

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FERNANDA APARECIDA LONGATO DOS SANTOS

**BIOCONTROLE DE *Salmonella* HEIDELBERG E *Escherichia coli* SOB
UMA PERSPECTIVA NANOTECNOLÓGICA**

UBERLÂNDIA

2022

FERNANDA APARECIDA LONGATO DOS SANTOS

**BIOCONTROLE DE *SALMONELLA* HEIDELBERG E *ESCHERICHIA COLI*
SOB UMA PERSPECTIVA NANOTECNOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Investigação Etiológica

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi

Coorientador: Dr^a. Lígia Nunes de Moraes Ribeiro

UBERLÂNDIA

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S237 Santos, Fernanda Aparecida Longato dos, 1994-
2022 Biocontrole de Salmonella Heidelberg e Escherichia coli sob uma perspectiva nanotecnológica [recurso eletrônico] / Fernanda Aparecida Longato dos Santos. - 2022.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
Coorientadora: Lígia Nunes de Moraes Ribeiro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.23>
Inclui bibliografia.

1. Veterinária. I. Rossi, Daise Aparecida ,1963-, (Orient.). II. Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes ,1986-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

FERNANDA APARECIDA LONGATO DOS SANTOS

**BIOCONTROLE DE *SALMONELLA* HEIDELBERG E *ESCHERICHIA COLI*
SOB UMA PERSPECTIVA NANOTECNOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Investigação etiológica

Uberlândia, 20 de janeiro de 2022

Banca examinadora

Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi – FAMEV-UFU

Profa. Dra. Aline Diniz Cabral – FMABC

Profa. Dra. Eliane Pereira Mendonça – FAMEV-UFU



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO Nº PPGCVET/ 003/2022				
Data:	20 de janeiro de 2022	Hora de início:	14:02	Hora de encerramento:	16:00
Matrícula do Discente:	12012MEV004				
Nome do Discente:	FERNANDA APARECIDA LONGATO DOS SANTOS				
Título do Trabalho:	Biocontrole de <i>Salmonella</i> Heidelberg e <i>Escherichia coli</i> sob uma perspectiva nanotecnológica				
Área de concentração:	Saúde Animal				
Linha de pesquisa:	Investigação Etiológica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Epidemiologia de Zoonoses				

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico), da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Aline Diniz Cabral - FAMEV; Eliane Pereira Mendonça - FAMEV; Daise Aparecida Rossi** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Daise Aparecida Rossi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Daise Aparecida Rossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/01/2022, às 15:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliane Pereira Mendonça, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/01/2022, às 15:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Diniz Cabral, Usuário Externo**, em 21/01/2022, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3278070** e o código CRC **BFC1BE9C**.

Às mulheres cientistas, dedico.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos dessa dissertação poderiam por si só se tornarem outra dissertação, ou no mínimo um monólogo. Um trabalho desenvolvido inteiramente durante a pandemia de coronavírus com toda certeza contou com o apoio emocional e a ajuda física de toda uma rede de pessoas queridas, a todo momento.

Primeiramente e claro, indispensável, agradeço a Deus, por toda a proteção. Depois de Deus como é de se imaginar só mamãe e papai, e como agradeço a vocês, pela minha vida, por toda minha criação, que com toda certeza do mundo, eu não mudaria nada, cada imperfeição tornou-a mais perfeita que poderia ser. Agradeço a meus irmãos, a Sara por ser minha gêmea, minha companheira, minha força, e meu irmão, por desde pequenos ter me despertado o amor pela ciência.

Pra completar a loucura da era pandêmica: casei, e nessa empreitada toda, quero agradecer ao agora meu marido Guilherme, por ser companheiro como é, até mesmo ficando preso no bloco 2D em um domingo a noite de feriado comigo (e dizem que lá é mau assombrado)!

Agradeço a minha orientadora, Daise, por absolutamente sempre acreditar em mim muito mais do que eu mesma, me dar oportunidades incríveis e força (e broncas, mas sempre com carinho, dá pra acreditar?) que sozinha eu nunca imaginaria ter. Agradeço a Lúcia, minha coorientadora, que sério, sem palavras, quem não conhece essa mulher está perdendo, é um gênio, mulher de garra que está sempre ativa não só na ciência, mas em diversas causas sociais que a maioria não tem coragem nem de expor opinião, te admiro!

Agora chega a hora das minhas moedas de ouro: Tchesca, Marcelo e Silvia, as primeiras pessoas do laboratório que me acolheram, ensinaram, deram risada comigo, e me fizeram amar aquele lugar. Meu muito obrigada!

A Carol e a Micaela tão mais pra família que pra colega de trabalho, afinal, família cuida né? E essas duas riram e choraram comigo, mais de uma vez, de frente pro fluxo laminar enquanto passávamos horas nos projetos umas das outras. Desejo um mundo de realizações pra vocês.

Teve tanta gente importante nesses dois anos: Letícia, Mohana, Rosanne, Régis, Buiatte, Gui, Phelipe, professora Bia, Rogério e Sachenka, quero deixar registrado aqui pra vida toda lembrar de que apesar dos problemas que surgem, se você se cerca de boas pessoas, nenhum problema vai ser grande demais. E toda vez que tive uma situação em que não sabia lidar, ou

até mesmo que eu achei que conseguia, mas claramente não ia dar certo, vocês me forçaram a receber ajuda (eu achei que conseguia contar bactérias de 200 placas de petri sozinha, pode isso?), obrigada por me ensinarem a importância do trabalho em equipe.

Agradeço ao professor Beletti, por me auxiliar com a microscopia eletrônica de transmissão e a professora Eneida da UNICAMP por todas as observações e dicas de apresentação dadas nas minhas palestras. Agradeço a banca, professora Aline, professora Eliane e Guilherme, por se disporem a ler meu trabalho, e pelas contribuições que serão geradas!

Finalmente, quero agradecer aos erros que eu cometi durante todo o meu mestrado. Com eles eu aprendi persistência, e que errar a gente erra mesmo, o que não pode é desistir. Errando a gente busca saber mais do assunto pra corrigir, com isso, aumentamos nosso conhecimento, com isso vem a curiosidade, ampliamos nosso horizonte e será quantas ideias brilhantes surgiram dessa forma?

Ah! Não posso me esquecer de agradecer a UFU, segunda casa desde 2013, e a CAPES pela bolsa que consegui, tão fundamental pra que nós alunos tenhamos como nos dedicar exclusivamente a pesquisa!

Obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo
que ninguém viu, mas pensar o
que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Salmonella spp e *Escherichia coli* são importantes agentes etiológicos de doenças transmitidas pelos alimentos e seu controle ineficaz no ambiente industrial reflete em impactos na saúde pública e na economia, podendo disseminar a resistência bacteriana e dispendar maiores gastos com tratamentos. Este estudo foi dividido em dois capítulos. O primeiro aborda considerações gerais que objetivam elucidar particularidades sobre *Salmonella* e *E. coli*, os sanitizantes comumente empregados no controle e contextualização sobre o emprego da nanotecnologia como alternativa a esse problema. O segundo capítulo objetivou verificar a eficiência do nanocontrole frente *Salmonella* Heidelberg e *E. coli*. Foram desenvolvidas duas formulações de nanopartículas biopoliméricas à base de quitosana para encapsular ácido peracético (APA) na concentração de 0,8%, com ou sem a adição de biossurfactante. Paralelamente, foram desenvolvidas duas formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo manteiga de Karité como lipídeo sólido e óleos essenciais (OE) de canela e orégano como lipídeos líquidos, adicionados de biossurfactante. As quatro formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho da partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta, com análise da estabilidade físico-química a 25°C por 120 (CLN) e 365 dias (nanopartículas biopoliméricas) e a morfologia observada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A eficiência da inibição das formulações frente aos micro-organismos foi testada em ensaio de difusão em discos e concentração inibitória mínima (CIM). Todas as formulações apresentaram estabilidade físico-química adequada e capacidade de inibição dos micro-organismos. A MET evidenciou nanopartículas com morfologia, contornos e distribuição adequados para esse tipo de sistema. A formulação de quitosana encapsulando APA apresentou melhores resultados nos testes de difusão em ágar, com halos de inibição superiores (32,33 – 33,7 mm) ao grupo controle somente com APA 0,8% (22,89 – 26,11 mm) em *S. Heidelberg*. Ainda, as nanopartículas de quitosana encapsulando APA com a adição ou não de biossurfactante obtiveram valores de CIM de 0,63 e 1,25 mg. mL⁻¹, para duas cepas de *S. Heidelberg* e 1,25 mg. mL⁻¹ para cepas de *E. coli*. Já para os CLN, resultados admiráveis foram obtidos com OE de canela, de acordo com os valores da CIM (0,78 mg.mL⁻¹) para cepas de *E. coli*. Já nas cepas de *S. Heidelberg*, os melhores resultados foram obtidos com o CLN contendo OE de orégano (0,65 mg.mL⁻¹). Os resultados sugerem que o uso de nanopartículas pode ser uma alternativa promissora na inibição de micro-organismos de importância para a saúde pública, principalmente no cenário atual de constante aumento na resistência aos antimicrobianos convencionais e procura de soluções que garantam a sustentabilidade ambiental.

Palavras-chave: saúde pública; quitosana; carreadores lipídicos nanoestruturados; sanitizantes.

ABSTRACT

Salmonella spp and *Escherichia coli* are important etiological agents of foodborne diseases and their ineffective control in the industrial environment reflects in impacts on public health and the economy, which can spread bacterial resistance and spend more on treatments. This study was divided into two chapters. The first addresses general considerations that aim to elucidate particularities about *Salmonella* and *E. coli*, the sanitizers commonly used to control and contextualize the use of nanotechnology as an alternative to this problem. The second chapter aimed to verify the efficiency of the nanocontrol against *Salmonella* Heidelberg and *E. coli*. Two formulations of chitosan-based biopolymer nanoparticles were developed to encapsulate peracetic acid (APA) at a concentration of 0.8%, with or without the addition of biosurfactant. In parallel, two formulations of nanostructured lipid carriers (NLC) were developed containing Shea butter as a solid lipid and essential oils (EO) of cinnamon and oregano as liquid lipids, added with biosurfactant. The four formulations were characterized in terms of particle size, polydispersity index and Zeta potential, with analysis of the physicochemical stability at 25°C for 120 (NLC) and 365 days (biopolymeric nanoparticles) and the morphology observed by transmission electron microscopy (TEM). The inhibition efficiency of the formulations against microorganisms was tested in a disk diffusion test and minimum inhibitory concentration (MIC). All formulations showed adequate physicochemical stability and ability to inhibit microorganisms. The TEM showed nanoparticles with morphology, contours and distribution suitable for this type of system. The formulation of chitosan encapsulating APA showed better results in the agar diffusion tests, with higher inhibition halos (32.33 - 33.7 mm) than the control group with only 0.8% APA (22.89 - 26.11 mm) in *S. Heidelberg*. Furthermore, the chitosan nanoparticles encapsulating APA with or without the addition of biosurfactant obtained MIC values of 0.63 and 1.25 mg. mL⁻¹, for two strains of *S. Heidelberg* and 1.25 mg. mL⁻¹ for *E. coli* strains. As for NLCs, admirable results were obtained with cinnamon EO, according to the MIC values (0.78 mg.mL⁻¹) for *E. coli* strains. On the other hand, in *S. Heidelberg* strains, the best results were obtained with NLC containing oregano EO (0.65 mg.mL⁻¹). The results suggest that the use of nanoparticles can be a promising alternative in the inhibition of microorganisms of importance to public health, especially in the current scenario of constant increase in resistance to conventional antimicrobials and the search for solutions that guarantee environmental sustainability.

Keywords: public health; chitosan; nanostructured lipid carriers; sanitizers.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1.	Principais áreas e aplicações da Quitosana.	31
------------------	---	-----------

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Diâmetro do halo de inibição no teste de difusão em disco comparando as formulações com o controle (APA 0,8%). * $p < 0,05$ - One-way ANOVA e post test Tukey. Quit-APA= Ácido peracético 0,8 % encapsulado em Quitosana. Quit-APA/PL1200= Ácido peracético 0,8 % encapsulado em Quitosana + Plantarem 1200. APA= Ácido peracético a 0,8 %.	55
Tabela 2.	Diâmetro do halo de inibição no teste de difusão em disco comparando as emulsões e sua respectiva formulação em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). * $p < 0,05$ - Teste T e <i>post test</i> Tukey. E1=Emulsão de orégano 5%. CLN/CAN= CLN + Canela 5 %. E2= Emulsão de orégano. CLN/OR= CLN + orégano 5 %.	55
Tabela 3.	Concentração inibitória mínima de nanoformulações comparado ao controle (APA 0,8%). * $p < 0,05$ (One-way ANOVA e <i>post test</i> Tukey). Quit-APA= Ácido peracético 0,8 % encapsulado em Quitosana. Quit-APA/PL1200= Ácido peracético 0,8 % encapsulado em Quitosana + Plantarem 1200. APA= Ácido peracético a 0,8 %.	55
Tabela 4.	Concentração inibitória mínima dos CLN comparado a suas respectivas emulsões. * $p < 0,05$ (Teste T e <i>post test</i> Tukey). E1= Emulsão de canela 5 %. CLN=Carreador lipídico nanoestruturado.	56

CLN/CAN= CLN+Canela 5 %. E2= Emulsão de orégano 5 %.

CLN/OR= CLN+orégano 5 %.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Principais agentes etiológicos identificados em uma relação de número de surtos de notificados ao Ministério da Saúde, Brasil, de 2007 a 2019. 24
- Figura 2** Escala nanométrica comparativa. 30

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Estabilidade físico-química das formulações em relação ao tamanho de partícula (A), PDI (B) e potencial Zeta (C), monitorados por 365 dias à 25 °C. PDI=índice de polidispersão. QUIT-APA= Quitosana encapsulando APA 0,8 %; QUIT-APA/PL1200= Quitosana encapsulando APA 0,8 % com adição do biossurfactante Plantaren 1200®. (*p<0,05 - One-ANOVA e post test Tukey). 41
- Figura 2.** Estabilidade físico-química das formulações em relação ao tamanho de partícula (A), PDI (B) e potencial Zeta (C), monitorados por 120 dias à 25°C. PDI=índice de polidispersão. CLN/CAN= CLN + Canela 5 %. CLN/OR= CLN + orégano 5 % (*p<0,05 - One-ANOVA e post test Tukey). 42
- Figura 3.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da formulação Quit-APA (A e B). As imagens foram obtidas por diferentes magnificações: A= 10.000x; B= 100.000x. Quit-APA= 215,48± 2,92 nm 43
- Figura 4.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da formulação QUIT-APA/PL1200 (A e B). As imagens foram obtidas por 44

diferentes ampliações: A= 10.000x; B= 100.000x. Quit-
APA/PL1200= $200,90 \pm 8,47$ nm

Figura 5. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da formulação CLN/CAN (A e B). As imagens foram obtidas por diferentes ampliações: A= 12.000x; B= 25.000x. CLN/CAN= $233,27 \pm 3,89$ nm. **44**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA – Ácido Peracético

APEC – *Escherichia coli* patogênica aviária

CDC – Center of Disease Control

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical Laboratory Standart Institute

CNL – Carreador Lipídico Nanoestruturado

DLS – Espelhamento Dinâmico de Luz

DTA – Doença de Transmissão Alimentar

DTHA – Doenças de transmissão hídrica e alimentar

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EFSA – European Food Safety Authority

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC – *Escherichia coli* extra intestinal

InPEC – *Escherichia coli* diarreiogênica

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

mV – Mili Volts

NESP – Programa Nacional de Vigilância Entérica

nm – Nanômetros

NMEC – *Escherichia coli* associada a meningite neonatal

OE – Óleo Essencial

ONU – Organização das Nações Unidas

PDI – Índice de Polidispersão

SEPEC – *Escherichia coli* septicêmica

STEC – *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga

TPP – Tripolifosfato

UPEC – *Escherichia coli* uropatogênicas

USDA-FSIS – United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspeccion Service

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Objetivos gerais	19
1.2 Objetivos específicos	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Caracterização do gênero <i>Salmonella</i>	20
2.2 Caracterização do gênero <i>Escherichia coli</i> e APEC (<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica aviária)	21
2.3 Impacto econômico e problemas de saúde pública associados a presença de <i>Salmonella</i> Heidelberg e <i>Escherichia coli</i> em alimentos	23
2.4 Sanitizantes industriais tradicionais	26
2.4.1 Resistência aos sanitizantes tradicionais	28
2.5 Nanopartículas	29
2.5.1 Uso de quitosana como sanitizante nanoparticulado	31
2.5.2 Carreadores lipídicos nanoestruturados com óleos essenciais	32
CAPÍTULO 2 – Biocontrole de <i>Salmonella</i> Heidelberg e <i>Escherichia coli</i> sob uma perspectiva nanotecnológica	35
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	72

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por consumo de alimentos contaminados (DTAs) com bactérias possuem relevância mundial em saúde pública, uma vez que atingem cerca de 600 milhões de pessoas e provocam em média 420 mil mortes todos os anos (ONU, 2021). Dentre os agentes etiológicos mais prevalentes das DTAs em humanos estão as bactérias do gênero *Salmonella* e *Escherichia coli* patogênicas, que além da predominância de sintomas entéricos, podem causar complicações e até a morte, dependendo da relação hospedeiro vs parasita (ABU et al., 2019).

Essas bactérias são comumente encontradas em intestinos de aves e mamíferos, o que facilita a contaminação do ambiente industrial durante o abate e processamento, e consequentemente, das carcaças (CDC, 2019; WARD et al., 2021; ATNAFIE et al., 2017). Diante disso, observa-se a necessidade de se realizar a higienização adequada em indústrias alimentícias, objetivando eliminar ou reduzir a níveis aceitáveis a carga microbiana (COLLA et al., 2014). No entanto, há um crescente aumento da resistência microbiana aos sanitizantes convencionais, o que causa impactos negativos na economia e saúde pública, instigando a necessidade de se criar agentes sanitizantes alternativos de mais eficazes e sustentáveis (WEBBER et al., 2019).

O desenvolvimento de nanopartículas atuando como agentes antimicrobianos tem se mostrado promissor e inovador (CHANDRA et al., 2020). Quando aliados aos agentes antimicrobianos, esses nanodispositivos se mostram eficazes no transporte de moléculas, promovem a liberação sustentada do ativo e diminuem sua inativação precoce. Além disso, por poder ser utilizada em doses menores, diminui os riscos de toxicidade e contaminação ambiental, além de apresentar estabilidade, segurança e maior eficiência (OLIVEIRA et al., 2018).

Um dos sanitizantes com maior eficácia utilizado em indústrias alimentícias é o ácido peracético (APA), que possui boa atuação em superfícies e é capaz de inativar diferentes bactérias (OLIVEIRA et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Entretanto, na presença de matéria orgânica sua eficiência é reduzida, possui instabilidade de armazenamento e risco de intoxicação para o manipulador (WEBBER et al., 2019; VOLSCHAN et al., 2019). Também já foi observado que em concentrações de 0,2% e 0,3%, esse agente apresentou eficácia reduzida contra células planctônicas de estirpes de *Salmonella*, além de baixa eficiência contra células sésseis (MACHADO et al., 2010).

A quitosana é um biopolímero catiônico e biocompatível, obtido a partir da desacetilação da quitina, que possui valor na indústria alimentícia por ser utilizada na produção de alimentos funcionais, recobrimento de frutas e por atuar como conservante, bactericida e fungicida (KMIEC et al., 2017; AZEVEDO et al., 2007). O processamento da quitosana utilizando nanotecnologia pode otimizar sua ação, pois o perfil *in vitro* de liberação dos ativos encapsulados por esta matriz reticulada é compatível com a erosão e inchamento das paredes biopoliméricas das nanopartículas, o que possibilita a difusão do ativo para o meio externo de forma prolongada (AOUADA, 2009).

Outro composto que pode ajudar na inibição de bactérias patogênicas são os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), compostos pela mistura de ao menos um lipídio no estado sólido e um líquido sendo estabilizados por surfactantes, capazes de liberar gradativamente o princípio ativo fixado em sua estrutura (KRAMBECK et al., 2021; BASHIRI et al., 2020). Já foi constatado que a utilização de CLN carreando óleos essenciais (OE) mostrou-se eficiente e com melhor desempenho que sanitizantes convencionais à base de cloro (GHODRATI; FARAHPOUR; HAMISHEHKAR, 2019).

Os OE são substâncias sintetizadas, armazenadas e liberadas pelas plantas e possuem atuação contra bactérias, fungos e toxinas associadas, que apresentam baixa toxicidade e são relativamente seguros para a saúde e meio ambiente (KHEZRI; FARAHPOUR; MOUNESI RAD, 2020; TAZEHIJANI; FARAHPOUR; HAMISHEHKAR, 2021). No entanto, os OE apresentam limitações por conterem compostos voláteis, sendo instáveis e facilmente degradados por fatores ambientais. Assim, o encapsulamento em nanossistemas aumenta sua estabilidade e ação antimicrobiana (KHEZRI; FARAHPOUR; MOUNESI RAD, 2020).

A resistência aos antimicrobianos é um dos grandes problemas de saúde pública do século XXI. Paralelamente, as dificuldades de produzir um alimento inócuo é a realidade das indústrias, que precisam estabelecer medidas mais eficazes de controle microbiológico. Nesse contexto, as opções para a geração de novos biomateriais são cruciais para as políticas mundiais de saúde pública. Por estes fatores, o emprego da nanotecnologia apresenta-se como estratégia promissora, economicamente viável e alternativa na inibição de micro-organismos patogênicos nos processos produtivos industriais. Estudos sobre este tema, como o proposto neste trabalho, podem servir como modelo para a utilização de estratégias nanotecnológicas no controle de outros agentes.

