation. Further studies should be done to assess the inhibitory activity of the bacterial growth of the NECV when in contact with food matrices.

## Acknowledgments

The authors thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Process: 88882.440851/2019-01 and 88882.449938/2019-01) for financial support and the Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID) at the Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

### References

- Althunibat, O. Y., Qaralleh, H., Al-Dalin, S. Y. A., Abboud, M., Khleifat, K., Majali, I. S., Aldal'in, H. K. H., Rayyans, W. A., & Jaafraa, A. (2016). Effect of Thymol and Carvacrol, the Major Components of *Thymus capitatus* on the Growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *10* (1), 367-374.
- Amaral, D. M. F., & Bhargava, K. (2015). Essential Oil Nanoemulsions and Food Applications. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences – Open Journal*, *1*(4), 84-87.
- Amaral, V. C. S., Santos, P. R., Silva, A. F., Santos, A. R., Machinski Júnior, M., & Mikcha, J. M. G. (2015). Effect of carvacrol and thymol on *Salmonella* spp. Biofilms on polypropylene. *International Journal of Food Science and Technology*, *50*, 2639-2643.
- Arfa, A. B.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gontarde, N. & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, *46* (2), 149-154.
- Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2015). Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, *47*, 168-177.
- Burt, S. (2004). Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—A Review. *International Journal of Food Microbiology*, *94* (3), 223-253.

Cariri, M. L., Melo, A. D. F., Mizzi, L., Ritter, A. C., Tondo, E., Souza, E. L., Valdramidis, V. & Magnani, M. (2019). Quantitative assessment of tolerance response to stress after exposure to oregano and rosemary oils, carvacrol and 1,8-cineole in *Salmonella enteridis* 86 and its isogenic deletion mutant  $\Delta$ dps,  $\Delta$ rpoS and  $\Delta$ ompR. *Food Research International*, 122, 679-687.

Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2013). Physical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsion formed by spontaneous emulsification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8906-8913.

Chavan, P. S., & Tupe, S. G. (2014). Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*, 46, 115–120.

Chen, J., Gao, D., Yang, L., & Gao, Y. (2013). Effect of microfluidization process on the functional properties of insoluble dietary fiber. *Food Research International*, 54(2), 1821-1827.

Chuesiang, P., Siripatrawan, U., Sanguandeeikul, R., McClements, D. J., & McLandsborough, L. (2019). Antimicrobial activity of PIT-fabricated cinnamon oil nanoemulsions: Effect of surfactant concentration on morphology of foodborne pathogens. *Food Control*, 98 (2019) 405–411.

Clinicaland Laboratory Standards Institute. 2016. Performancestandards for antimicrobial susceptibility testing, 26th ed. CLSI document M100-S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Costa Júnior, J. S., Feitosa, C. M., Citó, A. M. G. L., Freitas, R. M., Henrique, J. A. P., & Saffi, J. (2010). Evaluation of effects of ethanolic extract from *Platonia insignis* Mart. on pilocarpine-induced seizures. *Journal of Biological Sciences*, 10, 747-753.

- Costa, M. F., Durço, A. O., Rabelo, T. K., Barreto, R. S. S. & Guimarães, A. G. (2019). Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healings: a systematic review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *71*, 141-155.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Trombetta, D. (2007). Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(15), 6300–6308.
- Das, Q., Islam, M. R., Marcone, M. F. & Warriner, K. (2017). Potential of berry extracts to control foodborne pathogens. *Food Control*, *73*, 650-662.
- De Oliveira, K. Á. R., de Sousa, J. P., da Costa Medeiros, J. A., de Figueiredo, R. C. B. Q., Magnani, M., de Siqueira, J. P., & de Souza, E. L. (2015). Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. *Food Control*, *47*, 334–339.
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, *44*, 1908-1914.
- Donsì, F., Annunziata, M., Vincensi, M., & Ferrari, G. (2012). Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology*, *159*(4), 342–350.
- Donsì, F., Cuomo, A., Marchese, E., & Ferrari, G. (2014). Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *22*, 212–220.



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

Espina, L., Berdejo, D., Alfonso, P., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2017). Potential use of carvacrol and citral to inactivate biofilm cells and eliminate biofouling. *Food Control*, 82, 256–265.

Flores, F. C., Ribeiro, R. F., Ourique, A. F., Rolim, C. M. B., Silva, C. de B. da Pohlmann, A. R., Beck, R. C. R., & Guterres, S. S. (2011). Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Química Nova*, 34(6), 968–972.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA (2019). CFR—Code of federal regulations, title 21, 3.

Freitas, M. A., Andrade, J. C., Guedes, G. M. M., Tintino, S. R., Souza, C. E., Leite, N. F. Gondimi, C. N. F. L., Morais-Braga, M. F. B., Matias, E. F. F. & Coutinho, H. D. M. (2013). Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do carvacrol através dos métodos de contato direto e gasoso. *Bioscience Journal*, 29(3), 781-786.

Ghaderi, L., Moghimi, R., Aliahmadi, A., McClements, D. J., & Rafati, H. (2017). Development of antimicrobial nanoemulsion-based delivery systems against selected pathogenic bacteria using a thymol-rich *Thymus daenensis* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 832–840.