1.1 Objetivo geral

Desenvolver novos produtos nanoestruturados de partículas de origem natural, biopoliméricas à base de quitosana para a liberação sustentada de ácido peracético (APA) e carreadores lipídicos nanoestruturados com óleos essenciais de canela e orégano para uso nas práticas de higienização industrial, com adequada estabilidade físico-química e ação antimicrobiana em cepas de *S. Heidelberg* e *E. coli* planctônicas.

1.2 Objetivos específicos

- i) Desenvolver formulações de nanopartículas de quitosana encapsulando APA (0,8%), adicionado ou não de biossurfactante (Plantaren 1200®);
- ii) Desenvolver formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo óleos essenciais de canela e orégano como lipídeo líquido e manteiga de Karité como lipídeo sólido, todas estabilizadas por biossurfactante (Plantaren 1200®);
- iii) Verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* das formulações de quitosana encapsulando APA (0,8%) com e sem biossurfactante, frente a cepas de *S. Heidelberg* e *E. coli* planctônicas;
- iv) Verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* das formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados com óleos essenciais frente a cepas de *S. Heidelberg* e *E. coli* planctônicas;
- v) Determinar a concentração inibitória mínima das formulações de quitosana encapsulando APA (0,8%) com e sem biossurfactante frente a cepas de *S. Heidelberg* e *E. coli* planctônicas e comparar com a concentração obtida para APA 0,8% comercial;
- vi) Determinar a concentração inibitória mínima das formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo óleos essenciais de canela e orégano frente a cepas de *S. Heidelberg* e *E. coli* planctônicas;
- vii) Determinar se na formulação de nanopartícula de quitosana encapsulando APA (0,8%) em que foi adicionado o biossurfactante (Plantaren 1200®) foi obtido efeito adjuvante no potencial de inibição e se houve impacto na avaliação da estabilidade físico-química;
- viii) Caracterizar e acompanhar a estabilidade físico-química das formulações armazenadas em temperatura ambiente (25°C) durante no mínimo 120 dias (formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados) e no máximo 365 dias (nanopartículas de quitosana encapsulando APA

0,8%), por meio da análise de tamanho de partículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS);

ix) Realizar a caracterização morfológica das formulações desenvolvidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);

x) Publicação de artigos científicos e solicitação de depósito de patente se obtidos resultados promissores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é composto por bastonetes Gram negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, não esporulados, anaeróbios facultativos, capazes de produzir gás sulfídrico a partir da fermentação da glicose e reduzir o enxofre (WHO, 2018). A maioria das espécies do gênero tem a capacidade de se desenvolver em uma faixa de temperatura entre 7 °C a 45 °C e pH entre 4,5 a 9,0. Além disso, apresentam boa resistência a dessecação e ao congelamento, o que lhes proporcionam maior possibilidade de sobrevivência, podendo permanecer em diversos ambientes, por longos períodos, de dias a anos (PALMER et al., 2021).

A classificação de *Salmonella* é determinada a partir da análise das estruturas antigênicas presentes na superfície celular, sendo elas: antígeno somático (O), flagelar (H) e capsular (vi), de acordo com o esquema de White-Kauffmann-Le Minor (GUIBOURDENCHE et al., 2010). A partir do antígeno somático O, a sorotipagem pode ser realizada por reações simples e rápidas, auxiliando na coleta de dados epidemiológicos, determinando a qual grupo o isolado pertence. Contudo, todas as estruturas antigênicas podem ser utilizadas para a sorotipagem. O antígeno H identifica o sorovar dos isolados e o antígeno capsular ocorre em apenas algumas cepas, sendo elas *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi C e *Salmonella* Dublin, podendo eventualmente ocorrer também em *Citrobacter* (RYAN; O'DWYER; ADLEY, 2017).

Os sorovares mais comumente envolvidos em surtos de DTA são *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. Porém, nos últimos anos, pode-se observar um crescente número de casos envolvendo o sorovar Heidelberg. O consumo de carne de frango e ovos contaminados tem sido os alimentos mais incriminados na infecção (NAKAO et al., 2018).

Além disso, os dados demonstram que cepas de *S. Heidelberg* envolvidas em surtos são muitas vezes multirresistentes aos antimicrobianos, geram casos mais graves da doença com necessidade de hospitalização, e podem inclusive, culminar em óbito (CDC, 2018).

Salmonella enterica subespécie *enterica* possui sorotipos específicos que podem ou não ser limitados a animais ou humanos, como exemplos: *S. Tiphymurium* e *S. Paratyphi*, causadoras de febre tifoide e não tifoide, em humanos e *Salmonella Gallinarum* (biovars *Gallinarum* e *Pullorum*), responsáveis por causar salmonelose em aves (BRASIL, 2019).

Salmonella spp é normalmente encontrada no intestino de animais como aves, bovinos, suínos, animais domésticos como cães e gatos, e também em répteis e animais invertebrados. *S. Typhimurium* também já foi identificada em ouriços de estimação (CDC, 2019). Por estar dispersa no ambiente, a forma de transmissão mais comum é a ingestão de alimentos contaminados por fezes de animais, sobretudo quando estão crus ou mal passados ou pela falta de boas práticas de higiene ao se manipular alimentos (BRASIL, 2020).

2.2 Caracterização do gênero *Escherichia coli* e APEC (*Escherichia coli* patogênica aviária)

A bactéria *E. coli*, primeiramente nomeada como “*Bacterium coli commune*”, foi isolada em 1885, pelo alemão Theodor Escherich em resíduos fecais. Possuem formato de bacilos e pertencem a família Enterobacteriaceae (CLEMENTE et al., 2019). São micro-organismos que podem crescer em aerobiose ou anaeróbios facultativos, não é capaz de produzir a enzima oxidase, mas é positiva para a produção de catalase positiva, além de utilizar fontes simples para obter carbono e nitrogênio. São bacilos Gram negativos, não formadores de esporos, com capacidade respiratória e fermentativa, com alta mobilidade em sua maioria, por meio de flagelos peritríqueos (CUMONT et al., 2021; HABETS et al., 2020).

Com relação à temperatura de crescimento, a espécie é considerada mesófila, propagando-se entre 7 °C e 46 °C, com temperatura ótima de 37 °C. Comumente, desenvolve-se em alimentos com atividade de água mínima de 0,95 e pH entre 5,5 a 7,5, com o mínimo de desenvolvimento entre 4,0 e 4,5. Seu tamanho pode variar de 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm e formam colônias lisas ou rugosas em meios de cultura sólido (BALLEM et al., 2020; NAG et al. 2021).

E. coli tem como habitat natural o trato intestinal dos seres humanos e animais, mamíferos e aves, sendo considerada importante na manutenção da fisiologia intestinal.

Pertencem ao grupo de coliformes termotolerantes, usadas como indicadores de contaminação fecal em água e alimentos (WARD et al., 2021).

Diferentes cepas de *E. coli* ocasionam diversas doenças intestinais e extraintestinais utilizando fatores de virulência que modificam muitos processos celulares. Estes fatores de virulência são comumente adquiridos por elementos móveis do genoma e podem ser a causa de diferentes prejuízos aos hospedeiros infectados. Para a intervenção de patogenias causados pela *E. coli*, é relevante a compreensão dos mecanismos de patogenicidade, estudo de características genotípicas, distribuição filogenética e desenvolvimento de antibacterianos efetivos (GREVSKOTT et al., 2021).

Apesar da maioria das cepas serem consideradas ambiental e inócua, várias podem provocar enterites com vômitos e diarreia, infectando principalmente indivíduos com a imunidade afetada, que não possuem alimentação, tratamento de água e/ou saneamento básico adequados. Além disso, infecções por cepas específicas de *E. coli*, classificadas como enterohemorrágicas e produtoras de shiga toxinas podem causar a síndrome urêmica hemolítica, anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, lesão renal aguda, e resultar no óbito de hospedeiros (ABU et al., 2019).

Nesta perspectiva, os tipos patogênicos de *E. coli* são comumente categorizadas em duas formas, sendo as linhagens diarreiogênicas (InPEC), que provocam infecções intestinais e as linhagens extra intestinais (ExPEC), que ocasionam doenças fora do ambiente intestinal. Assim, no grupo diarreiogênico, os patotipos são bem determinados por meio das diferentes combinações de fatores de virulência, sendo classificadas como: *E. coli* enteroinvasoras (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (HABETS et al., 2020).

Já os tipos patogênicos extra-intestinais possuem características de virulência, genotípicas e fenotípicas próximas, o que impossibilita classificá-las por fatores de virulência ou biocaracterísticas (DESVAUX et al., 2020; NAILI et al., 2019). Com isso, os patógenos extra intestinais são divididos em *E. coli* uropatogênicas (UPEC), *E. coli* associada a meningite neonatal (NMEC), *E. coli* septicêmica (SEPEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC), que causam colibacilose aviária (BARBIERI et al., 2021).

As APEC, assim como outras ExPEC têm um vasto conjunto de genes ligados a fatores de virulência, responsáveis por uma série de patologias em mamíferos e principalmente aves, ocasionando severos prejuízos na indústria avícola. A capacidade de aderência da APEC no

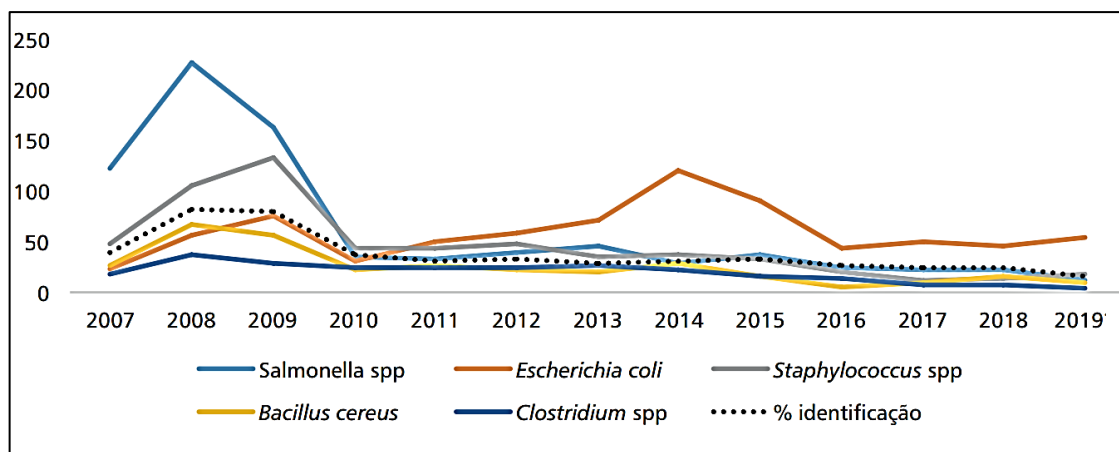
sistema respiratório do hospedeiro, propicia a colonização em órgãos internos, bem como a resistência à fatores do sistema imune, capacidade de multiplicação em líquidos corpóreos com pouco ferro e de causar efeitos citopáticos (RUAN et al., 2021; YIN et al., 2021). Neste sentido, tem-se ainda o perfil de resistência que a APEC pode desenvolver quando submetida a presença de antimicrobianos, sendo comumente citado, a troca de genes de resistência da APEC com outras bactérias do mesmo gênero ou de outros, o que a torna uma preocupação mundial a respeito da resistência aos antimicrobianos (YIN et al., 2021)

Além disso, algumas cepas de APEC causam em seus hospedeiros a colibacilose aviária, que é uma consequência da interação entre a bactéria, hospedeiro e o ambiente. Quando não há intervenção, este processo infeccioso pode causar a morte da ave por septicemia. (AHMAD et al., 2021; YIN et al., 2021). O impacto gerado pela presença de cepas APEC no ambiente industrial é ocasionado pelas trocas de genes de resistência com outras cepas de *E. coli*, como evidenciado no trabalho de Kathayat et al. (2021), o que sugere a investigação e controle de APEC no ambiente industrial.

2.3 Impacto econômico e problemas de saúde pública associados a presença de *Salmonella* Heidelberg e *Escherichia coli* em alimentos

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU, 2021), a contaminação alimentar associada a bactérias é uma preocupação mundial, já que são computados anualmente cerca de 600 milhões de casos de enfermidades causadas pelo consumo de alimentos contaminados. No Brasil, as bactérias são os agentes etiológicos mais prevalentes em surtos de doenças transmitidas pelos alimentos, com destaque para *Salmonella* e *E. coli* (Figura 1) (BRASIL, 2019). Isso evidencia a necessidade de intervenção para o controle destes patógenos, como o desenvolvimento antimicrobianos mais eficazes e seguros.

Figura 1: Principais agentes etiológicos identificados em uma relação de surtos notificados ao Ministério da Saúde, Brasil, de 2007 a 2019.



Fonte: Ministério da Saúde (adaptado), 2021.

Nos Estados Unidos, as doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) por bactérias dos gêneros *Salmonella* e *E. coli* atingem cerca de 1,35 milhões de pessoas, com 26.500 hospitalizações e 420 mortes anualmente (CDC, 2019). No Brasil entre os anos de 2000 e 2017, foram registrados 12.660 surtos de doenças transmitidas por alimentos, sendo os agentes etiológicos mais prevalentes *E. coli* e *Salmonella* spp. (BRASIL, 2018).

Devido a importância das DTHAs na saúde pública, órgãos de vigilância internacionais como o CDC (*Centers for Disease Control*) e EFSA (*European Food Safety Authority*) monitoram os casos humanos ocorridos em seus territórios, e incluem nos estudos dos agentes etiológicos isolados de humanos, animais e alimentos, além da pesquisa de resistência aos antimicrobianos. Os fatores determinantes para os casos e medidas de controle também são investigados e discutidos (CDC, 2019). Dentre os alimentos mais incriminados em DTHAs, destacam-se os ovos e as carnes cruas, principalmente de frango, peru e porco (EFSA, 2016), o que instiga para a necessidade de medidas de controle para evitar a contaminação destes alimentos. A higienização ambiental adequada das unidades de produção de alimentos é uma das formas de mitigar a contaminação cruzada durante a produção (SOUZA et al., 2021).

Nos Estados Unidos, os órgãos oficiais consideram que há subnotificação de casos de salmonelose e estimam que para cada pessoa confirmada com a doença em teste laboratorial, há mais 30 pessoas que possuem a doença sem que seja relatado (CDC, 2019). A realização de estudos incompletos dificulta o entendimento do real impacto econômico e em saúde pública da enfermidade, além de limitar o entendimento sobre a epidemiologia do agente etiológico envolvido.

As DTHAs resultam em impactos econômicos importantes, que incluem os custos associados à doença, com o tratamento, hospitalização, sequelas e morte. Os custos ampliam-se ao setor produtivo e governos. Nas indústrias, há investimento direto em ações de prevenção, incluindo a higienização, perda na produtividade, controle na produção primária e monitoramento, seja para atender aos padrões legais ou como estratégia preventiva. Já institucionalmente, deve haver investimento expressivo nos setores regulatórios e de saúde pública, além dos custos indiretos envolvendo afastamento de serviço, aposentadorias por sequelas ou morte (SOUZA et al., 2021).

Dados obtidos em 2016 pelo CDC estimam que os Estados Unidos tem um custo anual de aproximadamente 14,6 bilhões de dólares com DTHA. O USDA-FSIS (*United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service*), órgãos de inspeção e segurança alimentar, relataram ainda que, 3,7% das carcaças de frango comercializadas nos Estados Unidos apresentavam positividade para *Salmonella*, e dessas, 3,4% foram identificadas como *S. Heidelberg* (NACMCF, 2019). Além disso, este sorovar foi o 12º sorovar mais frequente em surtos de salmonelose nos Estados Unidos, que segundo Etter et al. (2019), deve-se a sua tolerância a condições de estresse e capacidade de se ligar a superfícies abióticas, formando biofilmes, além dos fatores de virulência.

Além das adversidades causadas pela *Salmonella*, de acordo com a pesquisa de Sharp et al. (2020), *E. coli* também é um importante patógeno alimentar, principalmente cepas classificadas como enterohemorrágicas produtoras de toxina shiga (STEC), que causa gastroenterite infecciosa. A infecção inclui entre os sinais e sintomas mais frequentes, a dor abdominal e diarreia com sangue, que pode evoluir para colite hemorrágica grave, síndrome urêmica hemolítica, insuficiência renal aguda e trombocitopenia, podendo causar a morte. STEC afeta predominantemente hospedeiros em extremos de idade, como menores de cinco e maiores de 60 anos (MCKEE et al., 2020).

Dentre as DTHAs, há alta ocorrência de *S. Heidelberg* e *E. coli*, bem como, recorrência de resistência ou multirresistência aos antimicrobianos nos isolados, provavelmente, em decorrência ao uso indiscriminado de antibióticos, o que torna o tratamento dificultoso, com poucas opções de drogas para recuperar quadros mais graves. Ainda, apesar de APEC não ser comumente citada como zoonose, seu perfil altamente resistente a torna uma transferidora de genes de resistência para outras *E. coli* zoonóticas e outros patógenos alimentares (RAO et al., 2020,).

Doenças causadas por *S. Heidelberg* e *E. coli* apresentam-se mais severas, com altas taxas de letalidade e quadros de infecções extra intestinais sistêmicas, além da possibilidade de maior risco de óbito em crianças, grávidas e idosos (MCKEE et al., 2020). A busca por opções de prevenção nas indústrias tem grande impacto na garantia da segurança alimentar e toda a cadeia de processamento deve ser avaliada, a fim de minimizar potenciais riscos à saúde pública (MACHADO et al., 2020).

2.4 Sanitizantes industriais tradicionais

Por definição, sanitização é a redução de micro-organismos patogênicos a níveis que não apresentem riscos à saúde, com base em protocolos pré-estabelecidos, de forma que não haja prejuízos ao produto e nem ao consumidor (FDA, 2020). Os sanitizantes são compostos que possuem em suas fórmulas agentes capazes provocar efeito letal para micro-organismos (CARVALHO et al., 2019).

É necessária constante vigilância aos protocolos de sanitização nas unidades processadoras de produtos de origem animal, visando a criação de uma barreira sanitária para reduzir aos padrões aceitáveis a carga de micro-organismos presentes nas superfícies, ou ainda sua eliminação, evitando contaminação cruzada com as carcaças (COLLA et al., 2014). A sobrevivência dos micro-organismos é potencializada quando os mesmos passam da forma de vida livre (planctônica) para a forma de vida sésil (biofilmes), que favorece maior tolerância aos fatores estressantes e proteção à ação de agentes antimicrobianos (BRESSLER et al., 2009).

O contato entre as bactérias resistentes facilita a transferência de genes de resistência, dificultando ainda mais sua eliminação, dentre elas, cepas de *E. coli* e *Salmonella*, comumente têm apresentado tolerância aos sanitizantes industriais (TOMAT et al., 2017). Dessa forma, é provável que quantidades inadequadas de diferentes tipos de desinfetantes estejam sendo utilizadas na tentativa de degradação das bactérias resistentes (CAMPO et al., 2020; GREVSKOTT et al., 2021).

No Brasil, os agentes com princípios ativos dos grupos quaternário de amônio, liberadores de cloro ativo e à base de APA são os mais utilizados na higienização. Sua escolha varia de acordo com o micro-organismo alvo e tipo de material a ser sanitizado. Para uma higienização eficiente, além da escolha correta do sanitizante, também é necessária atenção ao modo e tempo de aplicação, que possuem fundamental participação nos resultados finais do processo (SREY et al., 2013).

Na indústria, o aço inoxidável é bastante utilizado devido a sua característica de maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção. Estudo como o de Oliveira et al. (2019) sugere que os biofilmes podem ser aderidos ao aço inoxidável com a mesma facilidade que em superfícies como poliuretano e polipropileno, mas, por se tratar de uma superfície menos irregular, o processo de sanitização é mais eficiente. A capacidade de formação de biofilmes em superfícies de aço inoxidável também foi observada no trabalho de Brasão et al. (2021) ao testar cepas de *Salmonella* Minnesota em diferentes superfícies como o aço inoxidável, poliuretano e polipropileno, sugerindo que a alta capacidade de adesão e formação de biofilmes se deve a novos processos adaptativos desse sorovar visando a sobrevivência.

Um dos sanitizante mais utilizados na higienização de superfícies industriais é o APA, que é também geralmente aplicado diluído em água aquecida a 85°C em utensílios (OLIVEIRA et al., 2019). O modo de ação do APA é complexo e resulta na ruptura de ligações químicas no interior da membrana celular (CREMIEUX; DAVIN-REGLI, 2000). O APA combina as propriedades do oxigênio ativo do peróxido ligado à molécula de ácido acético, equilibrando as propriedades ácidas e oxidantes. Sua forma de comercialização é na concentração máxima de 15%, devendo ser adequadamente diluído para diminuir o potencial de autocombustão e intoxicação (EFSA, 2016).

Além disso, o efeito do APA influencia na dinâmica entre cepas patogênicas e não patogênicas devido a reações diferenciais com várias biomoléculas, como aminoácidos, lipídios e ácidos nucleicos, que resultam na interrupção de várias funções celulares ou moleculares das bactérias (KITIS, 2004). Com isso, o APA, por ser um agente químico-oxidante, interagindo principalmente com ligações sulfidríla e enxofre de proteínas e enzimas, ocasiona a desativação das bactérias e, conseqüentemente, sua eliminação (BISWAL, 2014; CAMPO et al., 2020).

A utilização do APA possui várias vantagens, algumas delas são a alta eficácia na sanitização quando utilizada baixas concentrações, ação em diversos micro-organismos, baixo tempo de contato, pode ser utilizado em amplas faixas de pH, não ocorre bioacumulação de seus resíduos e tem menor impacto ambiental devido às baixas concentrações utilizadas (CAVALLINI et al, 2013; LUUKKONEN et al, 2014). O APA é muito utilizado na indústria de alimentos por agir bem em baixas condições térmicas (em torno de 4 °C), e também em temperaturas mais altas próximas a do ambiente (15-30 °C), com eficácia altamente satisfatória. Ainda que em células planctônicas o APA apresente bons resultados, possui menor capacidade em remover células aderidas em biofilmes, possivelmente pela presença da matéria orgânica (JERÔNIMO et al., 2012; ZIECH, 2015).