Griffin, W. C. Classification of surface-active agents by “HLB”. (1949). *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1, 311-326.

Guimarães, A. G., Oliveira, G. F., Melo, M. S., Cavalcanti, S.C., Antonilli, A. R., Bonjardim, L. R., Santos, J. P., Rocha, R. F., Moreira, J. C., Araújo, A. A., Gelain, D. P., & Quintans-Júnior, L. J. (2010). Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *107* (6), 949-957

Guimarães, A. G., Oliveira, M. A., Alves, R. dos S., Menezes, P. dos P., Serafini, M. R., Araújo, A. A. S., Bezerra, D. P., & Quintans-Júnior, L. J. (2015). Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with  $\beta$ -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chemico-Biological Interactions*, *227*, 69–76.

Hammer, K. A., & Heel, K. A. (2012). Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *40*(3), 239–245.

Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M. & von Wright (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 3590-3595.

Jeong, E.-Y., Lee, M.-J., Kang, M.-S., & Lee, H.-S. (2018). Antimicrobial agents of 4-methoxysalicylaldehyde isolated from *Periploca sepium* oil against foodborne bacteria: structure–activity relationship. *Applied Biological Chemistry*, *61*(4), 397–402.

Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P. & McClements, D. (2004), Stability and rheology of corn oil-in-water emulsions containing maltodextrin. *Food Research International*, *37*, (9), 851-859

- La Storia, A., Ercolini, D., Marinello, F., Di Pasqua, R., Villani, F., & Mauriello, G. (2011). Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Research in Microbiology*, 162(2), 164–172.
- Landry, K. S., Chang, Y., McClements, D. J. & McLandsborough, L. (2014). Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 187, 15-21.
- Lee, G., Kim, Y., Kim, H., Beuchat, L. R., & Ryu, J.-H. (2018). Antimicrobial activities of gaseous essential oils against *Listeria monocytogenes* on a laboratory medium and radish sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 265, 49–54.
- Liao X., Liu, D., Xiang Q., Ahn, J., Chen, S. & Ye X. (2017). Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food Control*, 75, 83-91.
- Lima, D. S., Lima, J. C., Cavalcanti, R. M.C. B., Santos, B. H. C., Lima, I. O. (2017). Study of the antibacterial activity of thymol and carvacrol monoterpenes against strains of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 8, 1, 17-21.
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 112(1), 77–83
- Lopes, P. Q., Carneiro, F. B., Sousa, A. L. B., Santos, S. G., Oliveira, E. E., & Soares, L. A. L. (2017). Technological evaluation of emulsions containing the volatile oil from Leaves of *Plectranthus Amboinicus Lour.* *Pharmacognosy Magazine*, 3, 49, 159–167

- Lu, W., Huang, D., Wang, C. R., Yeh, C., Tsai, J., Huang, Y., Li, P. (2018). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 82-89.
- Ma, Y., Ding, S., Fei, Y., Liu, G., Jang, H. & Fang J. (2019). Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control*, 106, 1-8.
- Macedo, J. P. F., Fernandes, L. L., Formiga, F. R., Reis, M. F., Nagashima, T., Soares, L. A. L., Egito, E. S. (2006). Micro-emultocrit Technique: A Valuable Tool for Determination of Critical HLB Value of Emulsions. *AAPS PharmSciTech*, 7 (1), E1-E7.
- Mazerei, Z., & Rafati, H. (2019). Nanoemulsification of Satureja khuzestanica essential oil and pure carvacrol; comparison of physicochemical properties and antimicrobial activity against food pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 100, 328–334.
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719–1729.
- Mikhail, A. F. W., Jenkins, C., Dallman, T. J., Inns, T., Douglas, A., Martin, A. I. C., Fox, A., Cleary, P., Elson, R. & Hawker, J. (2017). An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 associated with contaminated salad leaves: epidemiological, genomic and food trace back investigations. *Epidemiology & Infection*, 146, 187-196.
- Mishra, P., Singh, D., Mishra, K. P., Kaur, G., Dhull, N., Tomar, M., ... & Ganju, L. (2019). Rapid antibiotic susceptibility testing by resazurin using thin film platinum as a bio-electrode. *Journal of microbiological methods*, 162, 69-76.

- Moghimi, R., Aliahmadi, A., McClements, D.J. & Rafati, H. (2016). Investigations of the effectiveness of nanoemulsions from sage oil as antibacterial agents on some food borne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 16, 1-21.
- Moon, H., & Rhee, M. S. (2016). Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 35–41.
- Moon, H., Kim, N. H., Kim, S. H., Kim, Y., Ryu, J. H., & Rhee, M. S. (2017). Teriyaki sauce with carvacrol or thymol effectively controls *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* and indigenous flora in marinated beef and marinade. *Meat Science*, 129, 147–152.
- Moraes-Lovison, M., Marostegan, L. F. P., Peres, M. S., Menezes, I. F., Ghiraldi, M., Rodrigues, R. A. F., Fernandes, A. M., & Pinho, S. C. (2017). Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 233-240.
- Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N. & Bakri, M. M. (2018). Antimicrobial activity of some plant extract against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 361-366.
- Moura, M. C. P. A., Dantas Neto, A. A., Peres, A. E. C., Neitzke, P. R. M.C., & Dantas, T. N. C. (2019). Microemulsions and nanoemulsions applied to iron ore flotation. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(3), 2978–2986.
- Noori, S., Zeynali, F., & Almasi, H. (2018). Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. *Food Control*, 84, 312–320.

- Nostro, A., Marino, A., Ginestra, G., Cellini, L., Di Giulio, M., & Bisignano, G. (2017). Effects of adaptation to carvacrol on *Staphylococcus aureus* in the planktonic and biofilm phases. *Biofouling*, *33*(6), 470–480.
- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., Cioni, P. L., Procopio, F. & Blanco, A. R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymil on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, *56*, 519-523.
- Ostolska, I., & Wiśniewska, M. (2014). Application of the zeta potential measurements to explanation of colloidal Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> stability mechanism in the presence of the ionic polyamino acids. *Colloid and Polymer Science*, *292*(10), 2453–2464.
- Pfaller, M. A., Rhine-Chalberg, J., Barry, A. L., Rex, J. H. (1995). Strain variation and antifungal susceptibility among blood stream isolates of *Candida* species from 21 different medical institutions. *Clinical Infectious Diseases*, *21*, 1507–1509.
- Pavoni, L., Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., Palmieri, G. F. (2020). Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. *Nanomaterials*, *10*, 135, 1-24.
- Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., & Barat, J. M. (2016). Application of cinnamon bark emulsions to protect strawberry jam from fungi. *LWT – Food Science and Technology*, *78*, 265-272.
- Rodrigues, J. B., S., Carvalho, R. J., Souza, N. T., Oliveira, K. S., Franco, O. L., Schaffner, D., Souza, E. L. & Magnani, M. (2017). Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. *Food Control*, *73*, 1237-1246.

Ryu, V., McClements, D. J., Corradini, M. G., Yang, J. S., & McLandsborough, L. (2018). Natural antimicrobial delivery systems: Formulation, antimicrobial activity, and mechanism of action of quillaja saponin-stabilized carvacrol nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 82, 442–450.

Salah, H. B., Bouaziz, H., & Allouche, N. (2019). Chemical Composition of Essential Oil from *Rhanterium suaveolens* Desf. and its Antimicrobial Activity Against Foodborne Spoilage Pathogens and Mycotoxigenic Fungi. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 1–12.

Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2015). Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut Fuji apples. *Postharvest Biology and Technology*, 105, 8–16.

Sarker, S. D., Nahar, L. & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antimicrobial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42, 321-324.

Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H.-G. (2014). Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 625–644.

Severino, P., Andreani, T., Chaud, M. V., Benites, C. I., Pinho, S.C., & Souto, E. B. (2015). Essential oils as active ingredients of lipid nanocarriers for chemotherapeutic use. Essential oils as active ingredients of lipid nanocarriers for chemotherapeutic use. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16 (4), 365-370.

Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., & Sharifi-Rad, J.

- (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32, 1675–1687.
- Silva, H. D., Cerqueira, M. A. & Vicente, A. A. (2012) Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. *Food Bioprocess Technol*, 5, 854-867.
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 252, 28–49.
- Stanborough, T., Fegan, N., Powell, S. M., Singh, T., Tamplin, M. & Chandry, P. S. (2018). Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, 264, 61-72.
- Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2014). The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 304–318.
- Tapia-Rodriguez, M. R., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Martinez-Tellez, M. A., Martins, C. M., & Ayala-Zavala, J. F. (2017). Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. *Food Control*, 75, 255–261.
- Topuz, O. K., Özvural, E. B., Zhao, Q., Huang, Q., Chikindas, M. & Gölükçü, M. (2016). Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens. *Food Chemistry*, 203, 117-123.
- Tastan, O., Ferrari, G., Baysal, T., Donsí, F. (2016). Understanding the effect of formulation on functionality of modified chitosan films containing carvacrol nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 61, 756-771.



Vergis, J., Gokulakrishnan, P., Agarwal, R. K., & Kumar, A. (2013). Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55 (10), 1320–1323.

Xavier-Júnior, F. H., Silva, K. G. H., Farias, I. E. G., Morais, A. R. V., Alencar, E. N., Araujo, I. B., Oliveira, A. G., & Egito, E. S. T. (2012). Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 22(4), 367–372.

Xu, J., Zhou, F., Ji, B.-P., Pei, R.-S., & Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 174–179.

Yeni, F., Yavas, S., Aplas, H. & Soyer, Y. (2016). Most common foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce: a review of recent outbreaks. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 56, 1532-1544.

Yuan, W., Seng, Z. J., Kohli, G. S., Yang, L. & Yuk, H. G. (2018). Stress resistance development and genome-wide transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 adapted to sublethal thymol, carvacrol, and *trans*-Cinnamaldehyde. *Applied and Environmental Microbiology*. 84 (22), 1-14.

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., & Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 59, 282–289.

## ANEXO 1

**Table 1**

Analysis of creaming index (%) for the short-term stability study.