Outras desvantagens na utilização do APA são a instabilidade quando não diluído, a sua alta capacidade de corrosão em metais, baixa atividade em alterações do pH, além do risco para a saúde do manipulador, sendo necessário o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) adequados, de forma a evitar irritação nos olhos, pele e trato respiratório (SILVA; RABELO, 2020).

É necessário que na indústria sejam conhecidos os riscos microbiológicos, para que se estabeleçam protocolos de higienização efetivos, de forma a controlar e inibir a formação de biofilmes e fornecer ao consumidor um produto inócuo e seguro. A escolha do sanitizante, o tempo de ação e a forma de utilização de acordo com as legislações vigentes e recomendações do fabricante devem sempre estar alinhados e atualizados buscando a máxima eficácia (GARCIA, 2015; MILLEZI, 2012).

2.4.1 Resistência microbiana aos sanitizantes tradicionais

A resistência antimicrobiana representa grande ameaça à saúde pública em todo o mundo. Dados da OMS sugerem que até o ano de 2050 a resistência aos antimicrobianos pode levar a um custo de aproximadamente US\$100 trilhões, além dos consequentes óbitos provocados (BRASIL, 2019). Tão importante quanto o uso racional de antimicrobianos na produção animal, visando reduzir casos de resistência, está o emprego adequado de sanitizantes nas indústrias de alimentos, respeitando a legislação e as instruções de uso preconizadas pelo fabricante, de modo a evitar a subdosagem e consequente geração da resistência (COLLA et al., 2012).

Enquanto as causas da resistência a drogas de importância clínica são profundamente estudadas, àquelas de relevância à sanitização, a despeito de sua relevância, ainda são pouco elucidadas. A resistência microbiana aos sanitizantes apresenta crescimento e carece de atenção, dado seu tamanho impacto na saúde pública e na economia, como os grandes prejuízos causados à exportação de carnes, principalmente a carne de frango (WEBBER et al., 2019). Liu et al. (2018) observaram que as bactérias resistentes têm demonstrado boa tolerância à desinfecção convencional nas indústrias que utilizam cloro ou quantidades inadequadas de sanitizantes.

Dentre os sanitizantes comumente utilizados em frigoríficos como a amônia quaternária e o APA, o último é eficaz em baixas concentrações, com custo acessível e ação rápida. No entanto, quando há presença de matéria orgânica, sua eficácia é reduzida, além de outras

desvantagens como a instabilidade no armazenamento e risco de intoxicação para o manipulador (WEBBER et al., 2019; VOLSCHAN et al., 2019). Estudos de Machado et al. (2010) sugerem que até mesmo em células planctônicas (em suspensão), o APA apresentou eficácia reduzida nas concentrações de 0,2 % e 0,3 % para estirpes de *Salmonella*.

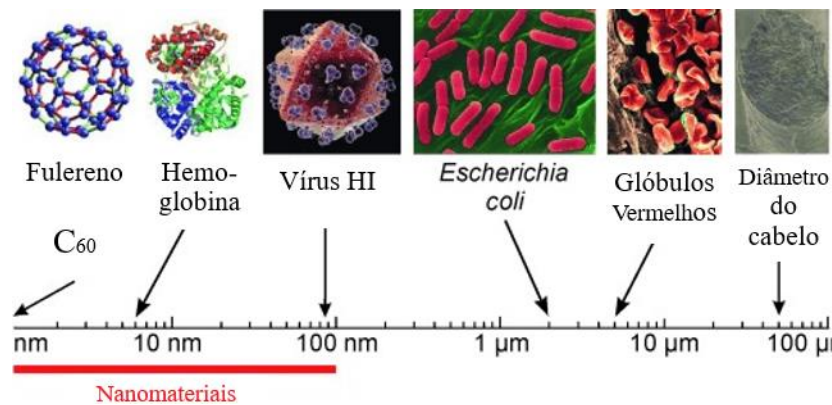
A fim de superar tais obstáculos, o desenvolvimento de nanopartículas tem sido exponencialmente descrito para atuar como agentes antimicrobianos inovadores. Tais nanodispositivos são molecularmente planejados com o objetivo de aumentar a eficácia e contribuir para o reconhecimento e ligação celular. É possível encapsular moléculas para múltiplas aplicações, o que torna estes sistemas altamente promissores (CHANDRA et al, 2020).

Com esse conhecimento, o desenvolvimento de nanopartículas carreando agentes antimicrobianos se mostra uma aliada eficaz no transporte de moléculas, promovendo uma liberação sustentada do ativo e diminuindo a sua inativação precoce, atuando como “*drug delivery systems*”. O produto nanoparticulado pode ser administrado em doses menores, em consequência, ocorrerá menor riscos de toxicidade e impacto ambiental, apresentando estabilidade, segurança e eficácia (OLIVEIRA et al., 2018).

2.5 Nanopartículas

As nanopartículas são estruturas em escalas nanométricas, com dimensões entre 1 e 500 nm, obtidas por avanços da nanociência (BAKER et al., 2017). O termo “nano” é originário da palavra grega “*dwarf*” que significa anão, e traduz de forma simples o quão pequenas são essas partículas, que não podem ser observadas a olho nu. Para melhor compreensão, podemos comparar estas estruturas a outras pertencentes à escala nanométrica, como bactérias e vírus e moléculas como a hemoglobina ou o fulereno, uma molécula alotrópica de carbono, composta por 60 átomos de carbono, e dimensão de 1 nm (Figura 2) (GOESMANN; FELDMANN, 2010).

Figura 2: Escala nanométrica comparativa.



Fonte: Adaptado de Goesmann e Feldmann (2010).

Dado ao processo de miniaturização, uma partícula com essas dimensões apresenta um drástico aumento da área superficial quando comparada com partículas da mesma natureza em macroescala. Isto influencia fortemente nas propriedades físico-químicas e atividade biológica das moléculas, possibilitando interações específicas, que são características de um sistema nanoparticulado (KHAN et al, 2019).

O estudo de nanopartículas teve início no século XX a partir da observação dos coloides, e graças ao avanço da microscopia eletrônica, foram desenvolvidos métodos eficazes de análise que permitem manipular moléculas em escala nanométrica, além da sua observação tridimensional e realização de técnicas *in situ* (MULLER et al, 2009; HOSOKAWA et al, 2007).

No entanto, além do tamanho da partícula, é importante monitorar a sua polidispersão, que nada mais é que o perfil de distribuição dos tamanhos, sendo requerido que sejam os mais homogêneos possíveis, e do potencial eletrostático, parâmetros estes que asseguram o tempo de prateleira dos sistemas nanoestruturados. No que se refere às nanopartículas biopoliméricas, propriedades como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e facilidade no preparo permitem que sejam aplicadas em diversas áreas, tais como a biologia, medicina, odontologia, agronomia, indústrias farmacêuticas, indústrias de alimentos e cosmetologia (SHARIFI et al., 2020).

2.5.1 Uso de quitosana como sanitizante nanoparticulado

A quitosana é um biopolímero catiônico e biocompatível, obtido a partir da desacetilação da quitina, que pode ser encontrada de forma abundante na natureza no exoesqueleto de animais invertebrados, como insetos, crustáceos (caranguejo, camarão, lagostas), carapaça de moluscos, e também na parede celular de algumas plantas, como algas marinhas e fungos (KMIEC et al., 2017). Seu uso apresenta importância não só econômica, mas também ambiental. Isso se dá, pois a pesca de crustáceos gera um elevado acúmulo de carapaças, consideradas como resíduos poluentes e não utilizadas pela indústria pesqueira. Assim, sua reutilização para outros fins diminui o impacto ambiental causado pela pesca extrativa (AZEVEDO et al., 2007). O quadro 1 evidencia as principais aplicações da quitosana.

Quadro 1: Principais áreas e aplicações da quitosana.

Áreas de utilização	Aplicação da Quitosana
Agricultura	Defensivos agrícolas e adubação
Tratamento de água	Clarificação, remoção de poluentes e redução de odores
Indústria alimentícia	Produção de alimentos funcionais, conservante, bactericida e fungicida, recobrimento de frutas
Indústria Cosmética	Esfoliante, hidratante capilar, creme dental, tratamento de acne
Biofarmacêutica	Imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante
Biomédica	Suturas, implantes dentários, reconstituição óssea, lente de contato, liberação controlada de drogas, encapsulamento de materiais

Fonte: Adaptado de Azevedo et al. (2007).

O processamento da quitosana utilizando metodologias nanotecnológicas permite otimizar sua ação terapêutica, resultando em nanoestruturas capazes de liberar moléculas-ativas de modo prolongado, muito útil para fins biofarmacêuticos e biomédicos. Outra vantagem do preparo das nanopartículas biopoliméricas em relação a outros sistemas sintéticos, é que não são utilizados solventes perigosos em seu preparo. Os biopolímeros são solubilizados em soluções levemente ácidas e as nanopartículas são estabilizadas por reticulação iônica ou covalente.

Um dos métodos de obtenção de nanopartículas de quitosana é o método de gelificação iônica em temperatura ambiente, que ocasiona ligações químicas pelo gotejamento de uma

solução do poliânion tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$, TPP) em soluções ácidas de quitosana (AJUN et al., 2009). Essa técnica se mostra promissora por produzir nanopartículas biocompatíveis e pela facilidade na execução, sendo necessários somente a agitação constante e cuidado no gotejamento durante o preparo das nanopartículas (BUREY et al., 2008).

A reticulação iônica é dada pela dispersão de uma solução de TPP em uma solução de quitosana. Ela ocorre pela interação entre os ânions tripolifosfato e os grupamentos amino protonados da quitosana. Isso resulta em uma rede polimérica tridimensional rígida, catiônica e estável em que se pode ou não, acrescentar surfactantes como adjuvantes (SMRDEL et al., 2008). O perfil *in vitro* de liberação dos ativos encapsulados por esta matriz reticulada é compatível com a erosão e inchamento das paredes biopoliméricas das nanopartículas, o que permite a difusão do ativo para o meio externo de maneira prolongada (AOUADA, 2009).

Após a obtenção das nanopartículas, alguns parâmetros estruturais são caracterizados para se monitorar a estabilidade físico-química dos sistemas. A técnica mais empregada para este fim é a de espalhamento dinâmico de luz (DLS), que fornece os parâmetros: tamanho (nm), índice de polidispersão (PDI), e potencial Zeta (mV) (LACERDA et al, 2016). O PDI indica a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas no sistema, sendo que valores próximos a 0, geralmente não superando 0,2, indicam que as nanopartículas estão distribuídas de forma homogênea, conforme o planejado (RIBEIRO et al, 2020). Outro parâmetro avaliado é o potencial Zeta (mV), que fornece informações sobre a carga elétrica superficial resultante entre as nanopartículas em suspensão, que é rotineiramente acompanhado nos estudos de estabilidade, onde é esperado que não sejam observadas alterações significativas de seus valores ao longo do tempo (RIBEIRO et al, 2017).

2.5.2 Carreadores lipídicos nanoestruturados com óleos essenciais

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) tratam-se de nanopartículas lipídicas compostas pela mistura de ao menos um lipídio no estado sólido e um no estado líquido, estabilizados por surfactantes. Com isso, o sistema deve apresentar temperatura de fusão superior à 40 °C, para garantir que as nanopartículas dispersas nas formulações se mantenham sólidas a temperatura ambiente e fisiológica, onde são comumente utilizadas (KRAMBECK et al., 2021).

Para a escolha dos componentes e síntese dos CLN é desejável o uso de lipídios sólidos e líquidos com dimensão e formato de cadeias preferencialmente heterogêneas. Tal escolha tem

o intuito de haver maior quantidade de defeitos e desorganização no material, a fim de fixar melhor o princípio ativo em sua estrutura (YANG et al., 2020; POOVI; DAMODHARAN, 2020).

Uma característica relevante do uso dos CLN é a capacidade de liberar gradativamente o princípio ativo fixado em sua estrutura. Esta característica já se mostrou relevante em pontos importantes como resistência a variações de temperatura, pH, trato digestivo e conservação de alimentos, havendo grande interesse industrial a respeito do uso deste material (BASHIRI et al., 2020).

Além disso, Ribeiro et al. (2021) investigaram as vantagens de uso do CLN como fixadores de agentes antibacterianos a sua estrutura, para liberação gradativa com o passar do tempo. Os autores constataram que houve eliminação de cepas de *Campylobacter jejuni*, e ainda, propuseram a possibilidade de diminuir a resistência aos antimicrobianos, resultados considerados promissores.

Nesta perspectiva, Ghodrati, Farahpour e Hamishehkar (2019) utilizaram os CLN para carrear óleo essencial (OE) de hortelã-pimenta com forte propriedades antibacteriana e antifúngica. O material sintetizado mostrou-se eficiente e com melhor desempenho que sanitizantes convencionais a base de cloro. Além disso, o uso de OE's, mostrou-se mais atrativo por se tratar de um material natural e mais viável ecologicamente, havendo menores danos ao meio ambiente (TAZEJANI; FARAHPOUR; HAMISHEHKAR, 2020).

Os OE's são líquidos comumente hidrofóbicos e concentrados, com característica volátil. Tratam-se de substâncias sintetizadas, armazenadas e liberadas pelas plantas, que possuem propriedades que favorecem estímulos, cicatrização, desinfecção e, ainda, podem atuar como inseticida, fungicida, bactericida ou agente de limpeza natural. Os OE's podem ser extraídos das folhas, raízes, sementes, frutos, flores e dos troncos de plantas (KHEZRI; FARAHPOUR; MOUNESI, 2020). Além disso, podem atuar com eficiência contra diversos patógenos de origem alimentar, bactérias, fungos e toxinas associadas, sem promover a aquisição de resistência. A maioria possui toxicidade, o que torna interessante os encapsular (KHEZRI; FARAHPOUR; MOUNESI, 2020; TAZEJANI, FARAHPOUR, HAMISHEHKAR, 2020).

O OE de orégano foi utilizado como o bioativo por Lovison et al. (2017) sendo encapsulado por nanoemulsões. As nanoemulsões exibiram excelente ação antibacteriana *in vitro* sendo capazes de inibir bactérias Gram positivas e Gram negativas, como *Staphylococcus aureus* e *E. coli*, respectivamente. Outro trabalho semelhante realizado por Khan et al. (2020)

verificou também que as nanodispersões tiveram um efeito antibacteriano contra *E. coli* e *S. aureus*, sendo mais eficiente na inibição de cepas de *E. coli*.

O óleo essencial de canela associado a um sanitizante contendo alginato foi testado por Frank et al. (2018) para sintetizar um biocompósito antibacteriano, sendo incorporado por nanoemulsões preparadas por ultrassonicação. Os bionanocompósitos contendo 20% de óleo essencial de canela mostraram fortes efeitos antibacterianos (MORTAZAVI e ALIAKBARLU, 2019).

Devido as propriedades físico-químicas dos óleos essenciais, muitos deles apresentam-se como agentes oxidantes. Dessa forma, os óleos podem reagir com ligações sulfidríla do enxofre em proteínas e enzimas, propiciando um estresse oxidativo na membrana das bactérias, ocasionando um efeito antibacteriano semelhante ou melhor do que sanitizantes convencionais, como ácido peracético e sais de amônio quaternário (BISWAL, 2014; LOVISON et al., 2017; CAMPO et al., 2020; KHAN et al., 2020).

CAPÍTULO 2

Biocontrole de *Salmonella* Heidelberg e *Escherichia coli* sob uma perspectiva nanotecnológica

Artigo a ser publicado no periódico

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

FI: 5,64 (JCR 2020)

Biocontrol of *Salmonella* Heidelberg and *Escherichia coli* from a nanotechnological perspective

Fernanda Aparecida Longato dos Santos^{1*}, Lígia Nunes de Moraes Ribeiro^{2,3}, Mohana Moreira Marquez¹, Micaela Guidotti Takeuchi¹, Régis Vinícius Alves de Abreu¹, Rosanne Aparecida Capanema Ribeiro¹, Luiz Ricardo Goulart², Eneida de Paula³, Daise Aparecida Rossi¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

²Laboratório de Biossensores e Nanomateriais, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

³Laboratório de Biomembranas, Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, Brasil

* Correspondence:

Fernanda Aparecida Longato dos Santos
fe.longato@hotmail.com

Keywords: saúde pública 1, quitosana 2, ácido peracético 3, carreadores lipídicos nanoestruturados 4, sanitização 5.

Resumo

O controle ineficaz de agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos leva a impactos na saúde pública e na economia. Buscando por alternativas, a nanotecnologia tem sido empregada por possibilitar o desenvolvimento de dispositivos promissores. Objetivou-se desenvolver nanopartículas de quitosana encapsulando ácido peracético 0,8% (Quit-APA) com e sem a adição de biossurfactante (Plantaren 1200®) e de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo óleos essenciais de canela (CLN/CAN) e orégano (CLN/OR) para inibir *Salmonella* Heidelberg e *Escherichia coli*. As formulações foram monitoradas quanto à estabilidade físico-química a 25°C e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para avaliar o efeito inibidor foram utilizados os testes de difusão em disco e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). As formulações de quitosana apresentaram tamanho de partícula entre 191-216 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,3 e potencial Zeta de 22 a 33 mV, estáveis por 365 dias. A formulação Quit-APA apresentou halos de inibição superiores (33,77±1,77 mm) ao grupo controle (24,11±2,32 mm) em *S. Heidelberg*. As nanopartículas poliméricas (Quit-APA e Quit-APA/PL1200) apresentaram CIM de 0,63 e 1,25 mg. mL⁻¹ para duas das três cepas de *S. Heidelberg* e 1,25 mg. mL⁻¹ para *E. coli*. As micrografias revelaram nanopartículas esféricas, uniformes, contornos delimitados e tamanhos compatíveis com a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Já os CLN apresentaram tamanho de partícula entre 196 a 244 nm, PDI de 0,1 e potencial Zeta de -43 a -28 mV, se mantendo estáveis por pelo menos 120 dias. O teste de difusão em ágar demonstrou maior poder inibitório do CLN/CAN (17,75±2,05 mm) e CLN/OR (9,08±0,97 mm) em comparação às respectivas emulsões em todas as cepas. Com relação a CIM, CLN/CAN exibiu valores de 0,78 a 1,30 mg.mL⁻¹ e CLN/OR valores de 0,78 mg. mL⁻¹ para *S. Heidelberg*; e para *E. coli*, 0,39 a 1,56 mg. mL⁻¹ e 0,52-0,78 mg. mL⁻¹, respectivamente. Os resultados demonstram vantagens no uso de nanocarreadores de diferentes composições para uso na higienização industrial, e consequentemente, redução da

contaminação por patógenos de importância em alimentos, principalmente no cenário atual de resistência a antimicrobianos convencionais.

Keywords: public health¹, chitosan², peracetic acid³, nanostructured lipid carriers⁴, sanitizations⁵.

Abstract

Ineffective control of etiological agents of foodborne diseases leads to impacts on public health and the economy. Looking for alternatives, nanotechnology has been used to enable the development of promising devices. The objective was to develop chitosan nanoparticles encapsulating 0.8 % peracetic acid (Quit-APA) with and without the addition of biosurfactant (Plantaren 1200[®]) and essential nanostructured cinnamon nanostructured lipid carriers (NLC/CAN) containing oregano (NLC/OR) to inhibit *Salmonella* Heidelberg and *Escherichia coli*. The formulations were monitored for physicochemical stability at 25 °C and characterized by transmission electron microscopy (TEM). To assess the inhibitory effect, disk diffusion tests and a determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) were used. Chitosan formulations of particle size between 191-216 nm, polydispersity index (PDI) of 0.3 and Zeta potential of 22 to 33 mV, stable for 365 days. The Quit-APA clears have superior inhibition zones (33.77 ± 1.77 mm) than the control group (24.11 ± 2.32 mm) in *S. Heidelberg*. At polymeric nanoparticles (Quit-APA and Quit-APA / PL1200) MIC dissipation of 0.63 and 1.25 mg.mL⁻¹ for two of the three strains of *S. Heidelberg* and 1.25 mg. mL⁻¹ for *E. coli*. Micrographs revealed spherical, uniform nanoparticles, delimited contours and sizes compatible with the dynamic light scattering (DLS) technique. On the other hand, NLC dissipation of particle size between 196 to 244 nm, PDI of 0.1 and Zeta potential of -43 to -28 mV, remaining stable for at least 120 days. The agar diffusion test regulates the greater inhibitory power of NLC/CAN (17.75 ± 2.05 mm) and NLC/OR (9.08 ± 0.97 mm) compared to the various emulsions in all strains. Regarding MIC, NLC/CAN exhibited values from 0.78 to 1.30 mg.mL⁻¹ and NLC/OR values from 0.78 mg. mL⁻¹ for *S. Heidelberg*; and for *E. coli*, 0.39 to 1.56 mg.mL⁻¹ and 0.52-0.78 mg.mL⁻¹, respectively. for NLC/CAN and NLC/OR. The results demonstrate advantages in the use of nanocarriers of different compositions for use in industrial sanitation, and consequently, reduction of contamination by important pathogens in foods, especially in the current scenario of resistance to conventional antimicrobials.