<b>Formulation</b>	<b>HLB value</b>	<b>D1</b>	<b>D30</b>	<b>Macroscopic Aspect</b>
F1	15	4,76	5,36	M + CR
F2	14	3,90	4,84	M + CR
F3	13	3,64	5,74	M + CR
F4	12	4,41	3,23	M + CR
<b>F5</b>	<b>11</b>	<b>1,61</b>	<b>1,96</b>	<b>M</b>
F6	10	4,76	3,57	M + CR
F7	9	5	6,98	PS
F8	8	5,56	6,90	PS

*F: formulation; D: day; HLB: hydrophilic-lipophilic balance; M: milky aspect; CR: creaming; PS: phase separaton.*

## ANEXO 2

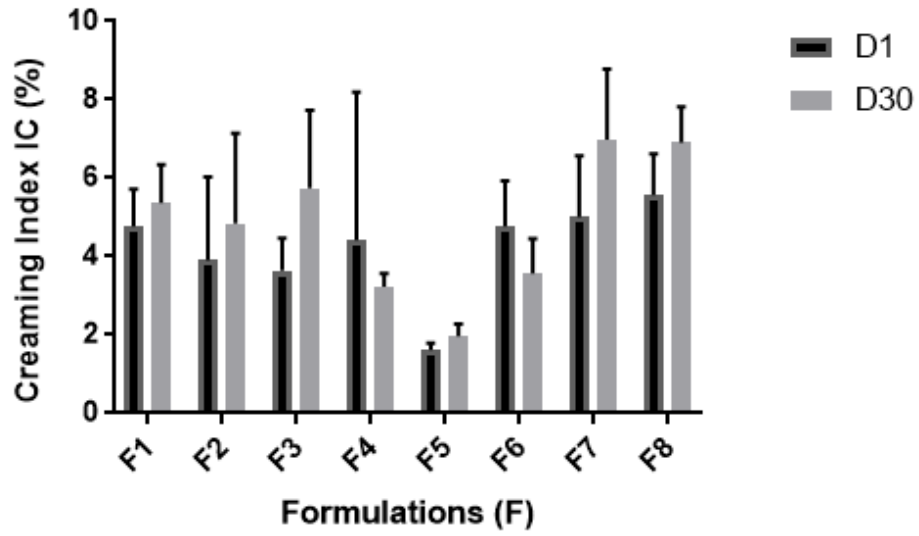


Fig.1. Analysis of creaming index [CI %] for the formulations containing carvacrol oil. The short-term stability study performed by the micro-emultocrit technique in the days (D) 1 and 30.

## ANEXO 3

Table 2

Parameters of stability: average droplet diameter, zeta potential, polydispersion index, and pH of nanoemulsion with carvacrol oil and nanoemulsion without carvacrol oil over 90 days.

Formulation	D1				D30			
	Average droplet diameter (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	pH	Average droplet diameter (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	pH
NE	123.66 ± 1.241	0.183 ± 0.021	-13.00 ± 0.659	5.60 ± 0.021	128.23 ± 0.685	0.220 ± 0.004	-12.63 ± 0.381	5.71 ± 0.031
NECV	125.41 ± 0.782	0.200 ± 0.001	-26.37 ± 0.587	5.43 ± 0.040	166 ± 0.755	0.217 ± 0.007	-38.97 ± 1.082	5.32 ± 0.032

Formulation	D1				D30			
	Average droplet diameter (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	pH	Average droplet diameter (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	pH
NE	127.73 ± 0.069	0.193 ± 0.018	-16.93 ± 0.055	5.85 ± 0.051	124.46 ± 0.455	0.176 ± 0.009	-14.66 ± 0.550	5.86 ± 0.036
NECV	169.57 ± 2.611	0.161 ± 0.029	-17.37 ± 0.115	5.43 ± 0.032	164.5 ± 0.690	0.118 ± 0.024	-14.60 ± 0.529	5.52 ± 0.011

NE: blank nanoemulsion; NECV: nanoemulsion with carvacrol oil; D1: Day 1; D30: Day 30; D60: Day 60; PDI: Polydispersity index.

## ANEXO 4

**Table 3**

Results of minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal concentration (MBC)

Formulation	MIC (µg/mL)					MBC (µg/mL)				
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhi.</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhi.</i>
CV	256	256	> 1024	256	512	256	256	> 1024	512	512
NECV	256	128	128	256	256	256	128	> 1024	256	512

MIC: minimum inhibitory concentration; MBC: minimum bactericidal concentration CV: carvacrol oil; NECV: nanoemulsion with carvacrol oil

**ANEXO 5**

Fig.2. Macroscopic characteristic of nanoemulsion.

## ANEXO 6

## SUPPLEMENTARY MATERIAL:

## Table

Design hydrophilic-lipophilic balance according with the surfactant composition (%).

<i>Formulation</i>	TWEEN 80		SPAN 80		Final HLB value
	(%)	HLB contribution	(%)	HLB contribution	
F1	100	15	0	0	15
F2	91	13,65	9	0,39	14
F3	82	12,3	18	0,77	13
F4	72	10,8	28	1,20	12
F5	63	9,45	37	1,59	11
F6	54	8,1	46	1,98	10
F7	44	6,6	56	2,41	9
F8	34,5	5,17	65,5	2,82	8

*F: formulation; D: day; HBL: hydrophilic-lipophilic balance.*

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a análise dos resultados obtidos pode-se concluir que o estudo do HLB foi possível desenvolver uma NE com uma maior estabilidade, onde a técnica de DLS mostrou-se eficaz para a caracterização quanto ao diâmetro médio das gotículas, PDI e potencial zeta. A NECV se manteve estável ao longo dos 90 dias, mesmo em ausência do inibidor do amadurecimento de Ostwald (MCT). Em relação a atividade antimicrobiana a NECV apresentou os mesmos resultados inibitórios comparado ao CV para as linhagens de *E. coli* e *S. enteridis*. No entanto, quando utilizada contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*, a atividade inibidora é melhor que o óleo livre. Dessa forma, a NECV apresentou estabilidade após 90 dias, indicando um possível candidato para melhorar a segurança alimentar contra essas bactérias. Porém, estudos futuros devem ser realizados para avaliar a atividade inibitória do crescimento bacteriano do sistema quando em contato com a matriz alimentar.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**. 2015. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química). Universidade Federal de São João del-Rei, São João del Rei, 2015.
- ATTWOOD, D. Sistemas Dispersos. In: AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- ANDRADE, S. R. S. R. **Ação antimicrobiana de carvacrol nanocarreado**. 2018. 27 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais). Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2018.
- ARFA, A. B.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOYY, L.; GONTARDE, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, 2006.
- BAMRUNGSAP, S.; ZHAO, Z.; CHEN, T.; WANG, L.; LI, C.; FU, T.; TAN, W. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, v. 7, n. 8, p. 1253-1271, 2012.
- BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC Press: Boca Raton, FL, p. 235-280, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, Unidade de vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Brasília, 2015.
- CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B. S.; CARDOSO, F. C. I. Avanços e desafios na produção in vitro de metabólitos secundários de plantas medicinais. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124-132, 2019.
- CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Pharmscitech**, v. 6, n. 2, p. E329-E357, 2005.
- CHANG, Y.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chemistry**, v. 172, p. 298-304, 2015.
- CHANG, Y.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Physical Properties and Antimicrobial Efficacy of Thyme Oil Nanoemulsions: Influence of Ripening Inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 48, p. 12056-12063, 2012.
- CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. **Medicines**, v.4, n.58, p.1-22, 2017.
- COSTA, A. L. P.; SILVA-JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v.7, n.2, p.45-57, 2017.

COSTA, M. P.; MARQUES, L. G.; OLIVEIRA, F. C. E.; PESSOA, C. Uma abordagem atual sobre o impacto dos sistemas de liberação de drogas nos avanços em nanomedicina. **Boletim Informativo Geum**, v.5, n.2, p.124-133, 2014.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VWNUTI, V.; BISGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, 2007.

DA SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; DOS SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3 ed. Livraria Varela, São Paulo, 2007.

DAMASCENO, S. R. B.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; CARVALHO, N. S.; BRITO, C. F. C.; SILVA, I. S. S.; SOUSA, F. B. M.; SILVA, R. O.; SOUSA, D. P.; BARBOSA, A. L.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J. R. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Science**, v. 94, p. 58-66, 2014.

DAS, Q.; ISLAM, M. R.; MARCONE, M. F.; WARRINER, K. Potential of berry extracts to control foodborne pathogens. **Food Control**, v.73, p. 650-662, 2017.

DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1908-1914, 2011.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; VINCENSI, M.; FERRARI, G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342-350, 2012.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106-120, 2016.

DOS SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; DE FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; Afonso, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, n.6. p. 413-423, 2007.

DUBEY, V.S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 637-646, 2003.

FERNANDEZ, P., ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p.53- 58, 2004.

FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; SOUZA, T. P.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, E. E.; SOARES, L. A. L. Development and Evaluation of Emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) Oil. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1383-1390, 2010.

FLORÊNCIO, M. N. S.; MIRANDA, D. P. S. L.; SANTOS, A. C.; DIAS, C. T.; RUSSO, S. L.; JÚNIOR-OLIVEIRA, A. M. Prospecção tecnológica: um estudo sobre os depósitos de patentes em nanobiotecnologia. **Caderno de Prospecção – UFBA**, v. 10, n. 2, p.315-326, 2017

FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; OURIQUE, A. F.; ROLIM, C. M. B.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, p. 968-972, 2011.

FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; OURIQUE, A. F.; ROLIM, C. M. B.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, p. 968-972, 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança em Alimentos**. School of Science and Technology, Nottinham Trent University. v. 2, Ed. Artmed, p. 200-234, 2013.

FRAGA, M. **Complexação de pDNA com nanoemulsões catiônicas: estudos de formulação e toxicidade em células Hep G2**. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FRANCO, B. D. G.M. **Microbiologia dos alimentos**. Ed. Atheneu, São Paulo, p. 35, 2008.