1 Introdução

Escherichia coli e *Salmonella* spp. estão entre os principais micro-organismos responsáveis por casos e surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (Prado et al., 2021), com maior prevalência e gravidade em extremos de idade. É preocupante observar que diferentes cepas e sorovares apresentam plasticidade quanto aos aspectos de virulência e resistência antimicrobiana, que levam a complicações clínicas e maior gravidade (CDC, 2018). Estima-se que 3,4% dos casos humanos de salmonelose nos Estados Unidos estão associados ao sorovar Heidelberg, devido às suas características intrínsecas de tolerância aos antimicrobianos e estresse ambiental, além da capacidade de formar biofilmes (NACMCF, 2019). Já *E. coli* patogênicas, além de ser a causa de infecções intestinais, pode também estar envolvida em eventos extra intestinais sistêmicos e hospitalizações (McKee et al., 2020).

Para a intervenção e controle eficiente destes patógenos é necessária vigilância constante aos protocolos de higienização na indústria de alimentos, e consequentemente, assegurar a inocuidade alimentar e atender aos padrões legais (Colla et al., 2014). No Brasil, os sanitizantes mais utilizados na higienização industrial são os quaternários de amônio, compostos à base de cloro e ácido peracético (APA), que diferem na forma de atuação, tempo de aplicação e ação em diferentes tipos de superfície (Srey et al., 2013).

O APA possui a vantagem de boa atividade em baixas concentrações (Cavallini et al., 2013), interfere de maneira eficiente na dinâmica de cepas patogênicas e não patogênicas (Kitis, 2004), além de agir em vasta amplitude de temperatura (30°C a 40°C) com resultados satisfatórios (Ziech, 2015). Entretanto, apesar da sua ação em diversos micro-organismos, relatos demonstram que há aumento da resistência microbiana com impacto na saúde pública e na economia, que resultam em grandes prejuízos com embargos sanitários na exportação de carnes, principalmente a carne de frango (Webber et al., 2019).

Enquanto as causas da resistência aos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções humanas são profundamente estudadas, àquelas de relevância à higienização ainda são pouco elucidadas. Estudos envolvendo subexposição a sanitizantes tradicionais demonstraram modificações na morfologia de *Salmonella* com consequente adaptação a concentrações mais elevadas de cloro, que resultaram na formação de células rugosas com capacidade de formar biofilmes de maneira eficiente (Obe et al., 2018).

Pesquisas realizadas com o APA na indústria de produtos cárneos têm demonstrado redução na eficácia para controle de patógenos (Machado et al., 2011), na efetiva sanitização na presença de matéria orgânica (Webber et al., 2019) e na instabilidade no armazenamento (Volschan et al., 2019). Considerando a crescente preocupação com o impacto da resistência antimicrobiana e o controle microbiológico na cadeia de produção de alimentos, alternativas altamente promissoras como a utilização e desenvolvimento de nanopartículas aliadas aos agentes antimicrobianos têm demonstrado especificidade no reconhecimento e ligação celular (Chandra et al., 2020), liberação sustentada de ativo, manutenção da estabilidade no armazenamento e menores riscos de toxicidade (Oliveira et al., 2018).

A utilização de compostos nanoestruturados à base de quitosana apresentam importância não somente econômica, mas também na sustentabilidade, pois promovem a reutilização de resíduos da indústria pesqueira que causam grande impacto ambiental (Azevedo et al., 2007). Além disso, o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) carreando óleos essenciais combina vantagens específicas de segurança, maior estabilidade (Bashiri et al., 2020) e capacidade de eliminar bactérias (Khezri, Farahpour & Mounesi Rad, 2020). Em conjunto, o desenvolvimento dos nanocompostos propostos neste estudo visam otimizar a ação de sanitizantes por meio da liberação de moléculas ativas de maneira prolongada, segurança na utilização e eficiência contra patógenos de origem alimentar.

Considerando a importância do desenvolvimento e avaliação de sistemas nanoparticulados, este estudo tem como objetivo desenvolver e avaliar a estabilidade físico-química e eficiência de nanopartículas de quitosana associadas ao ácido peracético (Quit/APA) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) carreando óleos essenciais de canela (CLN/CAN) e orégano (CLN/OR) na inibição de *S. Heidelberg* e *E. coli* patogênicas.

2 Materiais e Métodos

2.1 Cepas

Foram utilizadas três cepas de *S. Heidelberg* e três de *Escherichia coli*, sendo uma delas classificada como APEC – *Escherichia coli* patogênica aviária.

As cepas de *S. Heidelberg* foram isoladas de alimentos entre os anos de 2012 a 2017 e provenientes da Coleção de culturas de Enteropatógenos Bacterianos, Coleção Biológica de Bactérias de Interesse em Saúde do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ-RJ), e já previamente caracterizadas quanto à resistência aos antimicrobianos, potencial virulento e análise filogenética por Monteiro (2020).

As cepas de *E. coli* foram isoladas nos anos de 2019 e 2020 de galinha morta (APEC), pavão e galinha doente, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

2.2 Preparo das nanopartículas

Nanopartículas de quitosana/ácido peracético (0,8%)

As nanopartículas foram preparadas pela técnica de gelificação iônica, descrita pela primeira vez por Calvo et al. (1997) em duas formulações distintas, com e sem biossurfactante.

Resumidamente, 1 mL de uma solução de 0,1 %de quitosana em APA a 0,8% (Quit-APA) foi mantida sob agitação magnética durante 12 horas. Paralelamente, biossurfactante Plantaren 1200® (0,2%) foi adicionado a uma nova solução de Quit-APA preparada como descrita anteriormente (Quit-APA/PL1200). Após, 20mL de cada um dos preparados foram gotejados com solução aquosa de 0,1% de tripolifosfato (5 mL). As nanopartículas resultantes foram armazenadas em vidro âmbar a 25°C.

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

As formulações de CLN compostas por diferentes matrizes lipídicas foram preparadas pelo método de emulsificação-ultrassonicação (Ribeiro et al., 2016). De forma resumida, o lipídio sólido (manteiga de Karité) e líquidos (óleos essenciais-OE de canela e orégano a 5%) foram aquecidos em banho-maria (10°C acima do ponto de fusão do lipídio sólido). Simultaneamente, uma solução aquosa de Plantaren 1200® foi aquecida até a mesma temperatura da fase lipídica e adicionada à fase oleosa, sob agitação em alta velocidade (10.000 rpm), por 2 min em misturador Ultra-Turrax (IKA WerkeStaufen®, Alemanha). Em seguida, os sistemas foram ultrassonicados por 12 min em um sonicador de ponta Vibracell (Sonics & Mat. Inc®, Danbury, EUA) operado a 500 W e 20 kHz, em ciclos alternados de 30 s (liga / desliga). As formulações resultantes foram resfriadas à temperatura ambiente e armazenadas a 25°C.

2.3 Caracterização estrutural das nanopartículas

Tamanho, dispersão, potencial Zeta e estabilidade físico-química

O tamanho, dispersão e potencial Zeta das partículas foram realizadas após diluição das formulações (1:100 v/v) em água deionizada e realizadas em equipamento de espalhamento

dinâmico ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments®, Malvern, Worcester-shire, UK). As análises foram realizadas em intervalos de 30 dias e em triplicata. Estes parâmetros foram acompanhados por 120 dias (CLN/CAN e CLN/OR) e 365 dias (Quit-APA e Quit-APA/PL1200) durante armazenagem em temperatura ambiente (25 °C) (Ribeiro et al., 2017).

Caracterização morfológica das nanopartículas

A morfologia das nanopartículas em todas as formulações foi realizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) durante 120 dias para os CLN e 365 dias para as formulações com quitosana. As amostras foram adicionadas em grades de cobre e posteriormente secas com papel filtro. Para que houvesse o contraste necessário para a visualização, foi utilizado acetato de uranila 2%. Em seguida, foi adicionado água deionizada nas grades de cobre, e removido o seu excesso. Finalmente, as amostras foram visualizadas em microscópio Hitachi HT7700® (Hitachi Tech-Global®, Tóquio, JP) com lente objetiva de modo duplo, operando a 80 kV.

Inibição de células planctônicas de *S. Heidelberg* e *E. coli* em teste de difusão

O teste de difusão em ágar foi executado de acordo com as normas do Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI, 2020). Discos de papel de filtro estéreis com 5 mm de diâmetro foram preparados com 30 µL de APA comercial 0,8% (controle positivo) e formulações Quit-APA e Quit-APA/PL1200, sendo então armazenados em temperatura ambiente durante 30 minutos para secar. Os controles negativos foram impregnados em solução de cloreto de sódio (Dinâmica®) 0,9% estéril e secos da mesma forma.

Para os testes realizados com CLN, os discos foram preparados da mesma forma, mas com 30 µL de emulsões de canela e orégano e também as nanoformulações CLN/CAN e CLN/OR, sendo usado como controle negativo solução de cloreto de sódio (Dinâmica®) 0,9% estéril.

Para as análises, as estirpes de *S. Heidelberg* foram descongeladas em temperatura ambiente e reativadas em caldo infusão de cérebro e coração (Oxoid®) por 18 a 24 horas a 37°C e depois estriadas em ágar desoxicolato lisina xilose (Kasvi®) e incubadas na mesma temperatura por 24 horas. As cepas de *E. coli* foram preparadas de forma semelhante, mas após reativação em caldo infusão de cérebro e coração, o cultivo foi realizado em ágar Eosin Methylene Blue (Kasvi®). Uma colônia isolada de cada cepa de *S. Heidelberg* e *E. coli* foi estriada em ágar Triptone Soy Ágar (Oxoid®) e incubada por 24 horas a 37 °C, a fim de obter colônias para a preparação do inóculo dos testes subsequentes.

Os testes foram realizados com a distribuição do inóculo bacteriano com turvação 0,5 da escala de MacFarland, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), uniformemente sobre a superfície de ágar Mueller-Hinton (Oxoid®). Após a absorção do inóculo, os discos previamente impregnados com as formulações e controles positivo e negativo foram depositados na superfície, e após repouso por 5 minutos, as placas foram incubadas a 36 °C durante 20 horas. Ao final da incubação foram medidos em milímetros o halo de inibição do crescimento. As determinações foram realizadas em duplicata.

Concentração inibitória mínima (CIM) para inibição das bactérias na forma planctônica

Foi utilizado o método de microdiluição (Duarte et al., 2016), com modificação. Inicialmente, em placas de poliestireno de 96 poços, as diferentes formulações a serem testadas foram diluídas em caldo Mueller Hinton (Oxoid®), partindo da concentração inicial de 80 mg/mL para nanopartículas poliméricas e 50 mg/mL para as formulações de CLN. Em seguida foram adicionados 80 µL dos cultivos bacterianos de cada espécie bacteriana anteriormente preparados da mesma forma que feito para o teste de difusão. O controle negativo constou de caldo Mueller Hinton (Oxoid®) sem a adição dos cultivos bacterianos e formulações, e como

controle positivo, o caldo com inoculação bacteriana, sem adição das formulações, APA comercial ou emulsões. Após a incubação das placas 24 h a 36 °C, foi verificada a menor concentração capaz de inibir o crescimento da bactéria nos poços. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.4 Análise estatística dos resultados

Os resultados relativos à estabilidade físico-química das formulações foram tabulados e submetidos a estatística descritiva e teste estatístico ANOVA. Para determinar diferenças entre o poder inibitório das formulações poliméricas e APA0,8% pelo teste de difusão em ágar e CIM foram utilizados os testes estatísticos ANOVA e *post test* Tukey. Já para a avaliação do poder inibitório das formulações CLN/CAN e CLN/OR e suas respectivas emulsões foi aplicado o Teste T e *post test* Tukey.

A análise foi realizada com o auxílio do software R com 5% de significância.

3 Resultados

3.1 Análises das formulações

Estabilidade físico-química

Os resultados dos testes para determinar a estabilidade físico-química das nanopartículas poliméricas e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) estão nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

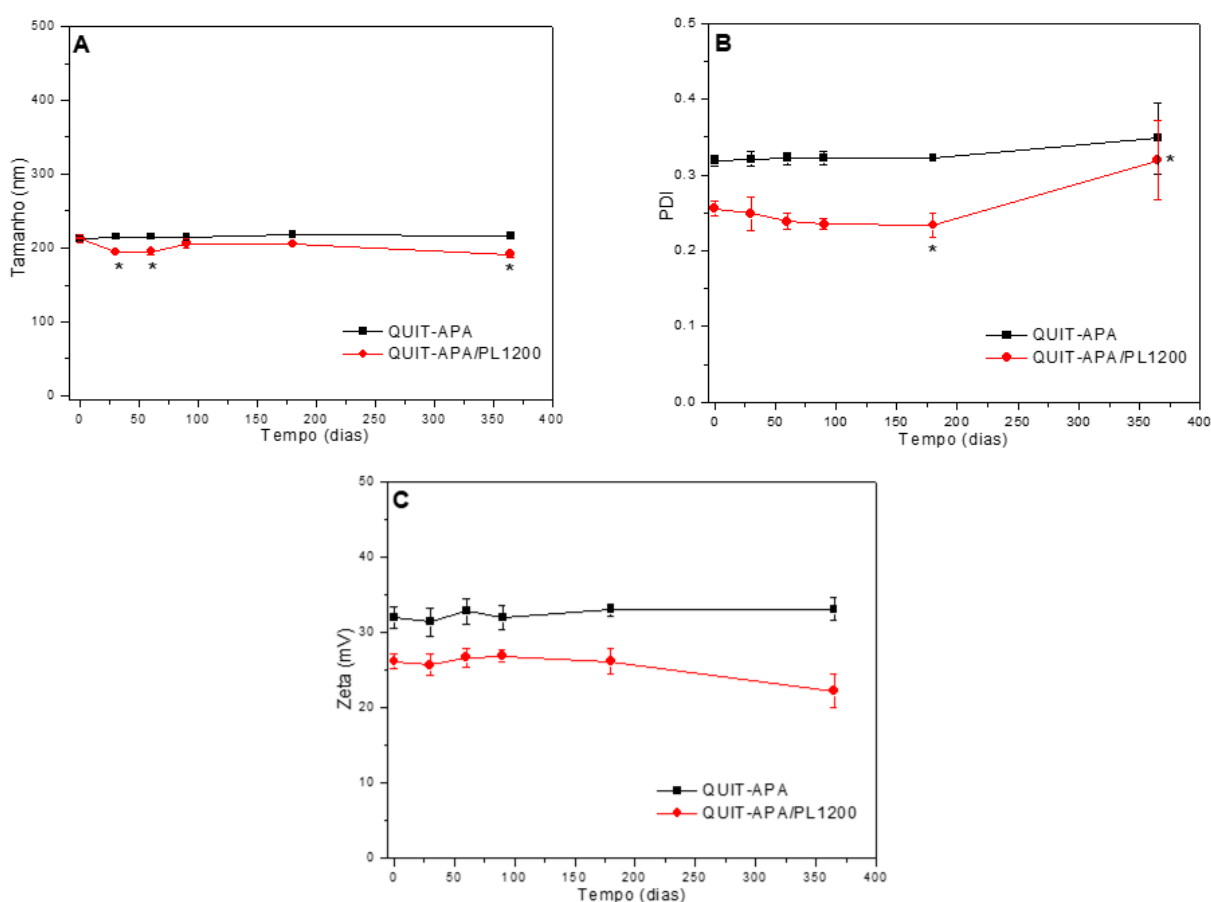


Figura 1: Estabilidade físico-química das nanopartículas poliméricas em relação ao tamanho de partícula (A), PDI (B) e potencial Zeta (C), monitorados por 365 dias à 25 °C. PDI=índice de polidispersão. QUIT-APA= Quitosana

encapsulando APA 0,8%; QUIT-APA/PL1200= Quitosana encapsulando APA 0,8% com adição do biossurfactante Plantaren 1200®. (* $p < 0,05$ - One-ANOVA e *post test* Tukey).

A formulação Quit-APA apresentou média de tamanho da partícula de $215,48 \pm 2,92$ nm, variando de 211 a 220 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,3 e potencial Zeta de 22 a 33 mV, sem diferenças significativas ($p > 0,05$ -ANOVA) em todos os índices ao longo dos 365 dias de avaliação. Já a formulação Quit-APA adicionada do biossurfactante (QUIT-APA/PL1200) apresentou índices médios de tamanho da partícula de $200,90 \pm 8,47$ nm, variando de 188 a 216 nm, PDI de 0,2-0,3 e potencial Zeta próximos a 22-24 mV ao final do experimento, com diferença significativa ($p < 0,05$ -ANOVA) em todos os parâmetros analisados. Apesar das diferenças observadas ao longo do armazenamento em Quit-APA/PL1200, esta formulação apresentou tamanhos menores de partícula e distribuição mais homogênea que o grupo Quit-APA.

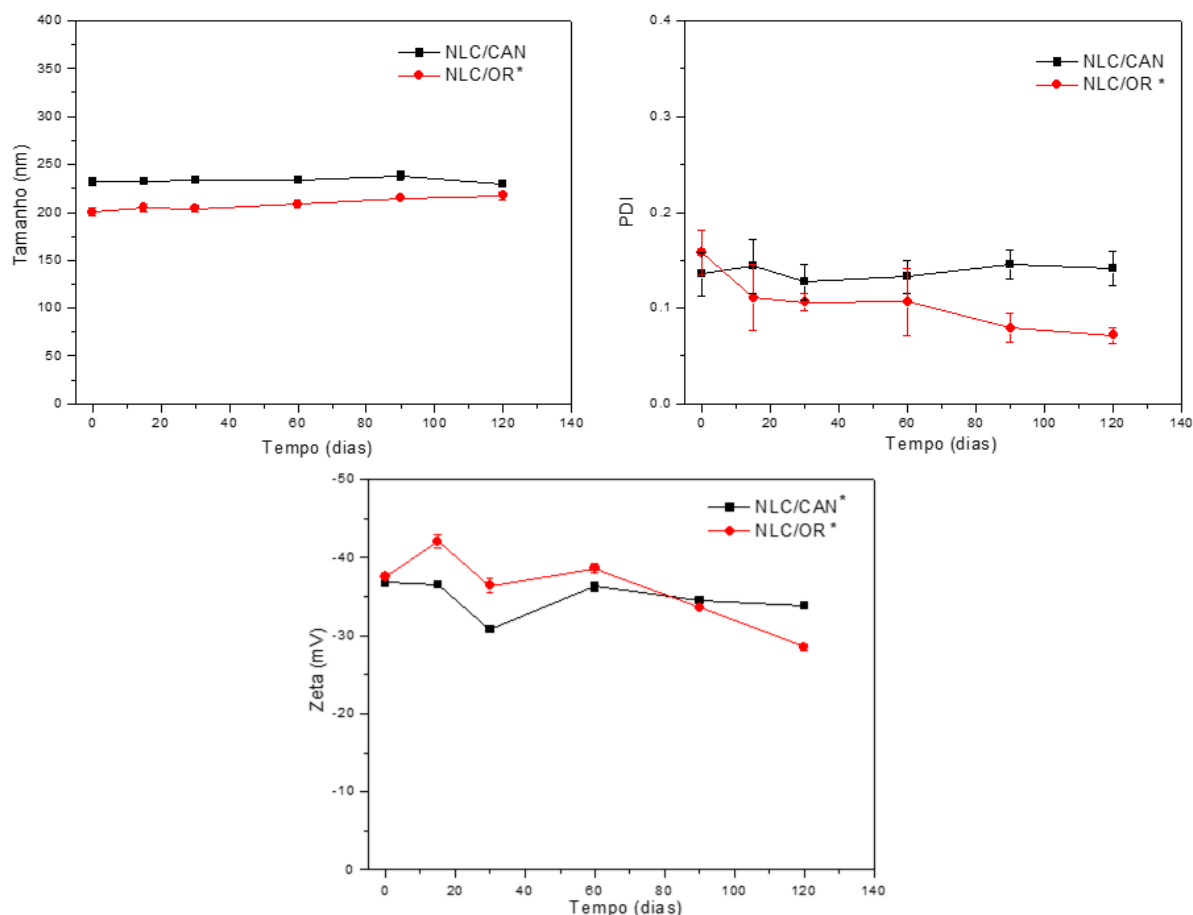


Figura 2: Estabilidade físico-química carreadores lipídicos nanoestruturados em relação ao tamanho de partícula (A), PDI (B) e potencial Zeta (C), monitorados por 120 dias à 25°C. PDI=índice de polidispersão. CLN/CAN= CLN + Canela 5%. CLN/OR= CLN + orégano 5% (* $p < 0,05$ - One-ANOVA e *post test* Tukey).

A formulação CLN/CAN apresentou tamanho da partícula médio de $233,27 \pm 3,89$ nm, variando entre 227 a 244 nm, PDI de 0,1 e potencial Zeta de -37 a -30 mV, apresentando diferença significativa apenas no potencial Zeta ($p < 0,05$ -ANOVA). O CLN/OR apresentou média de tamanho da partícula de $208,33 \pm 6,95$ nm, variando entre 196 e 220 nm, PDI de 0,1

variando entre 0,1-0,2 e potencial Zeta entre -43 e -28 mV, com diferenças significativas em todos os parâmetros analisados ($p < 0,05$ -ANOVA) ao longo dos 120 dias de análise.

Morfologia das nanopartículas

As Figuras 3 e 4 mostram as imagens das nanopartículas de Quit-APA e Quit-APA/PL1200 em MET. De forma geral as nanopartículas possuem morfologia esférica, com contornos bem delimitados e distribuição homogênea, e a adição do biossurfactante Plantaren® não afetou a morfologia. Foi constatado compatibilidade entre o ácido peracético (0,8%) e a matriz de quitosana, resultando em nanopartículas uniformes e estruturalmente estáveis. Os tamanhos de partícula de cada formulação foram estimados através do software ImageJ, e os valores de tamanho de partículas obtidos pelas micrografias estão de acordo com os dados de DLS, corroborando o sucesso do preparo das formulações.

Resultados semelhantes foram observados na CLN/CAN (Figura 5), revelando a presença de nanopartículas de morfologia, tamanhos e distribuição esperados para esse tipo de sistema. O tamanho estimado pelo ImageJ com base na micrografia foi de 142,2 nm. Menor que o obtido por DLS, conforme o esperado para este tipo de técnica, uma vez que para as microscopias o preparo da amostra é invasivo, requer evaporação do solvente e geralmente pode causar encolhimento e deformação das nanopartículas (Ribeiro et al., 2018).

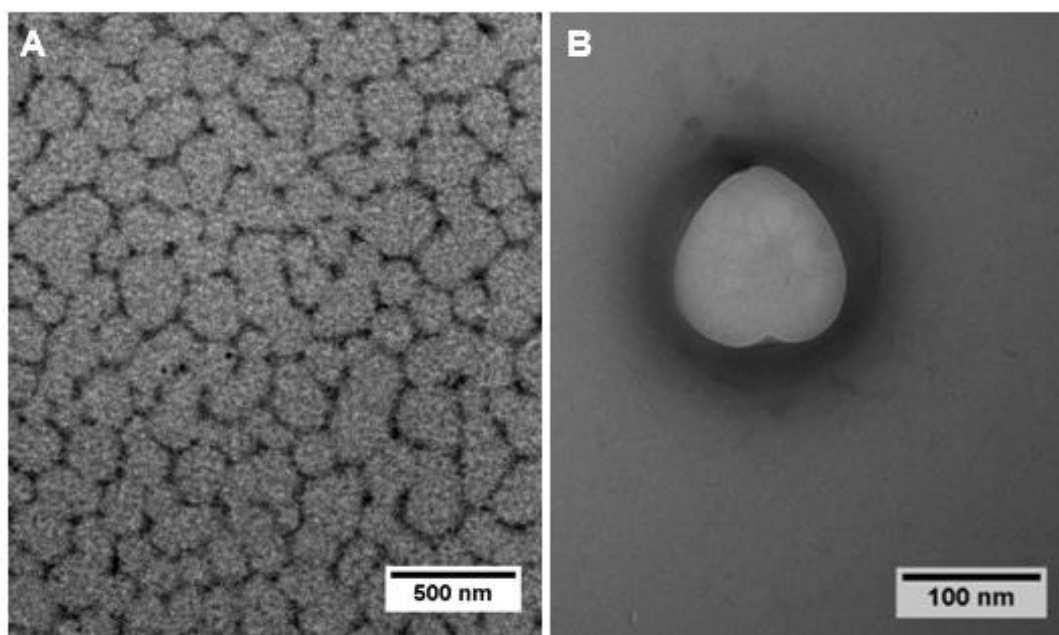


Figura 3: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da formulação Quit-APA (A e B). As imagens foram obtidas por diferentes magnificações: A= 10.000x; B= 100.000x. Quit-APA= $215,48 \pm 2,92$ nm

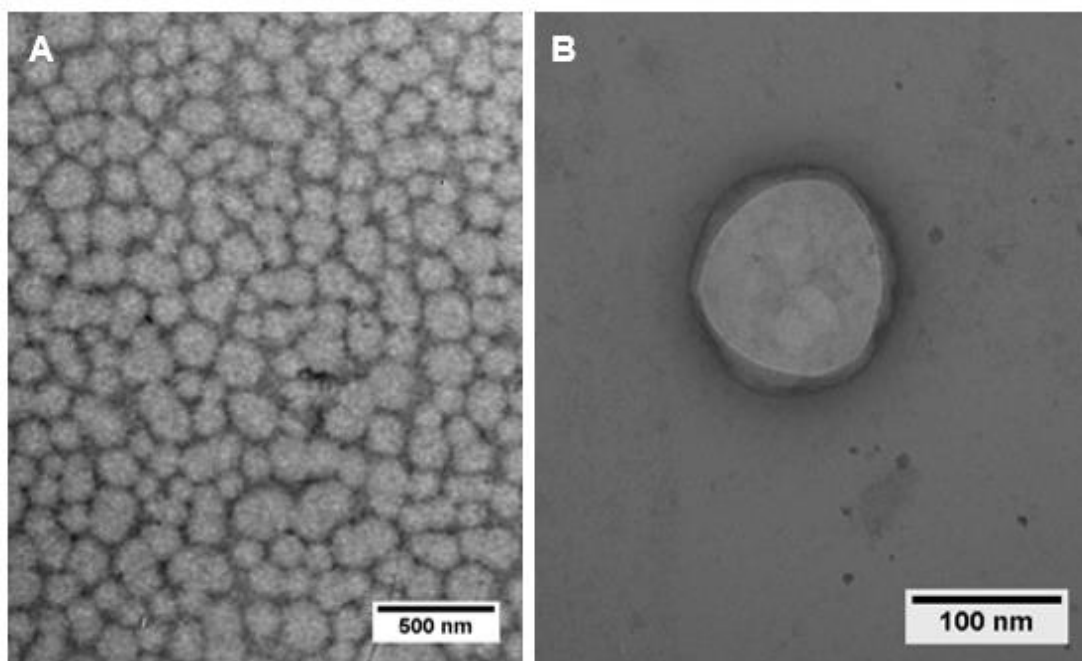


Figura 4: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da formulação QUIT-APA/PL1200 (A e B). As imagens foram obtidas por diferentes magnificações: A= 10.000x; B= 100.000x. Quit-APA/PL1200= $200,90 \pm 8,47$ nm

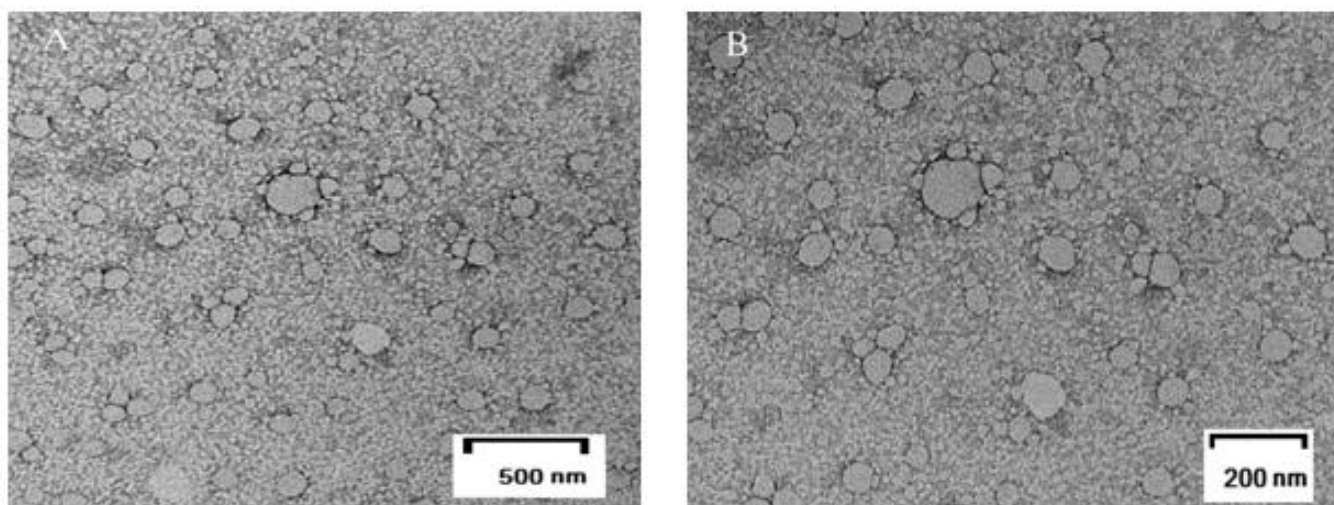


Figura 5: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da formulação CLN/CAN (A e B). As imagens foram obtidas por diferentes magnificações: A= 12.000x; B= 25.000x. CLN/CAN= $233,27 \pm 3,89$ nm.

3.2 Inibição de *S. Heidelberg* e *E. coli* planctônicas

Teste de difusão em discos

A Tabela 1 apresenta os resultados do teste de difusão em disco comparando os tratamentos Quit-APA e Quit-APA/PL1200 com o APA 0,8% (controle).

A formulação Quit-APA apresentou diâmetros das zonas de inibição de crescimento maiores ($p < 0,05$ -*post test* Tukey) que os valores do controle com o APA 0,8 % para todas as cepas de *S. Heidelberg*. Os diâmetros médios dos halos de inibição foram de $33,77 \pm 1,77$ mm e $24,11 \pm 2,32$ mm para as formulações Quit-APA e APA 0,8%, respectivamente. Não houve

diferença ($p > 0,05$ -*post test* Tukey) entre os diâmetros dos halos de inibição de *E. coli* entre o Quit-APA em relação ao controle.

Já para a formulação Quit-APA/PL1200, o diâmetro do halo de inibição foi maior ($p < 0,05$ -*post test* Tukey) que o controle (APA 0,8%) apenas para uma cepa de *S. Heidelberg* (6H), com diâmetro médio de $27,33 \pm 1,20$ mm para Quit-APA/PL1200 e $22,89 \pm 1,17$ mm para APA 0,8%. Também na inibição de *E. coli*, em somente uma cepa (2EC) o halo médio de inibição ($16 \pm 1,41$ mm) foi maior ($p < 0,05$ -*post test* Tukey) que o controle com APA 0,8% ($11 \pm 1,41$ mm).

Já os resultados comparativos entre as formulações com carreadores lipídicos nanoestruturados e suas respectivas emulsões, considerando os tamanhos dos halos de inibição obtidos no teste de difusão em ágar estão na Tabela 2.

Todas as formulações (CLN/CAN e CLN/OR) demonstraram inibir o crescimento de *S. Heidelberg* e *E. coli*, e apresentaram diâmetros de halos de inibição maiores ($p < 0,05$ -Teste T) que as emulsões contendo somente o óleo essencial. Para a formulação CLN/CAN, os diâmetros dos halos variaram entre 17,0 e 21,5 mm, com média de $17,75 \pm 2,05$ mm; enquanto na emulsão correspondente, empregada como controle, o diâmetro dos halos apresentou valores entre 6,0 e 7,5 mm e média de $6,6 \pm 0,75$ mm. Já a formulação de orégano (CLN/OR) apresentou diâmetros de halos entre 8,0 e 10,5 mm, com média de $9,08 \pm 0,97$ mm e sua respectiva emulsão resultou em halos variando entre 6,0 e 9,5 mm, com média de $8,08 \pm 1,32$ mm.

Concentração inibitória mínima (MIC)

Nenhum dos tratamentos envolvendo as formulações de nanopartículas biopoliméricas em quitosana (Tabela 3) apresentou valores de CIM inferiores aos obtidos com APA 0,8% ($p > 0,05$ -ANOVA). Entretanto, uma cepa de *S. Heidelberg* (6H) e as três cepas de *E. coli* foram inibidas com a mesma concentração ($1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$) que o controle APA 0,8%.

A CIM dos carreadores lipídicos nanoestruturados com óleo essencial de canela e orégano indicam que houve capacidade de inibir o crescimento de *S. Heidelberg* e *E. coli*, sendo necessário baixas concentrações das formulações. A concentração média da nanoformulação CLN/CAN foi de $0,95 \pm 0,30 \text{ mg.mL}^{-1}$ para *S. Heidelberg* e $0,78 \pm 0,68 \text{ mg.mL}^{-1}$ para *E. coli*, já a CIM média de CLN/OR foi de $0,65 \pm 0,23 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,69 \pm 0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ para *S. Heidelberg* e *E. coli*, respectivamente (Tabela 4).

4. DISCUSSÃO

A avaliação da estabilidade físico-química de nanoformulações é essencial para confirmar se as propriedades estruturais foram preservadas ao longo do tempo, uma vez que o rompimento, aglutinação ou degradação das nanopartículas dispersas em sistemas coloidais afetam diretamente seu potencial biológico (Ribeiro et al., 2018). Geralmente, nanossistemas estáveis são aqueles que não apresentam diferenças estatisticamente significantes ao longo do tempo de análise, ainda que haja exceções. Considerando-se a complexidade de sistemas coloidais como estes, extremamente dinâmicos e governados por intensa energia cinética, mais importante que a significância estatística em si, está na criteriosa avaliação de formação de tendências de aglomerados ou não ao longo do tempo, que refletirá diretamente no tempo de prateleira do produto.

Os testes de estabilidade físico-química das formulações considerando o tamanho de partícula (Figura 1A), PDI (Figura 1B) e potencial Zeta (Figura 1C), mostram que a formulação QUIT-APA não apresentou variações significativas ($p > 0,05$ -ANOVA) em todo o período. Vale destacar que o acompanhamento dos índices foi realizado por 365 dias a 25°C , temperatura que permite economia na armazenagem, transporte e distribuição, uma vez em que não é necessário refrigeração em seu transporte.

A adição do biossurfactante Plantaren 1200 às formulações objetivou avaliar se haveria contribuição adicional às propriedades do sistema, já que este produto poderia teoricamente atuar como um adjuvante antibacteriano no sistema, e não como estabilizante, já que as nanopartículas de quitosana são estabilizadas por reticulação iônica à base de tripolifosfato de sódio (Unsoy et al., 2014). De fato, em relação ao tamanho das partículas e valores de PDI, a formulação Quit-APA/PL1200 apresentou tamanhos menores e distribuição mais homogênea que o grupo Quit-APA. Porém, de outro lado, com adição deste adjuvante houve variações ($p < 0,05$ -ANOVA) em todos os parâmetros analisados. Apesar das alterações estruturais das nanopartículas Quit-APA/PL1200, ambos os sistemas mantiveram tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta no final do experimento compatíveis com formulações estáveis de composição similar, utilizadas para diferentes aplicações (Grillo et al., 2015; Mortazavian et al., 2014).

A estabilidade das CLN foi avaliada de forma semelhante, acompanhada por 120 dias a 25°C. A formulação CLN/CAN apresentou diferenças ($p < 0,05$ -ANOVA) apenas nos valores de potencial Zeta, já na formulação CLN/OR foi observada diferenças ($p < 0,05$ -ANOVA) em todos os parâmetros analisados. Cabe ressaltar, que o Plantaren empregado na estabilização das formulações de CLN é um biossurfactante não-iônico. Nesse caso, a estabilização dos sistemas se dá por impedimento estérico e não eletrostático. Nesse caso, os valores de potencial Zeta não são preditivos de estabilidade físico-química *per se*. Portanto, tais variações significativas ao longo do tempo são inerentes à complexidade dos sistemas coloidais. As melhores propriedades estruturais da canela tornaram o sistema mais estável e mais efetivo, resultando em melhor atividade nos testes *in vitro*. O OE de canela é basicamente composto de metabólitos secundários, tais como terpenos, que exibem considerável atividade antimicrobiana e antioxidante, algo desejável na busca por compostos com atividade frente a patógenos de origem alimentar com importância na saúde pública (Prakash et al., 2013).

Geralmente um sistema estável não deve apresentar variações ao longo do tempo, porém há exceções. Apesar da formulação CLN/OR ter apresentado diferenças ($p < 0,05$ -ANOVA) ao longo do tempo em todos os parâmetros analisados, é possível observar na Figura 2 que não há uma tendência de aumento do tamanho da partícula com o passar do tempo, mas sim, que houveram flutuações dos valores ao longo do tempo da análise, que são inerentes a complexidade da organização estrutural de um colóide. Imediatamente após a formulação (tempo 0), o tamanho médio das partículas foi $231,73 \pm 3,39$ nm e após 120 dias $229,13 \pm 2,19$ nm, confirmando que as flutuações não causaram alterações estruturais relevantes no sistema ao longo do tempo de monitoramento.

Bashiri et al. (2020) obteve tamanhos de partícula em torno de 110 ± 1 a 120 ± 10 nm ao avaliar a estabilidade de CLN carregadas com OE de canela incorporados com diferentes lipídeos líquidos (milho, sesamol, amêndoa doce e semente preta) utilizando manteiga de cacau como lipídeo sólido e adição de Tween 80 como surfactante. As formulações foram avaliadas durante 40 dias e o aumento no tamanho de partícula foi justificado como consequência da cristalização de lipídeos, tornando maior a viscosidade e levando ao maior tamanho. Ali et al. (2015) desenvolveram nanopartículas de lipídeos sólidos de manteiga de karité encapsulando a curcumina e obteve tamanhos de partículas entre 50 e 230 nm, utilizando diferentes quantidades de manteiga de karité (de 5 a 40 %), água (de 48 a 92 %) e surfactante (1,5 a 19 %). A escolha da manteiga de karité para o desenvolvimento de CLN justifica-se pela sua composição ácidos graxos simples e ponto de fusão entre 30 e 45 °C, além de ser um material natural, de baixo custo e com propriedades antioxidantes devido a presença de componentes fenólicos (Honfo et al., 2014).

Com relação aos valores de PDI, observa-se que a formulação CLN/OR foi se tornando mais dispersa ao longo do tempo, o que é desejável. As formulações são consideradas monodispersas quando os valores de PDI são inferiores a 0,2, refletindo positivamente na estabilidade físico-química (Ali et al., 2015). Com base nos valores de potencial Zeta da

formulação CLN/OR foi observada uma queda significativa ao longo do tempo, que poderia ser uma indicação de instabilidade do sistema, no entanto, os outros parâmetros não corroboram com a instabilidade, e ao final da avaliação geral, a formulação apresenta propriedades estruturais desejáveis.

A morfologia das diferentes formulações em MET (Figuras 3, 4 e 5) torna evidente que as nanopartículas apresentaram morfologia esférica, com os contornos delimitados e distribuição homogênea, conforme o esperado para este tipo de sistema (Tsai et al., 2019). A inclusão do biossurfactante Plantaren não influenciou nesta característica. Em geral, o preparo de amostras para microscopia consta de um processo invasivo, que resulta em diluição, contraste e evaporação do solvente, podendo ocasionar em um encolhimento ou deformação das partículas (Ribeiro et al., 2018). No entanto, os valores de tamanho de partículas obtidos nas micrografias estão de acordo com os dados de DLS, corroborando o sucesso do preparo das formulações.

As nanopartículas desenvolvidas apresentaram diferentes cargas elétricas superficiais, sendo as nanopartículas Quit-APA e Quit-APA/PL1200 carregadas positivamente, e as CLN/CAN e CLN/OR carregadas negativamente, de acordo com dados obtidos na análise do potencial Zeta. Todas as formulações tiveram como alvo espécies bacterianas Gram-negativas, que possuem cargas negativas na membrana celular. As nanopartículas catiônicas liberam íons que são atraídos e se acumulam na parede celular microbiana, permitindo além da reação enzimática que ocasiona ruptura da superfície da célula, a liberação do ativo encapsulado no local de interesse (Prado et al., 2020).

O mecanismo de ação de nanopartículas lipídicas carregadas negativamente frente a bactérias Gram-negativas envolve a competição por ligações de hidrogênio que ocorrem na superfície, com os lipopolissacarídeos e peptidoglicanos, como elucidado por Siek et al. (2020) ao estudar o efeito de nanopartículas de cargas mistas e a interação em componentes das células de bactérias Gram negativas e Gram positivas. Verma et al. (2008) observaram que nanobjetos catiônicos promovem efeito bactericida ou bacteriostático devido a geração de “orifícios transitórios” que geram toxicidade para a membrana, comportamento diferente do observado na ação de nanopartículas aniônicas.

O teste de difusão em disco demonstrou que comparativamente, a formulação de quitosana encapsulando APA foi mais eficiente ($p < 0,05$ -post test Tukey) na inibição das cepas de *S. Heidelberg* quando comparada a formulação comercial. Porém, a mesma formulação encapsulada quando adicionada do biossurfactante teve sua eficiência reduzida, pois mesmo apresentando diâmetros de halos maiores, para somente uma das cepas a inibição foi significativamente superior. O biossurfactante utilizado (Plantarem 1200®) é composto por lauril glucosídeo, um alquil do grupo glucosídeo, um surfactante biodegradável não iônico (Martínez-González et al., 2017). A resposta inibitória do surfactante lauril glucosídeo parece ser espécie dependente, por exemplo, entre as bactérias Gram negativas, *Moraxella fenilpyruvica*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Weltevreden* e *Vibrio parahaemolyticus* parecem ser mais resistentes ao biossurfactante que *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, bactérias Gram negativas são mais resistentes que Gram positivas devido diferenças na estrutura da parede celular (Loyawattananan, 2020).

O aumento no poder inibitório da forma encapsulada em quitosana Quit-APA é devido ao caráter catiônico da quitosana, onde seus agrupamentos NH_3 disponíveis interagem eletrostaticamente com a parede celular das bactérias (Thakur; Voicu, 2016). Uma vez que a interação ocorre, o APA é liberado, e por ser um agente oxidante, causa estresse oxidativo no interior da membrana celular com oxidação dos lipídios, o que ocasiona seu rompimento e a consequente eliminação da bactéria (Cremieux; Davin-Regli, 2000; Campo et al., 2020).

Singh, Hung & Qi (2018) avaliaram a eficácia de diferentes sanitizantes, incluindo o ácido peracético, na redução *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, e *S. Typhimurium*

DT104 em superfícies de produtos frescos. De modo geral, o ácido peracético a 100 mg/L alcançou a maior inativação microbiana para todas as bactérias testadas quando comparado aos outros agentes. Os autores destacaram que o APA é um oxidante muito forte, com potencial de oxidação maior do que de desinfetantes a base de cloro, que é capaz de inativar células microbianas ao interromper as ligações dissulfeto (S–S) e sulfidril (-SH) e oxidar proteínas de membrana. Adicionalmente, ao adentrar nas células microbianas, o APA pode oxidar enzimas e componentes intracelulares essenciais.

Um estudo conduzido por Ibañez-Peinado et al. (2020) avaliou a atividade de quitosana extraída de inseto e de crustáceo frente a diferentes patógenos de importância em segurança alimentar, como *S. Typhimurium* e *E. coli* O157:H7. Os autores constataram que a quitosana de ambas as fontes demonstrou atividade antimicrobiana, embora o efeito seja micro-organismo dependente. Os autores salientaram que a atividade antimicrobiana da quitosana é influenciada por condições extrínsecas e intrínsecas, como o tipo de quitosana, peso molecular, grau de desacetilação, solvente e concentração. Outros aspectos também podem interferir nessa atividade como o número de bactérias, a espécie do micro-organismo, seu estado fisiológico, pH, temperatura, íons metálicos, força iônica, presença de quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou matéria orgânica, entre outros.

Apesar da boa ação inibitória em *S. Heidelberg*, as formulações Quit-APA e Quit-APA/PL1200 foram menos efetivas na inibição de *E. coli* que APA 0,8% não encapsulado, já que em somente uma cepa (2EC), a ação inibitória da formulação Quit-APA/PL1200 foi mais eficiente. A menor eficiência das formulações encapsuladas em quitosana são compatíveis com a relação membrana celular e componentes catiônicos apontada por Ebbensgaard et al. (2018). Os autores destacam particularidades dos componentes na membrana celular externa de *E. coli* capazes de evitar a entrada de antibióticos e peptídeos antimicrobianos catiônicos, principalmente a capacidade da modificação da região interna do core-OS, responsável pela característica altamente aniônica da bactéria, sugerindo que estes componentes são capazes de promover uma menor suscetibilidade frente a tratamentos com cargas positivas.

A CIM determinada para as nanoformulações encapsuladas mostrou a mesma tendência que os resultados do teste de difusão em disco, não havendo de forma geral, diferença entre a CIM das formulações com nanopartículas poliméricas e APA 0,8% ($p > 0,05$ -post test Tukey), com exceção de uma cepa de *S. Heidelberg*, em que Quit-APA/PL1200 apresentou concentração inibitória inferior ao controle ($p < 0,05$ -post test Tukey). A CIM de APA para inibir *Salmonella* spp pode ser também cepa dependente, como observado no estudo de Bellé (2020) que determinou a concentração de $1,08 \text{ mg.mL}^{-1}$ de APA 0,02% para eliminar cepas de *S. Typhimurium*.

De forma geral, apesar de não haver diferença do uso dos nanocompostos em quitosana quanto ao poder de inibição em relação ao APA 0,8%, ainda há vantagens do uso das formas encapsuladas em relação a estabilidade, toxicidade e capacidade de corrosão em metais do ácido peracético não encapsulado (Silva & Rabelo, 2020), além de todas as vantagens inerentes à matriz de quitosana supramencionadas.

A busca de novos antimicrobianos, melhoria da eficiência dos existentes e formas de uso mais racional quanto a prevenção da resistência e sustentabilidade ambiental é extremamente necessária. Nesse sentido, a abordagem do uso de óleos essenciais (OEs) como antimicrobianos tem sido profundamente investigada, com diversos estudos comprovando a sua efetividade (Bashiri et al., 2020). No entanto, os óleos essenciais puros tem características indesejáveis, como alta volatilidade, podem ser tóxicos em altas concentrações, além do forte odor, que pode influenciar nas características organolépticas dos produtos envolvidos (Khezri; Farahpour; Mounesi Rad, 2020). Neste trabalho, visando contornar estas limitações, foram utilizados OEs de canela e orégano, ambos carregados em lipídeos nanoestruturados (CLN),

utilizando a manteiga de Karité como lipídio sólido e Plantaren 1200 como tensoativo, estabilizadas por tripolifosfato de sódio (TPP).

Nosso grande desafio no uso de CLN foi além de verificar o efeito inibidor das emulsões, mas constatar se a atividade antibacteriana dos compostos seriam mantidas após seu processamento, já que tantos os OE puros quanto as suas respectivas emulsões são instáveis, e assim, inviabilizam o seu emprego futuro como sanitizante (Prakash et al., 2018).

O poder inibitório da nanoformulação com óleo de canela (CLN/CAN) foi superior ao da sua emulsão correspondente em todas as cepas analisadas. O principal componente ativo do OE de canela proveniente do caule é o cinamaldeído, um álcool terpeno, metabólito secundário de origem vegetal que age inibindo a geração de energia para a bactéria a partir da inibição da captação de glicose ou até mesmo sua utilização (Ho et al., 2013). Ainda, sugere-se que esse composto desempenhe ação na permeabilidade iônica da membrana plasmática (Rangel, 2016). Em 2019 foi patenteada a primeira formulação CLN contendo apenas excipientes naturais, uma delas, carreando OE de canela, que teve sua eficácia comprovada pelo teste de difusão em discos para a inibição do crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* MRSA, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Ribeiro et al, 2019).

O CLN/OR também foi mais eficiente que a sua emulsão não encapsulada em 5/6 (83,33%) das cepas, com menor ação ($p < 0,05$ -post test Tukey) somente em uma cepa de *E. coli* (2EC), com halos de $8,50 \pm 0,71$ mm e $8,00 \pm 0,00$ mm, respectivamente. O princípio ativo do OE de orégano é o carvacrol, um monoterpreno com a presença de um grupo hidroxila livre e uma porção fenólica na estrutura da sua molécula, conferindo uma natureza hidrofóbica (Galvão, 2019). A presença deste monoterpreno é responsável por diversas propriedades terapêuticas, como, por exemplo, atividade antitumoral (Arunasree, 2010), anti-inflamatória (Guimarães et al., 2012), antiparasitária (Pastor et al., 2015), antioxidante (Beena & Rawat, 2015) e antimicrobiana, incluindo atividade frente às cepas de interesse em DTAs, como *E. coli*, *Salmonella* e *B. cereus* (Sharifi-Rad et al., 2018).

As bactérias Gram negativas possuem membrana externa com lipopolissacarídeos, que conferem caráter hidrofílico e consequente proteção a permeabilidade de substâncias hidrofóbicas como os OE, por exemplo. Porém, com o acúmulo nas membranas microbianas, a permeabilidade é ionicamente alterada por íons de hidrogênio e potássio, ocorrendo ação na parede celular das bactérias, impedindo o transporte de elétrons, proteínas, fosforilação, incapacitando reações enzimáticas, gerando por fim, desequilíbrio osmótico com consequente morte da bactéria (Dorman & Deans; 2000; Bona et al., 2012). Os CLNs encapsulam moléculas hidrofóbicas com sucesso no interior da partícula, possibilitando o transporte do ativo pela membrana, permitindo sua ação (Rodrigues da Silva et al., 2020).

Os valores de CIM indicam que baixas concentrações de CLN/CAN e CLN/OR são suficientes para a inibição das cepas de *E. coli*. Foram necessárias concentrações de 0,39 a $1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,52 \pm 0,23$ a $0,78 \text{ mg.mL}^{-1}$ de CLN /CAN e CLN /OR para inibir *E. coli*, respectivamente. Esses resultados são compatíveis com Machado et al. (2011), que obteve valores de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de CIM ao testar OE de canela frente a cepas de *E. coli* e Santúrio et al. (2011), que também observaram atividade antimicrobiana do OE de orégano frente cepas de *E. coli* de diversas origens como aves e bovinos, com CIM de $0,83 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Esses resultados são bastante relevantes, uma vez que as formulações nanoparticuladas são um campo emergente, oferecendo uma vasta gama de opções para a criação de agentes antimicrobianos seguros, sustentáveis, reprodutíveis em larga escala, e, ainda, podem ajudar a diminuir a resistência aos antimicrobianos, além de serem candidatos promissores como futuros sanitizantes (Prakash et al., 2018; Khezri; Farahpour, Mounesi Rad, 2020).

Finalmente, tais resultados apontam que as formulações catiônicas à base de quitosana e APA, assim como as formulações aniônicas de CLN com OE de canela e orégano apresentaram excelentes propriedades físico-químicas, vida de prateleira e resultados

promissores na inibição do crescimento de *E. coli* e *S. Heidelberg*. Cabe ressaltar, que os resultados obtidos quanto à atividade antimicrobiana *in vitro* deverão ser futuramente corroborados em ensaios *in vivo* de eficácia e toxicidade, uma vez que existem muitas outras variáveis que não são capazes de serem simuladas em testes *in vitro*.

4 CONCLUSÃO

O emprego da nanotecnologia nas técnicas de sanitização industrial parece ser uma alternativa promissora para a higienização industrial e produção de alimentos inócuos e seguros para o consumidor, em um mundo de crescente resistência aos antimicrobianos. Neste contexto, o presente trabalho desenvolveu diferentes formulações de nanopartículas biopoliméricas e carreadores lipídicos nanoestruturados com ótima estabilidade físico química em armazenamento a 25 °C, além de nanopartículas em tamanho e formato adequados para o sistema desenvolvido, comprovado por imagens obtidas na MET. As nanoformulações demonstraram potencial de inibir o crescimento de *S. Heidelberg* e *E. coli*, com destaque para a formulação Quit-APA para inibir *S. Heidelberg* e a efetividade da formulação CLN/CAN para inibir cepas de *E. coli*.

5 Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradecemos também ao CNPq e a FAPEMIG pelo apoio financeiro para a execução deste estudo.

6 Referências

Araujo, R.S., and Goes, R.R. Organizadores Cartilha De Biossegurança Em Tempos De Covid-19 Desinfetantes E Degermantes Utilizados Na Odontologia Organizadores. [S.D.]. [Http://M.Facebook.Com/Crobahia](http://M.Facebook.Com/Crobahia). [Accessed: Nov 17, 2021].

Azevedo, V.V.C., Chaves, S.A., Bezerra, D.C., Fook, M.V.L., and Costa, A.C.F.M. (2007) Quitina E Quitosana: Aplicações Como Biomateriais. REMAP, Campina Grande, 2(33) 27-34.

Ajj Ali, H., Michaux, F., Bouelet Ntsama, I., Durand, P., Jasniewski, J., Linder, M. (2016). Shea Butter Solid Nanoparticles For Curcumin Encapsulation: Influence Of Nanoparticles Size On Drug Loading. Eur J Lipid Sci Technol, [S. L.], 118(8), 1168–1178. Doi: 10.1002/Ejlt.201500348.

Arunasree, K.M. (2010). Anti-Proliferative Effects Of Carvacrol On A Human Metastatic Breast Cancer Cell Line, Mda-Mb 231. Phytomedicine, 17(8–9): 581–588. Doi: 10.1016/J.Phymed.2009.12.008.

Bashiri, S., Ghanbarzadeh, B., Ayaseh, A., Dehghannya, J., Ehsani, A., Ozyurt, H. (2020). Essential Oil-Loaded Nanostructured Lipid Carriers: The Effects Of Liquid Lipid Type On The Physicochemical Properties In Beverage Models. **Food Bioscience**, 35, 100526.

Beena, K., Deepak, R., Diwan S. (2013) Synthesis And Antioxidant Activity Of Thymol And Carvacrol Based Schiff Bases. **Bioorganic Med. Chem. Lett.**, 23(3) 641–645.

Belda-Galbis, C.M., Leufvén, A., Martínez, A., Rodrigo, D. (2014). Predictive Microbiology Quantification Of The Antimicrobial Effect Of Carvacrol. **J Food Eng**, 141, 37–43.

Bona, T.D.M.M., Pickler, L., Miglino, L.B., Kuritza, L.N., Vasconcelos, S.P., Santin, E. (2012). Óleo Essencial De Orégano, Alecrim, Canela E Extrato De Pimenta No Controle De Salmonella, Eimeria E Clostridium Em Frangos De Corte. **Pesq. Vet. Bras.**, 32(5) 411–418.

Campo, N. (2020). Inactivation Kinetics Of Antibiotic Resistant Escherichia Coli In Secondary Wastewater Effluents By Peracetic And Performic Acids. **Water Res**, 169, 115227.

Cavallini, G., Campos, S.X., Souza, J.B., Vidal, C.M.S. (2013). Evaluation Of The Physical–Chemical Characteristics Of Wastewater After Disinfection With Peracetic Acid. **Water Air Soil Pollut**, Dordrecht, 224(1752) 1-11.

Centers For Disease Control and Prevention. (2018). Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked To Contact With Dairy Calves (Final Update). <https://www.Cdc.Gov/Salmonella/Heidelberg-11-16/>. [Accessed: Jan 24, 2021].

Chandra, H., Kumari, P., Bontempi, E., and Yadav, S. (2020). Medicinal Plants: Treasure Trove For Green Synthesis Of Metallic Nanoparticles And Their Biomedical Applications. *Biocatal*, Peoria, 24, 1-11.

Colla, G., Rouphael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in Plant Science*, [S. l.], 5, n. SEP.doi: 10.3389/FPLS.2014.00448.

Conceição, A.A., Salata, G.C., Bianco, A.F.R., Fukumori, C., Lopes, L.B.(2020). Abrindo A Caixa De Pandora Dos Nanomedicamentos: Há Realmente Muito Mais “Espaço Lá Embaixo”. **Quim. Nova**, 00, 1–14. Doi: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170481>

Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000). Antimicrobial Agents From Plants: Antibacterial Activity Of Plant Volatile Oils. **J. Appl. Microbiol**, 88(2) 308–316.

Duarte, A., Luís, Â., Oleastro, M., Domingues, F.C. (2016). Antioxidant Properties Of Coriander Essential Oil And Linalool And Their Potential To Control *Campylobacter* Spp. **Food Control**, 61, 115–122. Doi: 10.1016/J.Foodcont.2015.09.033.

Ebbensgaard, A., Mordhorst, H., Aarestrup, F.M., Hansen, E.B. (2018) The Role Of Outer Membrane Proteins And Lipopolysaccharides For The Sensitivity Of *Escherichia Coli* To Antimicrobial Peptides. **Front. Microbiol**, 9(7) 2153. Doi: 10.3389/Fmicb.2018.02153/Bibtex.

Galvão, J.G. ANO Universidade Federal De Sergipe Pró-Reitoria De Pós-Graduação E Pesquisa Programa De Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas Desenvolvimento De Carreadores Lipídicos Nanoestruturados Para O Encapsulamento De Carvacrol: Uma Formulação Promissora Para O Tratamento De Leishmanioses.

Grillo, R. (2015). Chitosan Nanoparticles Loaded The Herbicide Paraquat: The Influence Of The Aquatic Humic Substances On The Colloidal Stability And Toxicity. **J. Hazard**, 286,

562–572.

Guimarães, A.G.. (2015). Encapsulation Of Carvacrol, A Monoterpene Present In The Essential Oil Of Oregano, With B-Cyclodextrin, Improves The Pharmacological Response On Cancer Pain Experimental Protocols. **Chem. Biol. Interact.** 227, 69–76.

Henrique, B. (2020). Ação Sanitizantes No Controle De Biofilmes Puros E Mistos De, Thiago De: **Universidade Federal Do Paraná**. [S. L.].

Ho, S.C., Chang, K.S., Chang, P.W. (2013). Inhibition Of Neuroinflammation By Cinnamon And Its Main Components. **Food Chemistry**, 138(4) 2275–2282.

Höferl, M. (2011). Correlation Of Antimicrobial Activities Of Various Essential Oils And Their Main Aromatic Volatile Constituents. **Journal Of Essential Oil Research**. 21(5) 459–463. Doi: <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700218>

Honfo, F.G., Akissoe, N., Linnemann, A.R., Soumanou, M., Van B., Martinus A. J. S. (2014). Nutritional Composition Of Shea Products And Chemical Properties Of Shea Butter: A Review. **Crit Rev Food Sci Nutr**, [S. L.], 54(5) 673–686. Doi: 10.1080/10408398.2011.604142.

Khezri, K., Farahpour, M.R., and Mounesi Rad, S. (2020). Efficacy Of Mentha Pulegium Essential Oil Encapsulated Into Nanostructured Lipid Carriers As An In Vitro Antibacterial And Infected Wound Healing Agent. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 589, 124414.

Kitis. M. (2004). Disinfection Of Wastewater With Peracetic Acid: A Review. **Environ. Int.** 30:47–55. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00147-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00147-8).

Kmiec, M., Pighinelli, L., Tedesco, M.F. Silva, M.M., Reis V. (2017). Chitosan-Properties And Applications In Dentistry. **Advances In Tissue Engineering & Regenerative Medicine: Open Access**, 2, 4.

Loyawattananan, S. (2020). Thesis Characterization And Application Of Alternative Antimicrobial Surfactants On Food Contact Surface. [S. L.], 2020.

Machado, B.M.T., Machado, B.F.M.T., Junior, A.F. (2011). Óleos Essenciais: Aspectos Gerais E Usos Em Terapias Naturais. **Cadernos Acadêmicos**, 3(2) 105–127. Disponível Em: http://www.portaldeperiodicos.unisul.br/index.php/cadernos_academicos/article/view/718. [Accessed: Nov 17, 2021].

Mckee, R., Schnadower, D., Tarr, P., Xie, J., Finkelstein, Y., Desai, N. Freedman, S. (2020). Predicting Hemolytic Uremic Syndrome And Renal Replacement Therapy In Shiga Toxin–Producing Escherichia Coli–Infected Children. **Clin**, 70(8), 1643–1651.

Moldes, A.B., Rodríguez-López, L., Rincón-Fontán, M., López-Prieto, A., Vecino, X., Cruz, J.M. (2021). Synthetic And Bio-Derived Surfactants Versus Microbial Biosurfactants In The Cosmetic Industry: An Overview. **Int. J. Mol. Sci**, 22(5) 1–23.

Mortazavian, E., Amini, M., Dorkoosh, F.A., Amini, H., Khoshayand, M.R., Amini, T., and Rafiee-Tehrani, M. (2014). Preparation, Design For Optimization And In Vitro Evaluation Of Insulin Nanoparticles Integrating Thiolated Chitosan Derivatives. **J Drug Deliv Sci Technol**,

24(1) 40–49.

Müller, R.H., Alexiev, U., Sinambela, P., Keck, C.M. (2016) Nanostructured Lipid Carriers (Nlc): The Second Generation Of Solid Lipid Nanoparticles. **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods In Penetration Enhancement: Nanocarriers**, 161–185.

National Advisory Committee On Microbiological Criteria For Foods. (2019). Response To Questions Posed By The Food Safety And Inspection Service Regarding Salmonella Control Strategies In Poultry. *Journal Of Food Protection*, 82(4), 645–668, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-500. [Accessed Jan 24, 2021].

Obe, T., Nannapanen, R., Shekhar Sh.C., Kiess, A. (2018). Rugose Morphotype Of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Atcc14028 Exhibits Chlorine Resistance And Strong Biofilm Forming Ability. **Int. J. Poult. Sci.** Mississippi, 17(6) 295–305.

Oliveira, J.F.A., Scheffer, F., Landis, R.F., Teixeira-Neto, E., Rotello, V.M., Cardoso, M.B. (2018) Dual Functionalization Of Nanoparticles For Generating Corona-Free And Non-Cytotoxic Silica Nanoparticles. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, Washington, 10(49) 41917–41923.

Prado, P.C., Matias, C.L., Goulart, J.Q., Pinto, A.T. (2021). Most Involved Microorganisms In Foodborne Diseases Outbreaks: A Systematic Review / A Maioria Envolveu Microrganismos Em Surto De Doenças De Origem Alimentar: Uma Revisão Sistemática. **Braz J Dev**, Porto Alegre, Rs 7(11) 106900–106916.

Prado, R.O.F., Tellez, I.G., García, M.L.J., Aldaco, L.L.E., García, C.A.C. (2020). Antibacterial Activity Of Chitosan Biofilm For The Conservation Of Fertile And Table Eggs. **Arq Bras Med Vet Zoot**, 72(1) 208–214.

Prakash, B., Singh, P., Yadav, S., Singh, S.C., Dubey, N.K. (2013). Safety profile assessment and efficacy of chemically characterized *Cinnamomum glaucescens* essential oil against storage fungi, insect, aflatoxin secretion and as antioxidant. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, [S. l.], 53, 160–167. DOI: 10.1016/J.FCT.2012.11.044.

Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P.P., Dubey, N.K. (2018) Nanoencapsulation: An Efficient Technology To Boost The Antimicrobial Potential Of Plant Essential Oils In Food System. **Food Control**, 89, 1–11.

Ribeiro, L.N.M. NOME DE TODOS OS AUTORES (2017). Natural Lipids-Based NLC Containing Lidocaine: From Pre-Formulation To In Vivo Studies. **Eur J Pharm Sci**, Amsterdam, 106, 102–120. DOI: 10.1016/J.Ejps.2017.05.060.

Ribeiro, L.N.M., Couto, V.M., Fraceto, L.F., De Paula, E. (2018). Use Of Nanoparticle Concentration As A Tool To Understand The Structural Properties Of Colloids. **Sci. Rep.** 8:1, 8(1) 1–8.

Rodrigues Da Silva, G.H. (2020). Injectable In Situ Forming Nanogel: A Hybrid Alginate-NLC Formulation Extends Bupivacaine Anesthetic Effect. **Mater. Sci. Eng. C**. 109, 110608. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.Msec.2019.110608>

Santurio, D.F. Et al. (2011). Atividade Antimicrobiana De Óleos Essenciais De Condimentos Frente A Amostras De Escherichia Coli Isoladas De Aves E Bovinos. *Cienc Rural*, 41(6) 1051–1056. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000067>

Schaffazick, S.R., Guterres, S.S.L.F.L., Pohlmann, A.R. (2003). Caracterização E Estabilidade Físico-Química De Sistemas Poliméricos Nanoparticulados Para Administração De Fármacos. **Quim Nova**, [S. L.], 26(5) 726–737. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>

Sharifi-Rad, M.. (2018). Carvacrol And Human Health: A Comprehensive Review. **Phytother Res .: PTR**, 32(9) 1675–1687. Doi: 10.1002/PTR.6103.

Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.D. (2013). Biofilm Formation In Food Industries: A Food Safety Concern. **Food Control**, Vurrey, 31(2) 572-585. Doi:10.1016/J.Foodcont.2012.12.001
Tazehjani, D., Farahpour, M., & Hamishehkar, H. Effectiveness Of Topical Caraway Essential Oil Loaded Into Nanostructured Lipid Carrier As A Promising Platform For The Treatment Of Infected Wounds. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.** 610. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.Colsurfa.2020.125748>

Thakur, V.K., Voicu, S.I. (2016). Recent Advances In Cellulose And Chitosan Based Membranes For Water Purification: A Concise Review. *Carbohydr* , 146, 148–165. Doi: 10.1016/J.CARBPOL.2016.03.030.

Tsai, L.C., Chen, C.H., Lin, C.W., Ho, Y.C., Mi, F.L. (2019). Development Of Multifunctional Nanoparticles Self-Assembled From Trimethyl Chitosan And Fucoidan For Enhanced Oral Delivery Of Insulin. *Int. J. Biol. Macromol*, 126, 141–150.

Rangel, M.L. (2016). Efeito In Vitro Do Óleo Essencial De Cinnamomum Zeylanicum Blume Sobre Candida spp. Envolvidas Com Infecções Orais. [dissertação de mestrado]. [Local]; Universidade Federal Da Paraíba, Centro De Ciências Da Saúde Programa De Pós-Graduação Em Odontologia.

Unsoy, G., Yalcin, S., Khodadust, R., Mutlu, P., Onguru, O., and Gunduz, U. (2014). Chitosan Magnetic Nanoparticles For Ph Responsive Bortezomib Release In Cancer Therapy. **Biomed**, 68(5) 641–648. doi: 10.1016/J.Biopha.2014.04.003

Verma, A., NOME DE TODOS OS AUTORES (2008). Surface-Structure-Regulated Cell-Membrane Penetration By Monolayer-Protected Nanoparticles. **Nat. Mater.** 7(7) 588–595. Doi: 10.1038/NMAT2202.

Volschan Jr., I., Santos, D.S., Teixeira, and L.A.C. (2019) IX-024 - Eficiência Do Ácido Peracético Na Desinfecção De Efluentes Pluviais Contaminados Por Esgoto Doméstico. In: 30º Congresso Brasileiro De Engenharia Sanitária E Ambiental, Natal. [**Anais Apresentados Em Congresso**] Natal, RN: 30º Congresso ABES, 2019. <http://Abes.Locaweb.Com.Br/XP/XP-Easyartigos/Site/Uploads/Evento45/Trabalhoscompletospdf/IX-024.Pdf>. [Accessed: Nov 18, 2021].

Webber, B. NOME DE TODOS OS AUTORES (2019). *Salmonella* Enteritidis Forms Biofilm Under Low Temperatures On Different Food Industry Surfaces. **Cienc Rural**, Santa Maria, 49(7) 1-9. Doi: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20181022>

Ziech, R.E. NOME DE TODOS OS AUTORES (2015). Biofilm-Producing Ability And Tolerance To Industrial Sanitizers In *Salmonella* Sp. Isolated From Brazilian Poultry Processing Plants. **Food Sci. Technol.** Campinas. 68, 85-90. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.Lwt.2015.12.021>

Tables

Tabela 1: Diâmetro Do Halo De Inibição No Teste De Difusão Em Disco Comparando As Formulações Com O Controle (APA 0,8%) frente as cepas de *S. Heidelberg* e *E. coli*. * P<0,05- One-Way ANOVA E *Post Test* Tukey. Quit-Apa= Ácido Peracético 0,8% Encapsulado Em Quitosana. Quit-Apa/PL1200= Ácido Peracético 0,8 % Encapsulado Em Quitosana + Plantarem 1200. APA= Ácido Peracético A 0,8%.

CEPAS	Halo De Difusão (mm)		
	Quit-Apa	Quit-Apa/PL1200	APA 0,8 %
5H	33,77±1,39*	27,77±1,17	26,11±2,51
6H	32,88±1,35*	27,33±1,20*	22,89±1,17
13H	32,33±2,67*	25,89±0,20	23,33±2,18
1EC	14,00±1,41	16,50±2,12	13,50±0,71
2EC	15,50±0,71	16,00±1,41*	11,00±1,41
3EC	16,00±1,41	14,50±0,71	12,50±0,71

Tabela 2: Diâmetro Do Halo De Inibição No Teste De Difusão Em Disco Comparando As Emulsões E Sua Respectiva Formulação Em Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN). * P<0,05- Teste T E *Post Test* Tukey. E1=Emulsão De canela 5%. CLN/CAN= CLN + Canela 5 %. E2= Emulsão De Orégano. CLN/OR= CLN + Orégano 5 %.

CEPAS	TRATAMENTOS					
	E1	CLN/CAN	p-Valor	E2	CLN/OR	p-Valor
5H	7,00±0,00	17,00±0,00	0,0253*	8,00±0,00	10,00±0,00	0,00060*
6H	7,50±0,71	21,50±0,71	0,0373*	9,50±0,71	10,50±0,71	0,00010*
13H	6,00±0,00	15,50±0,71	0,0297*	7,50±0,71	8,50±0,71	0,00030*
1EC	7,50±0,71	17,50±0,71	0,0230*	6,00±1,41	8,00±0,00	0,00220*
2EC	6,00±0,00	18,00±1,41	0,0412*	8,00±0,00	8,50±0,71	0,00010*
3EC	6,00±0,00	17,00±1,41	0,0370*	9,50±0,71	9,00±0,00	0,00004*

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima De Nanoformulações Comparado Ao Controle (APA 0,8%). * P<0,05 (One-Way ANOVA E *Post Test* Tukey). Quit-Apa= Ácido Peracético 0,8 % Encapsulado Em Quitosana. Quit-Apa/PL1200= Ácido Peracético 0,8 % Encapsulado Em Quitosana + Plantarem 1200. APA= Ácido Peracético A 0,8 %.

CEPAS	TRATAMENTOS		
	(mg.mL ⁻¹)		
	Quit-Apa	Quit-Apa/PL1200	APA 0,8%
5H	0,83±0,36	1,25±0,00*	0,63±0,00
6H	1,25±0,00	1,25±0,00	1,25±0,00
13H	0,63±0,00	0,63±0,00	0,52±0,18
1EC	1,25±0,00	1,25±0,00	1,25±0,00
2EC	1,25±0,00	1,25±0,00	1,25±0,00
3EC	1,25±0,00	1,25±0,00	1,25±0,00

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima Dos CLN Comparado A Suas Respectivas Emulsões. *P<0,05 (teste T e *Post Test* Tukey). E1= Emulsão De Canela 5 %. CLN=Carreador Lipídico Nanoestruturado. CLN/CAN= CLN+Canela 5 %. E2= Emulsão De Orégano 5 %. CLN/OR= CLN+Orégano 5 %.

CEPAS	Tratamentos (mg.mL ⁻¹)			
	E1	CLN/CAN	E2	CLN/OR
5H	0,78±0,00	0,78±0,00*	0,78±0,00	0,78±0,00
6H	0,39±0,00	0,78±0,00*	0,78±0,23	0,39±0,00*
13H	0,65±0,23	1,30±0,45	0,78±0,00	0,78±0,00
1EC	0,78±0,00	0,39±0,00	0,52±0,23	0,52±0,23
2EC	0,78±0,00	1,56±0,00*	1,56±0,00	0,78±0,00*
3EC	0,39±0,00	0,39±0,00	1,56±0,00	0,78±0,00*

REFERÊNCIAS

ABU DAHER, G.; AOUN, B.; JAAFAR, F. et al. Norovirus: a novel etiologic agent in hemolytic uremic syndrome in an infant. **BMC Nephrol**, London, v. 20, n. 247, p. 1-4, jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1427-6>.

AHMAD, S.; LI, B.; SUN, J.; ARBAB, S.; DONG, Z.; CHENG, F.; ZHOU, X.; MAHFUZ, S.; ZHANG, J. Recent advances in microencapsulation of drugs for veterinary applications. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 44, n.3, p. 298-312, mai. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jvp.12946>.

AJUN, W.; YAN, S.; LI, G.; HUILI, L. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and *in vitro* release study. **Carbohydrate Polymers**, Coimbra, v. 75, n. 4, p. 566-574, fev. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.08.019>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861708004062>. Acesso em: 19 fev. 2021.

AOUADA, M. R. M. **Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos**. 2009. 119f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2009. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/6114/2416.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 17 fev. 2021.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, n. 33, p. 27- 34, dez. 2007. Disponível em: https://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/4_diversidade/alimentacao/Textos/Quitina_Quitosa na.pdf. Acesso em: 14 jun. 2020.

ATNAFIE, B.; PAULO, D.; ABERA, M.; TEFERA, G.; HAILU, D.; KASAYE, S.; AMENU, K. Occurrence of *Escherichia coli* O157: H7 in cattle feces and contamination of carcass and various contact surfaces in abattoir and butcher shops of Hawassa, Ethiopia. **BMC microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 1-7, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0938-1>.

BAKER, T. A.; EDELMAN, M.; WATANABE, N. Debunking the NCAA's Myth that Amateurism Conforms with Antitrust Law: A Legal and Statistical Analysis. **Tennessee Law Review**, Knoxville, v. 85, p. 661-705, 2017. Disponível em: <https://tennesseelawreviewdotcom.files.wordpress.com/2019/03/1-baker-debunking-the-ncaas-myth.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2021.

BALLEM, A.; GONÇALVES, S.; GARCIA-MENIÑO, I.; FLAMENT-SIMON, S. C.; BLANCO, J. E.; FERNANDES, C.; SAAVEDRA, M. J.; PINTO, C.; OLIVEIRA, H.; BLANCO, J.; ALMEIDA, G.; ALMEIDA, C. Prevalence and Serotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* (STEC) in Dairy Cattle from Northern Portugal. **PloS One**, San Francisco, v. 15, n. 12, p. e0244713, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244713>.

BARBIERI, N. L.; PIMENTA, R. L.; DE MELO, D. A.; NOLAN, L. K.; DE SOUZA, M. M. S.; LOGUE, C. M. Mcr-1 Identified in Fecal *Escherichia Coli* and Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) From Brazil. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 12, p. 659613, abr. 2021, DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.659613>.

BASHIRI, S.; GHANBARZADEH, B.; AYASEH, A.; DEHGHANNYA, J.; EHSANI, A.; OZYURT, H. Essential oil-loaded nanostructured lipid carriers: The effects of liquid lipid type on the physicochemical properties in beverage models. **Food Bioscience**, [S.l.], v. 35, p. 100526, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100526>.

BISWAL, B. K.; KHAIRALLAH, R.; BIBI, K.; MAZZA, A.; GEHR, R.; MASSON, L.; FRIGON, D. Impact of UV and Peracetic Acid Disinfection on the Prevalence of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in Uropathogenic *Escherichia coli* in Wastewater Effluents. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 80, n. 12, p. 3656 –3666, mai. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00418-14>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Salmonella (Salmonelose): o que é, causas, tratamento e prevenção**. 2018. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/Salmonella#:~:text=A%20Salmonella%20est%C3%A1%20dispersa%20no,de%20cozinhar%20ou%20manipular%20alimentos>. Acesso em: 24 jan. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resistência antimicrobiana é ameaça global, diz OMS**. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global-diz-oms>. Acesso em: 18 fev. 2021.

BRESSLER, D. C.; BALZER, M.; DANNEHL, A.; FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. **Water science and technology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 81- 87, mar. 2009. DOI: 10.2166/ws.2009.026. Disponível em: <https://iwaponline.com/ws/article/9/1/81/26470/Persistence-of-Pseudomonas-aeruginosa-in-drinking>. Acesso em: 26 jan. 2021.

BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, n. 5, p. 361–377, mai. 2008. DOI: 10.1080/10408390701347801. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408390701347801>. Acesso em: 19 fev. 2021.

CAMPO, N.; DE FLORA, C.; MAFFETTONE, R.; MANOLI, K.; SARATHY, S.; SANTORO, D.; GONZALEZ-OLMOS, R.; AUSET, M. Inactivation kinetics of antibiotic resistant *Escherichia coli* in secondary wastewater effluents by peracetic and performic acids. **Water Research**, Oxford, v. 169, n.115227, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115227>.

CARVALHO, A. P.; RIBEIRO, R. A. C.; ZAGO, S.; BONNAS, D.S. Formação e resistência do biofilme microbiano em indústrias processadoras de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**,

Goiânia, v. 16, n. 30, p. 312, dez. 2019. DOI: 10.18677/EnciBio_2019B31. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2019b/formacao.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2021.

CAVALLINI, G.; CAMPOS, S. X.; SOUZA, J. B.; VIDAL, C. M. S. Evaluation of the Physical–Chemical Characteristics of Wastewater After Disinfection with Peracetic Acid. **Water, air and soil pollution**, Dordrecht, v. 224, n. 1752, p. 1-11, set. 2013. DOI: 10.1007/s11270-013-1752-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-013-1752-5>. Acesso em: 27 jan. 2021.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to contact with dairy calves (final update)**. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/>. Acesso em: 24 jan. 2021.

CHANDRA, H.; KUMARI, P.; BONTEMPI, E.; YADAV, S. Medicinal plants: Treasure trove for green synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Peoria, v. 24, p. 1-11, mar. 2020. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101518. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S187881811931299X>. Acesso em: 19 fev. 2021.

CLEMENTE, L.; MANAGEIRO, V.; CORREIA, I.; AMARO, A.; ALBUQUERQUE, T.; THEMUDO, P.; FERREIRA, E.; CANIÇA, M. Revealing Mcr-1-Positive ESBL-Producing *Escherichia coli* Strains among *Enterobacteriaceae* from Food-Producing Animals (Bovine, Swine and Poultry) and Meat (Bovine and Swine), Portugal, 2010–2015. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 296, p. 37–42, mai. 2019. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.006.

CREMIEUX, A.F.J.; DAVIN-REGLI, A. Methods of Testing Disinfectants. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, Sterilization, and Preservation**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000, p. 1305-1338.

CUMONT, A.; ZHANG, R.; ZHENG, Y.; CORSCADDEN, L.; OGGIONI, M. R; LI, CHENGMING. Antibacterial Properties of Polycrystalline Diamond Films. **Ceramics International**, [S. l.], v. 47, n. 23, p. 32562–32569, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.08.151>.

DESVAUX, M.; DALMASSO, G.; BEYROUTHY, R.; BARNICH, N.; DELMAS, J.; BONNET, R. Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 11, p. 2065, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>.

EFSA - EUROPEAN CENTRE FOR ECOTOXICOLOGY AND TOXICOLOGY OF CHEMICALS. **Peracetic Acid (CAS No. 79-21-0) and its Equilibrium Solution**. Brussels, BE: ECETOC, 2001. Disponível em: <https://www.ecetoc.org/wp-content/uploads/2014/08/JACC-040.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2021.

ECHA OU EFSA - EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. **Biocidal Products Committee (BPC)**. 2016. Disponível em: <https://echa.europa.eu/about-us/who-we-are/biocidal-products-committee>. Acesso em: 27 jan. 2021.

ETTER, A.J.; WEST, A.M.; BURNETT, J.L.; WU, S.T.; VEENHUIZEN, D.R.; OGAS, R.A.; OLIVER, H.F. *Salmonella* enterica subsp. enterica Serovar Heidelberg Food Isolates Associated with a Salmonellosis Outbreak Have Enhanced Stress Tolerance Capabilities. **Food Microbiology**, Londres, v. 85, n. 16, p. 1-22. ago. 2019. DOI: 10.1128/AEM.01065-19. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/aem/85/16/e01065-19.full.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2021.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **CFR - Code of Federal Regulations**. 2020. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=110>. Acesso em: 27 jan. 2021.

FRANK, K; GARCIA C. V.; SHIN H.; KIM, J. T. Alginate Biocomposite Films Incorporated with Cinnamon Essential Oil Nanoemulsions: Physical, Mechanical, and Antibacterial Properties. **International Journal of Polymer Science**, London, v. 2018, p. 1–8, dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/1519407>.

GARCIA, K.C.O.D. **Utilização de bacteriófagos ambientais no controle de biofilmes de *Salmonella* spp. em superfícies na indústria de processamento e comercialização de carcaças de frango de corte e derivados**. 2015. 43p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2015. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/132128/000849378.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 fev. 2021.

GHODRATI, M.; FARAHPOUR, M.; HAMISHEHKAR, H. Encapsulation of Peppermint essential oil in nanostructured lipid carriers: In-vitro antibacterial activity and accelerative effect on infected wound healing. **Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 564, p. 161-169, mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.12.043>.

GOESMANN, H.; FELDMANN, C. Nanoparticulate functional materials. **Angewandte Chemie International Edition**, Alemanha, v. 49, n. 8, p. 1362-1395, fev. 2010. DOI: 10.1002/anie.200903053. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/anie.200903053>. Acesso em: 18 fev. 2021.

GREVSKOTT, D. H.; GHAVIDEL, F. Z.; SVANEVIK, C. S.; MARATHE, N. P. Resistance Profiles and Diversity of [Beta]-Lactamases in *Escherichia Coli* Strains Isolated from City-Scale Sewage Surveillance in Bergen, Norway Mimic Clinical Prevalence. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 226, p.11278, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112788>.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 1, p. 26-29, out. 2010. DOI: 10.1016/j.resmic.2009.10.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19840847/>. Acesso em: 24 jan. 2021.

HABETS, A.; CROMBÉ, F.; NAKAMURA, K.; GUÉRIN, V.; DE RAUW, K.; PIÉRARD, D.; SAULMONT, M.; HAYASHI, T.; MAINIL, J. G.; THIRY, D. Genetic Characterization of Shiga toxigenic and Enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 from Diarrhoeic and Septicaemic Calves and Relatedness to Human Shigatoxigenic *E. coli* O80:H2. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 130, n. 1, p. 258–264, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14759>.

HOSOKAWA, M.; NOGI, K.; NAITO, M.; YOKOYAMA, T. **Nanoparticle Technology Handbook**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2007.

JERÔNIMO, H. M. A.; QUEIROGA, R.C.R.E.; COSTA, A.C.V.; BARBOSA, I.M.; CONCEIÇÃO, M.L.; SOUZA, E.L. Adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food processing plants as affected by growth medium, surface type and incubation temperature. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 48, n. 4, dez. 2012. DOI: 10.1590/S1984-82502012000400018. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/bjps/v48n4/v48n4a18.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2021.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, Arábia Saudita, v. 12, n. 7, p. 908-931, nov. 2019. DOI: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535217300990>. Acesso em: 18 fev. 2021.

KHAN, A.R.; HUANG, Z.; JINZHONG, T.; ZHU, Y.; MORSI, A.; ALDALBAHI, M.; EL-NEWEHY, Y.; XIAOYU, M.; XIUMEI, M. PLCL/Silk fibroin based antibacterial nano wound dressing encapsulating oregano essential oil: fabrication, characterization and biological evaluation. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 196, p. 111352, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111352>.

KHEZRI, K.; FARAHPOUR, M.; MOUNESI RAD, S. Efficacy of *Mentha pulegium* essential oil encapsulated into nanostructured lipid carriers as an in vitro antibacterial and infected wound healing agent. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 589, p. 124414, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124414>.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, Elmsford, v.30, p. 47–55, 2004. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00147-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00147-8).

KMIEC, M.; PIGHINELLI, L.; TEDESCO, M.F.; SILVA, M.M.; REIS, V. Chitosan – Properties and Application in Dentistry. **Advances in Tissue Engineering & Regenerative Medicine**, Budapeste, v. 2, n. 4, p. 205-211, jun. 2017. DOI: 10.15406/atboa.2017.02.00035.

Disponível em: <https://medcraveonline.com/ATROA/ATROA-02-00035.pdf>. Acesso em: 11 out. 2020.

KRAMBECK, K.; SILVA, V.; SILVA, R.; FERNANDES, C.; CAGIDE, F.; BORGES, F.; AMARAL, M. Design and characterization of Nanostructured lipid carriers (NLC) and Nanostructured lipid carrier-based hydrogels containing *Passiflora edulis* seeds oil. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 600, p. 120444, mai. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120444>.

LIU, S. S.; QU, H. M.; YANG, D.; HU, H.; LIU, W.L.; QIU, Z. G.; HOU, A. M.; GUO, J.; LI, J.W.; SHEN, Z. Q.; JIN, M. Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant. **Water Research**, Oxford, v. 136, p. 131-136. jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.036>.

LOVISON, M.; MAROSTEGAN, L. F.; PERES, M. S.; MENEZES, I. F.; GHIRALDI, M.; RODRIGUES, R. A.; PINHO, S. C. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken patê. **LWT**, [S. l.], v. 77, p. 233–240. abr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.061>.

LUUKKONEN, T.; TEERINIEMI, J.; PROKKOLA, H.; RÄMÖ, J.; LASSI, U. Chemical Aspects of Peracetic Acid Based Wastewater Disinfection. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 40, n. 1, p. 73-80, jan. 2014. DOI: 10.4314/wsa.v40i1.9. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/wsa/article/view/99664/88947>. Acesso em: 27 jan. 2021.

MACHADO, S. C. A.; PEREIRA, V. L. A.; AQUINO, M. H. C.; GIOMBELI, A.; RODRIGUES, D. P.; NASCIMENTO, E. R. Qualitative and Quantitative Analysis of *Salmonella* spp. in Broilers Technological Processing and Determination of a Performance Objective (PO) for Frozen Chicken Breast. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 1-12, fev. 2020. DOI: 10.1590/1806-9061-2019-1196. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbca/v22n1/1516-635X-rbca-22-01-eRBCA-2019-1196.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2021.

MACHADO, T.R.M.; MARCON, T.R.; MALHEIROS, P.S.; BRANDELLI, A.; TONDO, E.C. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 475–481, out./dez. 2010. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2010/ses-19246/ses-19246-2277.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2021.

MCKEE, R.; SCHNADOWER, D.; TARR, P.; XIE, J.; FINKELSTEIN, Y.; DESAI, N. FREEDMAN, S. Predicting hemolytic uremic syndrome and renal replacement therapy in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-infected children. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 70, n. 8, p. 1643–1651. abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz432>.

MILLEZI, A.F. **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2012. 112p. Tese (Doutorado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2012. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/598/1/TESE%20A%C3%A7%C3%A3o%20de%20%C3%B3leos%20essenciais%20sobre%20biofilmes%20formados%20por%20Staphylococcus%20aureus%20e%20Escherichia%20coli.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2021.

MORTAZAVI, N.; ALIAKBARLU, J. Antibacterial Effects of Ultrasound, Cinnamon Essential Oil, and Their Combination Against *Listeria Monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium in Milk. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 84, n. 12, p. 3700–3706, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14914>.

NAG, R.; AUER, A.; NOLAN, S.; RUSSELL, L.; MARKEY, B. K.; WHYTE, P.; O'FLAHERTY, V.; BOLTON, D.; FENTON, O.; RICHARDS, K. G.; CUMMINS, E. Evaluation of Pathogen Concentration in Anaerobic Digestate Using a Predictive Modelling Approach (ADRISK). **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 800, p. 149574, dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149574>.

NAILI, I.; VINOT, J.; BAUDNER, B. C.; BERNALIER-DONADILLE, A.; PIZZA, M.; DESVAUX, M.; JUBELIN, G.; D'ORO, U.; BUONSANTI, C. Mixed Mucosal-Parenteral Immunizations with the Broadly Conserved Pathogenic *Escherichia Coli* Antigen SslE Induce a Robust Mucosal and Systemic Immunity without Affecting the Murine Intestinal Microbiota. **Vaccine**, Kidlington, v. 37, n. 2, p. 314–324, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.10.008>.

NAKAO, J.H.; TALKINGTON, D.; BOPP, C.A.; BESSER, J.; SANCHEZ, M.L.; GUARISCO, J.; DAVIDSON, S.L.; WARNER, C.; McINTYRE, M.G.; GROUP, J.P.; COMSTOCK, N.; XAVIER, N.; PINSENT, T.S.; BROWN, J.; DOUGLAS, J.M.; GOMEZ, G.A.; GARRETT, N.M.; CARLETON, H.A.; TOLAR, B.; WISE, M.E. Unusually high illness severity and short incubation periods in two foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections with potential coincident *Staphylococcus aureus* intoxication. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 146, n. 1, p. 19-27, dez. 2018. DOI: 10.1017/S0950268817002655. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29208063/>. Acesso em: 24 jan. 2021.

NACMCF - NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS. Response to Questions Posed by the Food Safety and Inspection Service Regarding Salmonella Control Strategies in Poultry. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 82, n. 4, p. 645–668, abr. 2019. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-500. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30917043/>. Acesso em: 24 jan. 2021.

OLIVEIRA, J. F. A.; SCHEFFER, F.; LANDIS, R. F.; TEIXEIRA-NETO, E.; ROTELLO, V. M.; CARDOSO, M. B. Dual Functionalization of Nanoparticles for Generating Corona-Free and Non-Cytotoxic Silica Nanoparticles. **ACS applied materials and interfaces**, Washington, v. 10, n. 49, p. 41917–41923, nov. 2018. DOI: 10.1021/acsami.8b12351. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsami.8b12351>. Acesso em: 18 fev. 2021.

OLIVEIRA, A.P.; WEBBER, B.; POTTKER, E.S.; DAROIT, L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B. Adesão de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares sob diferentes superfícies e condições ambientais. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 15, n. 11, p. 1-9, nov. 2019. DOI: 10.14808/sci.plena.2019.116101. Disponível em: <https://scientiaplena.emnuvens.com.br/sp/article/view/5171/2234>. Acesso em: 27 jan. 2021.

ONU - Organização das Nações Unidas. Mundo tem 600 milhões de casos de doenças por alimentos contaminados todos os anos. ONU News - Perspectiva Global Reportagens Humanas.

07 jun. 2021. Disponível em: <<https://news.un.org/pt/story/2021/06/1752552>>. Acessado dia: 04 de novembro de 2021.

PALMER, T. R. S.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, N.; CALCRAFT, T.; LAGERCRANTZ, S.; ZACHS, T.; YU, X. J.; GRABE, G. J.; HOLDEN, D. W.; NANS, A.; ROSENTHAL, P. B.; ROUSE, S. L.; BEEBY, M. Structure of the cytoplasmic domain of SctV (SsaV) from the *Salmonella* SPI-2 injectisome and implications for a pH sensing mechanism. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v. 213, n. 2, p. 107729, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107729>.

POOVI, G.; DAMODHARAN, N. Development of tamoxifen-loaded surface-modified nanostructured lipid carrier using experimental design: *In vitro* and ex vivo characterisation. **IET Nanobiotechnology**, Stevenage, v. 14, n.4, p. 261-274. jun. 2020. DOI: [10.1049/IET-NBT.2019.0276](https://doi.org/10.1049/IET-NBT.2019.0276).

RAO, S.; LINKE, L.; DOSTER, E.; HYATT, D.; BURGESS, B.A.; MAGNUSON, R.; PABILONIA, K.L.; MORLEY, P.S. Genomic diversity of class I integrons from antimicrobial resistant strains of *Salmonella* Typhimurium isolated from livestock, poultry and humans. **PLoS One**, São Francisco, v. 15, n. 12, p. 1-14, dez. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0243477. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7732114/pdf/pone.0243477.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2021.

RIBEIRO, L.N.M.; MÁRCIA, C.; BREITKREITZ, V.A.; GUILHERME, G.H.; SILVA, G.H.R.; COUTO, V.C.; CASTRO, S.R.; PAULA, B.O.; MACHADO, D.; PAULA, E. Natural Lipids-Based NLC Containing Lidocaine: From Pre-Formulation to in Vivo Studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 106, p.102–120, ago. 2017. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.05.060. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928-0987\(17\)30299-3](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928-0987(17)30299-3). Acesso em: 18 fev. 2021.

RIBEIRO, L. N. M.; PAULA, E.; ROSSI, D. A.; MARTINS, F. A.; MELO, R. T.; MONTEIRO, G. P.; BREITKREITZ, M. C.; GOULART, L. R.; FONSECA, B. B. Nanocarriers From Natural Lipids With *In Vitro* Activity Against *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S.l.], v. 10, p. 5710402021. ANO DE PUBLICAÇÃO DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.571040>.

RUAN, X.; DENG, X.; TAN, M.; WANG, Y.; HU, J.; SUN, Y.; YU, C.; ZHANG, M.; JIANG, N.; JIANG, R. Effect of Resveratrol on the Biofilm Formation and Physiological Properties of Avian Pathogenic *Escherichia Coli*. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 249, p. 104357, out. 2021. DOI: 10.1016/j.jprot.2021.104357.

SHARIFI, M.; HOSSEINALI, S.H.; ALIZADEH, R.H.; HASAN, A.; ATTAR, F.; SALIHI, A.; SHEKHA, M.S.; AMEN, K.M.; AZIZ, F.M.; SABOURY, A.K.; AKHTARI, K.; TAGHIZADEH, A.; HOOSHMAND, N.; EL-SAYED, M.A.; FALAHATI, M. Plasmonic and chiroplasmonic nanobiosensors based on gold nanoparticles. **Talanta: an international journal of analytical chemistry**, Londres, v. 212, p. 1-70, mai. 2020. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.120782. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914020300734>. Acesso em: 18 fev. 2021.

SHARP, A.; SMOUT, E.; BYRNE, L.; GREENWOOD, R.; ABDOOLLAH, R.; HUTCHINSON, C.; JENKINS, C.; ARUNACHALAM, N.; PADFIELD, S.; HUGHES, G.; GENT, M. An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 linked to a mud-based obstacle course, England, August 2018. **Zoonoses Public Health**, Berlin, v. 67, n. 5, p. 467-473, ago. 2020. DOI: 10.1111/zph.12744.

SILVA, R.A.; RABELO, R.G. **Desinfetantes e degermantes utilizados na odontologia**. In: Conselho Regional de Odontologia da Bahia. Cartilha de biossegurança em tempos de COVID-19. Bahia: CRO-BA, 2020. Disponível em: [https://www.croba.org.br/fotos/noticias/377/mg/3.1%20\(4\).pdf](https://www.croba.org.br/fotos/noticias/377/mg/3.1%20(4).pdf). Acesso em: 15 fev. 2021.

SMRDEL, P.; BOGATAJ, M.; ZEGA, A.; PLANINSEK, O.; MRHAR, A. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. **Journal of Microencapsulation**, Londres, v. 25, n. 2, p. 90–105, mar. 2008. DOI: 10.1080/02652040701776109. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18246487/>. Acesso em: 19 fev. 2021.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, Vurrey, v. 31, n. 2, p.572-585, jun. 2013. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.12.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713512006536>. Acesso em: 27 jan. 2021.

TAZEHJANI, D.; FARAHPOUR, M.; HAMISHEHKAR, H. Effectiveness of topical caraway essential oil loaded into nanostructured lipid carrier as a promising platform for the treatment of infected wounds. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, v. 610, p. 125748, fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125748>.

TOMAT, D.; BALAGUE, C.; AQUILI, V.; VERDINI, R.; QUIBERONI, A. Resistance of phages lytic to pathogenic *Escherichia coli* to sanitisers used by the food industry and in home settings. **International Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v.53, n. 2, p. 533-540, ago. 2017. DOI: 10.1111/ijfs.13626.

VOLSCHAN J. R. I.; SANTOS, D.S.; TEIXEIRA, L.A.C. Eficiência do ácido peracético na desinfecção de efluentes pluviais contaminados por esgoto doméstico. In: 30º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2019, Natal, RN: 30º Congresso ABES, 2019. Disponível em: <https://abesnacional.com.br/XP/XP-EasyArtigos/Site/Uploads/Evento45/TrabalhosCompletoPDF/IX-024.pdf> Acesso em: 18 fev. 2021.

WARD, J. S. T.; LAPWORTH, D. J.; READ, D. S.; PEDLEY, S.; BANDA, S. T.; MONJEREZI, M.; GWENGWEYA, G.; MACDONALD, A. M. Tryptophan-like Fluorescence as a High-Level Screening Tool for Detecting Microbial Contamination in Drinking Water. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 750, p. 141284, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141284>.

WEBBER, B.; OLIVEIRA, A.P.; POTTKER, E.S.; DAROIT, L.; LEVANDOWSKI, R.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; RODRIGUES, L.B. *Salmonella* Enteritidis forms biofilm under low temperatures on different food industry surfaces. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 49, n. 7, p. 1-9, nov. 2019. DOI: 10.1590/0103-8478cr20181022. Disponível em:

<https://www.scielo.br/pdf/cr/v49n7/1678-4596-cr-49-07-e20181022.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2021.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. ***Salmonella (non-typhoidal)***. 2018. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: 24 jan. 2021.

YANG, C.; YAN, H.; JIANG, X.; XU, H.; TSAO, R.; ZHANG, L. Preparation of 9Z- β -Carotene and 9Z- β -Carotene High-Loaded Nanostructured Lipid Carriers: Characterization and Storage Stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 68, n. 47, p. 13844-13853, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02342>.

YIN, L.; LI, Q.; WANG, Z.; TU, J.; SHAO, Y.; SONG, X.; PAN, X.; QI, K. The Role of *Escherichia coli* Type III Secretion System 2 Chaperone Protein YgeG in Pathogenesis of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. **Research in Veterinary Science**, London, v. 140, p. 203–211, set. 2021. DOI : [10.1016/j.rvsc.2021.09.011](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.09.011)

ZIECH, R.E. **Caracterização de *Salmonella* sp. isolada de indústrias de aves baseada na formação de biofilmes, tolerância a sanitizantes e resistência a antimicrobianos**. 2015. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Paraná, Palotina, PR, 2015. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/37368/R%20-%20D%20-%20ROSANGELA%20ESTEL%20ZIECH.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 27 jan. 2021.

ZHANG, T.; WANG, T.; MEJIA-TICKNER, B.; KISSEL, J.; XIE, X.; HUANG, C. H. Inactivation of bacteria by peracetic acid combined with ultraviolet irradiation: Mechanism and optimization. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 54, n. 15, p. 9652-9661, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02424>.

ANEXOS

Article Title

First Author¹, Second Author^{2*}, Third Author^{1,2}

¹Laboratory X, Institute X, Department X, Organization X, City X, State XX (only USA, Canada and Australia), Country

²Laboratory X, Institute X, Department X, Organization X, City X, State XX (only USA, Canada and Australia), Country

*** Correspondence:**

Corresponding Author
email@uni.edu

Keywords: keyword1, keyword2, keyword3, keyword4, keyword5. (Min.5-Max. 8)

Abstract

For full guidelines please refer to [Author Guidelines](#)

As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. References should not be cited in the abstract. Leave the Abstract empty if your article does not require one, please see the [Summary Table](#) for full details.

1. Introduction

For **Original Research Articles**, **Clinical Trial Articles**, and **Technology Reports** the introduction should be succinct, with no subheadings. For **Case Reports** the Introduction should include symptoms at presentation, physical exams and lab results.

2. Article types

For requirements for a specific article type please refer to the Article Types on any Frontiers journal page. Please also refer to [Author Guidelines](#) for further information on how to organize your manuscript in the required sections or their equivalents for your field¹.

3. Manuscript Formatting

3.1. Headings

You may insert up to 5 heading levels into your manuscript as can be seen in “Styles” tab of this template. These formatting styles are meant as a guide, as long as the heading levels are clear, Frontiers style will be applied during typesetting.

¹ For Original Research articles, please note that the Material and Methods section can be placed in any of the following ways: before Results, before Discussion or after Discussion.

3.2. Equations

The equations should be inserted in editable format from the equation editor.

$$f(x) = a_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left(a_n \cos \frac{n\pi x}{L} + b_n \sin \frac{n\pi x}{L} \right)$$

3.3. Figures

Frontiers requires figures to be submitted individually, in the same order as they are referred to in the manuscript. Figures will then be automatically embedded at the bottom of the submitted manuscript. Kindly ensure that each table and figure is mentioned in the text and in numerical order. Figures must be of sufficient resolution for publication ([see here for examples and minimum requirements](#)). Figures which are not according to the guidelines will cause substantial delay during the production process. Figure legends should be placed at the end of the manuscript. Please see [here](#) for full Figure guidelines

3.3.1. Permission to reuse and Copyright

Figures, tables, and images will be published under a Creative Commons CC-BY licence and permission must be obtained for use of copyrighted material from other sources (including re-published/adapted/modified/partial figures and images from the internet). It is the responsibility of the authors to acquire the licenses, to follow any citation instructions requested by third-party rights holders, and cover any supplementary charges.

3.4. Tables

Tables should be inserted at the end of the manuscript. Tables must be provided in an editable format e.g., Word, Excel. Tables provided as jpeg/tiff files will **not be accepted**. Please note that very large tables (covering several pages) cannot be included in the final PDF for reasons of space. **These tables will be published as [Supplementary Material](#) on the online article page at the time of acceptance. The author will be notified during the typesetting of the final article if this is the case.**

7 Nomenclature

3.5. Resource Identification Initiative

To take part in the Resource Identification Initiative, please use the corresponding catalog number and RRID in your current manuscript. For more information about the project and for steps on how to search for an RRID, please click [here](#).

3.6. Life Science Identifiers

Life Science Identifiers (LSIDs) for ZOOBANK registered names or nomenclatural acts should be listed in the manuscript before the keywords with the following format:

urn:lsid:<Authority>:<Namespace>:<ObjectID>[:<Version>]

For more information on LSIDs please see [Inclusion of Zoological Nomenclature](#) section of the guidelines.

4. Additional Requirements

For additional requirements for specific article types and further information please refer to [Author Guidelines](#).

5. Conflict of Interest

All financial, commercial or other relationships that might be perceived by the academic community as representing a potential conflict of interest must be disclosed. If no such relationship exists, authors will be asked to confirm the following statement:

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

6. Author Contributions

The Author Contributions section is mandatory for all articles, including articles by sole authors. If an appropriate statement is not provided on submission, a standard one will be inserted during the production process. The Author Contributions statement must describe the contributions of individual authors referred to by their initials and, in doing so, all authors agree to be accountable for the content of the work. Please see [here](#) for full authorship criteria.

7. Funding

Details of all funding sources should be provided, including grant numbers if applicable. Please ensure to add all necessary funding information, as after publication this is no longer possible.

8. Acknowledgments

This is a short text to acknowledge the contributions of specific colleagues, institutions, or agencies that aided the efforts of the authors.

9. Reference styles

The following formatting styles are meant as a guide, as long as the full citation is complete and clear, Frontiers referencing style will be applied during typesetting.

9.1. Science, Engineering and Humanities and Social Sciences references

For articles submitted in the domains of Science, Engineering or Humanities and Social Sciences please apply Author-Year system for in-text citations. For Humanities and Social Sciences articles please include page numbers in the in-text citations

For some examples please click [here](#).

For more examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to the [Chicago Manual of Style](#).

9.2. Health, Physics and Mathematics references

For articles submitted in the domain of Health or the journals Frontiers in Physics and Frontiers in Applied Mathematics and Statistics please apply the Vancouver system for in-text citations.

In-text citations should be numbered consecutively in order of appearance in the text – identified by Arabic numerals in the parenthesis [square parenthesis for Physics and Mathematics].

For some examples please click [here](#).

For more examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to [Citing Medicine](#).

10. Supplementary Material

Supplementary Material should be uploaded separately on submission, if there are Supplementary Figures, please include the caption in the same file as the figure. Supplementary Material templates can be found in the Frontiers Word Templates file.

Please see the [Supplementary Material section of the Author guidelines](#) for details on the different file types accepted.

1 Data Availability Statement

The datasets [GENERATED/ANALYZED] for this study can be found in the [NAME OF REPOSITORY] [LINK]. Please see the [Data Availability section of the Author guidelines](#) for more details.

Supplementary Material

1 Supplementary Data

Supplementary Material should be uploaded separately on submission. Please include any supplementary data, figures and/or tables. All supplementary files are deposited to FigShare for permanent storage and receive a DOI.

Supplementary material is not typeset so please ensure that all information is clearly presented, the appropriate caption is included in the file and not in the manuscript, and that the style conforms to the rest of the article. To avoid discrepancies between the published article and the supplementary material, please do not add the title, author list, affiliations or correspondence in the supplementary files.

2 Supplementary Figures and Tables

For more information on Supplementary Material and for details on the different file types accepted, please see [here](#). Figures, tables, and images will be published under a Creative Commons CC-BY licence and permission must be obtained for use of copyrighted material from other sources (including re-published/adapted/modified/partial figures and images from the internet). It is the responsibility of the authors to acquire the licenses, to follow any

citation instructions requested by third-party rights holders, and cover any supplementary charges.

2.1 Supplementary Figures



Supplementary Figure 1. The figure legends are required to have the same font as the main text, 12 point normal Times New Roman, single spaced. Please use a single paragraph for each legend and prepare the figures keeping in mind the PDF layout.

REFERENCES:

Science, Engineering and Humanities and Sustainability Journals In-text Citations

- For works by a single author, include the surname, followed by the year.
- For works by two authors, include both surnames, followed by the year.
- For works by more than two authors, include only the surname of the first author followed by et al., followed by the year.
- For Humanities and Social Sciences journals (journals in bold), include the page numbers.

Examples:

ARTICLE IN A PRINT JOURNAL

Sondheimer, N., and Lindquist, S. (2000). Rnq1: an Epigenetic Modifier of Protein Function in Yeast. *Mol. Cell.* 5, 163-172. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80412-8
ARTICLE IN AN ONLINE JOURNAL Tahimic, C.G.T., Wang, Y., Bikle, D.D. (2013). Anabolic Effects of IGF-1 Signaling on the Skeleton. *Front. Endocrinol.* 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

ARTICLE OR CHAPTER IN A BOOK

Sorenson, P. W., and Caprio, J. C. (1998). "Chemoreception," in *The Physiology of Fishes*, ed. D. H. Evans (Boca Raton, FL: CRC Press), 375-405.
BOOK Cowan, W. M., Jessell, T. M., and Zipursky, S. L. (1997). *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press.

ABSTRACT

Hendricks, J., Applebaum, R., and Kunkel, S. (2010). A World Apart? Bridging the gap Between Theory and Applied Social Gerontology. *Gerontologist* 50, 284-293. Abstract retrieved from Abstracts in Social Gerontology database. (Accession No. 50360869)

WEBSITE

World Health Organization. (2018). E. coli. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> [Accessed March 15, 2018]. PATENT Marshall, S. P. (2000). Method and Apparatus for eye Tracking and Monitoring Pupil Dilation to Evaluate Cognitive Activity. U.S. Patent No 6,090,051. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

DATA

Perdiguerro P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive Sequencing of Ulms Minor's Transcriptome Provides new Molecular Tools for a Genus Under the Constant Threat of Dutch elm Disease. Dryad Digital Repository.(2015)<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

THESES AND DISSERTATIONS

Smith, J. (2008) Post-structuralist Discourse Relative to Phenomological Pursuits in the Deconstructivist Arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago PREPRINT Hampton, S., Rabagliati, H., Sorace, A., and Fletcher-Watson, S. (2017). Autism and Bilingualism: A Qualitative Interview Study of Parents' Perspectives and Experiences. PsyArXiv [Preprint]. <https://doi.org/10.31234/osf.io/76xfs>

CONFERENCE PRESENTATION

Evans, A. C., Jr., Garbarino, J., Bocanegra, E., Kinscherff, R. T., & Márquez-Greene, N. (2019). Gun Violence: An Event on the Power of Community [Conference presentation]. APA 2019 Convention, Chicago, IL, United States. <https://convention.apa.org/2019-video>.