FRANK, C.; WERBER, D.; CRAMER, J. P.; ASKAR, M.; FABER, M.; HEIDEN, M.; BERNARD, H.; FRUTH, A.; PRAGER, R.; SPODE, A.; WADL, M.; ZOUFALY, A.; JORDAN, S.; KEMPER, M. J.; FOLLIN, P.; MULLER, L.; KING, L. .A.; ROSNER, B.; BUCHHOLZ, U.; STARK, K.; KRAUSE, G. Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 19, p. 1771-1780, 2011.

FRANZOL, A.; REZENDE, M.C. Emulsion stability: a case study involving anionic, cationic and nonionic emulsifiers. **Polímeros**, v.25, p.1-9, 2015.

GALVÃO, K. C. S. **Desenvolvimento de nanoemulsões para uso em alimentos e uso tópico**. 2015. 213 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

GARCIA, J. V. A. S.; COMARELLA, L. O uso Indiscriminado de Antibióticos e as Resistências Bacterianas. **Caderno Saúde e Desenvolvimento**, v. 13 n.7, p. 93-105, 2018.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by “HLB”. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311-326, 1949.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M. A.; DOS SANTOS ALVES, R.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S.; BEZERRA, D. P.; QUINTANAS-JÚNIOR, L. J. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with  $\beta$ -

cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-biological interactions**, v. 227, p. 69-76, 2015.

GUTIÉRREZ, D.; DELGADO, S.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; MARTÍNEZ, B.; CABO, M. L.; RODRÍGUEZ, A.; HERRERA, J. J.; GARCÍA, P. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8547–8554, 2012.

HABIB, S. M.; AMR, A. S.; HAMADNEH, I. M. Nanoencapsulation of Alpha-linolenic Acid with Modified Emulsion Diffusion Method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 695-703, 2012.

HADARUGA, N. G. Ficaria verna Huds. extracts and their  $\beta$ -cyclodextrin supramolecular systems. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2012.

HAMMER, K. A.; HEEL, K. A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 3, p. 239–245, 2012.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

HURTADO, S. R.; IREGUI, R. El Lipopolisacárido. **Revista de Medicina Veterinaria**, n. 19, p. 37-45, 2010.

HUSSEIN, J.; EL-BANNA, M.; MAHMOUD, K. F.; MORSY, S.; LATIF, Y. A.; MEDHAT, D.; REFAAT, E.; FARRAG, A. R.; EL-DALY, S. M. The therapeutic effect of nano-encapsulated and nano-emulsion forms of carvacrol on experimental liver fibrosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 880–887, 2017.

JAWORSKA, M. SIKORA, E.; OGONOWSKI, J.; KONIECZNA, M. Study of O/W micro - and nanoemulsions based on propylene glycol diester as a vehicle for geranic acid. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 2, p. 229-233, 2015.

JEONG, E.Y.; LEE, M. J.; KANG, M. S.; LEE, H. S. Antimicrobial agents of 4-methoxysalicylaldehyde isolated from *Periploca sepium* oil against foodborne bacteria: structure–activity relationship. **Applied Biological Chemistry**, v. 61, n. 4, p. 397–402, 2018.

KOROLEVA, M.; NAGOVITSINA, T.; YURTOV, E. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: stability and degradation mechanisms. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, p. 10369-10377, 2018.

LANDRY, K. S.; CHANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J.; MCLANDSBOROUGH, L. Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 15-21, 2014.

LEE, G.; KIM, Y.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Antimicrobial activities of gaseous essential oils against *Listeria monocytogenes* on a laboratory medium and radish sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 265, p. 49–54, 2018

LEITE, J. M. S. **Desenvolvimento e caracterização de um sistema microemulsionado contendo dexametasona**. 2017. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

LIAO X.; LIU, D.; XIANG Q.; AHN, J.; CHEN, S.; YE, X. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. **Food Control**, v. 75, p. 83-91, 2017.

LIMA, D. S.; LIMA, J. C.; CAVALCANTI, M. C. B.; SANTOS, B. H. C.; LIMA, I. O. Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpênicos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases de amplo espectro. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 1, p. 17-21, 2017.

LOPES, F.; RUÃO, T.; MARINHO, S.; ARAÚJO, R. *E.coli*: Uma doença em notícia em discursos de incerteza e contradição. **Observatório Journal**, v.6, n. 1, p.159-181, 2012.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. *Rev. Port. Saúde Pública*, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016

LOVISON, M. M. **Óleo essencial de orégano nanoemulsionado: produção, caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante *in vitro* e aplicação em patê de frango**. 2017, 128 f. Tese (Doutorado em Ciências de Engenharia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Pirassunganga, 2017.

MACEDO, J. P. F.; FERNANDES, L. L.; FORMIGA, F. R.; REIS, M. F.; NAGASHIMA, T.; SOARES, L. A. L.; EGITO, E. S. Micro-emultocrit Technique: A Valuable Tool for Determination of Critical HLB Value of Emulsions. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, E1-E7, 2006.

MADIGAN, M. MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

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

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. 635-666, 2006.

MAZEREI, Z.; RAFATI, H. Nanoemulsification of *Satureja khuzestanica* essential oil and pure carvacrol; comparison of physicochemical properties and antimicrobial activity against food pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, p. 328–334, 2019.

McCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 2855-330, 2011.

MOGHIMI, R.; ALIAHMADI, A.; MCCLEMENTS, D. J.; RAFATI, H. Investigations of the effectiveness of nanoemulsions from sage oil as antibacterial agents on some food borne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 16, p. 1-21, 2016.

MONTEIRO, C. R. M. **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA POLPA DE BURITI (*Mauritia Flexuosa*) FRENTE À BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS**. 2017. 42 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2017.

MORAES, J. M.; CARVALHO, A. A. L.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A. A. C.; MARQUES, T. H. C.; ANDRADE, L. N.; FREITAS, R. M.; SOUSA, D. P. Anthelmintic activity of carvacril acetato against *Shistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 603-610, 2013.

MORAES-LOVISON, M.; MAROSTEGAN, L. F. P.; PERES, M. S.; MENEZES, I. F.; GHIRALDI, M., RODRIGUES, R. A. F.; FERNANDES, A. M.; PINHO, S. C. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 233-240, 2017.

OLIVEIRA, A. B. A.; PAULA, C. M. D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. I.; TONDO, E. C. Doenças Transmitidas Por Alimentos, Principais Agentes Etiológicos E Aspectos Gerais: Uma Revisão. **Revista HCPA**, v.30, n.3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, I. S.; SILVA, F. V.; VIANA, A. F. S. C.; SANTOS, M. R. V. dos; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MARTINS, M. C. C.; NUNES, P. H. M.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesion in rodents. **Naunyn-Schmiedberg's archives of pharmacology**, v. 385, n. 9, p. 899-908, 2012.

OSTERTAG, F., WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 388, n. 1, p. 95-102, 2012.

PEREIRA, G. G. **Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões**. 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

PFALLER, M. A.; RHINE-CHALBERG, J.; BARRY, A. L.; REX, J. H. Strain variation and antifungal susceptibility among blood stream isolates of *Candida* species from 21 different medical institutions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, p. 1507–1509, 1995.

PINHEIRO, A. C.; LAD, M.; SILVA, H. D.; COIMBRA, M. A.; BOLAND, M.; VICENTE, A. A. Unravelling the behavior of curcumin nanoemulsions during in vitro digestion: effect of the surface charge. **Soft Matter**, v. 9, n. 11, p. 3147-3154, 2013.

PINTO, N. O. F. **Desenvolvimento de nanoformulações do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.** 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PIRES, L. F.; COSTA, L. M.; DE ALMEIDA, A. A.; SILVA, O. A.; SANTOS CERQUEIRA, G.; DE SOUSA, D. P.; PIRES, R. M.; SATYAL, P.; DE FREITAS, R. M. Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 112, p. 42-48, 2013.

POUTON, C. W.; PORTER, C. J. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 625-637, 2008.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BARRETO, R. S.; MENEZES, P. P.; ALMEIDA, J. R.; VIANA, A. F.; OLIVEIRA, R. C.; OLIVEIRA, A. P.; GELAIN, D. P.; DE LUCCA JÚNIOR, W.; ARAÚJO, A. A.  $\beta$ -Cyclodextrin complexed (-)-linalool produces antinociceptive and anti-inflammatory effects superior to those of (-)-linalool in experimental protocols. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.113, p.167-72, 2013.

RESCH, S.; FARINA, M. C. Mapa do conhecimento em nanotecnologia no setor agroalimentar. **Revista de Administração Mackenzie**, v.16, n. 3, p. 51-75, 2015.

REYES, R. E.; SAAD, H. R.; GALICIA, C. S.; HERRERA, M. O., JIMENEZ, R. C. Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 51, n. 1-2 p. 32-43, 2009.

RIMOLI, C.V. **Mecanismo de interação molecular de polieletrólitos antimicrobianos em membrana modelo por espectroscopia vibracional não linear**. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos SP, 2015.

RODRIGUEZ, M. R.; HERNANDEZ-MENDONZA, A.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; MARTINEZ-TELLEZ, M. A.; MARTINS, C. M.; AYALA-ZAVALA, J. F. Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 75, p. 255-261, 2017.

ROJAS-AGIRRE, Y.; AGUADO-CASTREJÓN, K.; GONZÁLES-MÉNDEZ, I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? **Educación Química**, v. 27, n. 4, p. 286-291, 2016.

ROLIM, F. N. A. **Desenvolvimento de sistemas emulsionados contendo óleo de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*)**. 2016. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

RYU, V.; MCCLEMENTS, D. J.; CORRADINI, M. G.; YANG, J. S.; MCLANDSBOROUGH, L. Natural antimicrobial delivery systems: Formulation, antimicrobial activity, and mechanism of action of quillaja saponin-stabilized carvacrol nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 442–450, 2018.

SANTOS, L. L. **Caracterização de bactérias gram-negativas multirresistentes produtoras de  $\beta$ -Lactamase-de-espectro-extendido (ESBL) em cavalos saudáveis e doentes**. 2016. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2016.

SANTOS, E.H.; KAMIMURA, J.A.; HILL, L.E.; GOMES, C.L. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 583-592, 2015.

SANTOS, I. C. V. M.; MARTELOTI, R. R.; OLIVEIRA, P. F.; MANSUR, C. R. E. Development of microemulsions to reduce the viscosity of crude oil emulsions. **Fuel**, v. 210, p. 684-694, 2017.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: **Manole**, 314 p., 2007.

SBALQUEIRO, G. R.; BALVEDI, L. T.; BETTIATO, R.; RIBAS, J. L. C. Uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 10, n. 10, 2018.

SEIBERT, J. B. **Desenvolvimento de nanoemulsão a partir do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf.: Avaliação da sazonalidade e atividades biológicas**. 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

SHANTILAL, J.; BHATTACHARYA, S. (Eds.). **Nanoparticles and nanotechnology in food, in conventional and advanced food processing technologies**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd., 2014.

SHARIFI-RAD, M.; VARONI, E. M.; IRITI, M.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N.; DEL MAR CONTRERAS, M.; SALEHI, B.; SOLTANI-NEJAD, A.; RAJABI, S.; TAJBAKHSH, M.; SHARIFI-RAD, J. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, p. 1675–1687, 2018.

SHINODA, K.; NAKAGAWA, T.; TAMAMUSHI, B.; ISEMURA, T. **Colloidal Surfactants**. 2. ed. New York, Academic Press, 1969.

SILVA, F. V.; GUIMARAES, A. G.; SILVA, E. R. S.; SOUSA-NETO, B. P.; MACHADO, F. D. F.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ARCANJO, D. D. R.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of Oregano. **Journal of Medicinal Food**, v.15, p.984–991, 2012.

SILVA, M. C. **Óleos essenciais: caracterização, aplicações e métodos de extração**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelem Engenharia Química). 2018. 42 f. Centro Universitário de Formiga - UNIFOR, Formiga, 2018.

SILVA, M. F. S. S. **Microbiologia dos alimentos: agentes bacterianos contaminadores**. 2019. 10 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina). Universidade Tiradentes, Recife, 2019.

SILVA, N. E. S. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e emulsões gel- like para uso tópico local**. 2012. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.



SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004.

SOLÉ, I.; PEY, C. M.; MAESTRO, A.; GONZÁLEZ, C.; PORRAS, M.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, p. 417-423, 2010.

SORAGNI, L.; BARNABE, A. S.; MELLO, T. R. C. Doenças transmitidas por alimentos e participação da manipulação inadequada para sua ocorrência: uma revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 9, n. 2, p. 19-31, 2019.

STRECK, L. **Nanoemulsões biocompatíveis para o tratamento da doença de Chagas**. 2017. 130 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, p. 12-20, 2006.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 109, p. 303-318, 2004.

TASTAN, O.; FERRARI, G.; BAYSAL, T.; DONSI, F. Understanding the effect of formulation on functionality of modified chitosan films containing carvacrol nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 756-771, 2016.

TIAN, Y.; CHEN, L.; ZHANG, W. Influence of Ionic Surfactants on the Properties of Nanoemulsions Emulsified by Nonionic Surfactants Span 80/Tween 80. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 37, p. 1511-1517, 2018.

TONDO, E. C. BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**. Vol. 2. Porto Alegre: Ed. Sulina; 2014.

TOPUZ, O. K.; ÖZVURAL, E. B.; ZHAO, Q.; HUANG, Q.; CHIKINDAS, M.; GÖLÜKÇÜ, M. Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens. **Food Chemistry**, v. 203, p. 117-123, 2017.

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

VALERIANO, C.; PICCOLI, R. H.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

VERGIS, J.; GOKULAKRISHNAN, P.; AGARWAL, R. K.; KUMAR, A. Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 10, p. 1320–1323, 2013.

- WALKER, R.M.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant concentration and particle size. **Journal of Food Engineering**, v.164, p.10-20, 2015.
- WEISS, J.; GAYSINKSY, S.; DAVIDSON, M.; MCCLEMENTS, J. Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. In: BARBOSA- CÁNOVAS, G.V. et al. **IUFoST World Congress Book: Global Issues in Food Science and Technology**. Elsevier Inc: Amsterdam, 2009.
- XAVIER-JÚNIOR, F. H.; SILVA, K. G. H.; FARIAS, I. E. G.; MORAIS, A. R. V.; ALENCAR, E. N.; ARAUJO, I. B.; EGITO, E. S. T. Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. **Journal of Drug Delivery Science and Technology** v. 22, n. 4, p. 367-372, 2012.
- XU, J.; ZHOU, F.; JI, B. P.; PEI, R. S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *E. coli*. **Letters in Applied Microbiology**, n. 47, n. 3, 2008.
- XUE, J.; MICHAEL DAVIDSON, P.; ZHONG, Q. Antimicrobial activity of thyme oil co-nanoemulsified with sodium caseinate and lecithin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 1–8, 2015.
- YU, H; HUANG, Q. Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals and Functional Foods Using Nanotechnology. **Bio-Nanotechnology**, p. 593–604, 2013.
- ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, Y.; JIANG, P.; QUEK, S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 59, p. 282–289, 2016.

## APÊNDICE

- Curva analítica do Carvacrol:

