



JORGE PAMPLONA PAGNOSSA

**Análise metabolômica de bactérias sob estresse subletal de
compostos naturais e seus produtos nanoemulsionados**

LAVRAS – MG

2020

JORGE PAMPLONA PAGNOSSA

Análise metabolômica de bactérias sob estresse subletal de compostos naturais e seus produtos nanoemulsionados

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Prof.^a Dr.^a Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS – MG
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pagnossa, Jorge Pamplona.

Análise metabolômica de bactérias sob estresse subletal de
compostos naturais e seus produtos nanoemulsionados / Jorge
Pamplona Pagnossa. - 2020.

94 p. : il.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.
Bibliografia.

1. Metabolismo do estresse bacteriano. 2. Aditivos naturais
(óleos essenciais e nisina). 3. Nanotecnologia aplicada à indústria
de alimentos. I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Título.

JORGE PAMPLONA PAGNOSSA

Análise metabolômica de bactérias sob estresse subletal de compostos naturais e seus produtos nanoemulsionados

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 17 de Março de 2020

Dr. ^a Alcilene de Abreu Pereira	IFMG
Dr. ^a Angélica Cristina de Souza	UFLA
Dr. ^a Suzana Reis Evangelista	UFLA
Dr. Thales Leandro Coutinho de Oliveira	UFLA



Prof.^a Dr.^a Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS – MG
2020**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e ao Santo guerreiro.

À toda minha família por sempre acreditarem em minha capacidade.

À minha noiva Tamara, por estar sempre presente em todos os momentos.

À toda a família de minha noiva, sogra Irani, avó Ilda, tios, tias e primos, pelo apoio e carinho.

À toda família de minha cunhada Myria pela solidariedade e amizade.

A todos professores e servidores da Universidade Federal de Lavras e ao PPGMA que proporcionaram experiências grandiosas de sabedoria, companheirismo e maturidade. Aos colegas de laboratório e todos que cooperaram de alguma forma neste trabalho.

A todos os colaboradores da Università Cattolica del Sacro Cuore, pela gentileza e competência.

À todas pessoas especiais que conheci em minha passagem à Itália pela hospitalidade e atenção.

À secretária Rose pela prestatividade.

Ao meu coorientador Luigi, por guiar-me em novos caminhos.

À minha orientadora Roberta, por clarear todo o percurso desta jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

No presente estudo, foram analisados os diversos aspectos da adaptação microbiana em relação à inocuidade dos ambientes alimentares e à busca de novas tecnologias para produtos antimicrobianos naturais. Potenciais patógenos microbiológicos são constantemente foco de atenção em termos de segurança sanitária devido a fenômenos de adaptação cruzada induzidos por doses subletais de soluções antibacterianas. Óleos essenciais e seus componentes majoritários aparecem como alternativa aos desinfetantes usuais, embora, estudos mais aprofundados ainda sejam necessários para compreender melhor sua aplicabilidade. Para prevenir a adaptação bacteriana aos sanitizantes, foi realizada uma abordagem diferente para identificar, entender e prever a ocorrência de bactérias tolerantes. Assim, o primeiro trabalho teve como objetivo avaliar por análises metabolômicas globais de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis previamente exposta a doses subletais de cinnamaldeído, citral e linalol. Testes preliminares demonstraram fenótipos de adaptação de células planctônicas e biofilmes de *S. Enteritidis* quando expostos a doses subletais de linalol, resultando em tolerância às concentrações anteriormente letais de citral. Posteriormente, a frequência relativa e a abundância de metabólitos de amostras tratadas com doses subletais de terpenos (citral e linalol) foram semelhantes exibindo respostas celulares equivalentes. A análise discriminatória de OPLS (*orthogonal partial least squares*) forneceu uma visão abrangente da semelhança entre os tratamentos que levam a concluir que este modelo foi adequado para detectar e prever possíveis fenômenos de adaptação entre bactérias patogênicas frente a componentes de óleos essenciais. O segundo trabalho buscou novas opções de prevenção e eliminação de bactérias patogênicas trazendo a tecnologia de nanoemulsões para melhorar o efeito antimicrobiano e, igualmente pertinente, a necessidade da melhor compreensão dos mecanismos celulares de estresse induzido por doses subletais de agentes antimicrobianos. Além disso, a associação da nisina, geralmente proporcionam vida útil adicional aos alimentos processados. No entanto, pode interferir negativamente na eficiência dos componentes majoritários de óleos essenciais contra bactérias patogênicas. Nesse sentido, os compostos naturais cinnamaldeído, citral e linalol foram avaliados isoladamente, associados à nisina, e ambas nas formas nanoemulsionadas em testes de sensibilidade contra *Bacillus cereus* e um testes metabolômico para identificar possíveis mudanças entre os tratamentos. Os resultados apresentaram alterações morfológicas na estrutura das células *B. cereus* tratadas com nisina e efeito antagonico de tratamentos associados à nisina em comparação com tratamentos isolados e nanoemulsionados. Os testes de sensibilidade e de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-QTOF-MS) indicaram que a nisina pode reagir por meio de reação de conjugação com a redução da eficiência bactericida, enquanto que o efeito de citral foi apontado como não afetado pela nisina em nanoemulsões. Portanto, as nanoemulsões de compostos naturais se mostraram de eficiência superior aos outros agentes antimicrobianos testados e as análises metabolômicas se mostraram úteis na compreensão da resposta adaptativa induzidas por doses subletais em bactérias patogênicas.

Palavras-chave: estresse bacteriano; metabolismo; nanotecnologia; óleos essenciais; nisina.

ABSTRACT

In the present study, the various aspects of microbial adaptation were analyzed in relation to the safety of food environments and the search for new technologies for natural antimicrobial products. Potential microbiological pathogens are constantly the focus of attention in terms of health safety due to cross-adaptation phenomena induced by sublethal doses of antibacterial solutions. Essential oils and their major components appear as an alternative to the usual disinfectants, although further studies are still needed to better understand their applicability. To prevent bacterial adaptation to sanitizers, a different approach was taken to identify, understand and predict the occurrence of tolerant bacteria. Thus, the first study aimed to evaluate the global metabolomic analyses of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis previously exposed to sublethal doses of cinnamaldehyde, citral and linalool. Preliminary tests demonstrated phenotypes of coplanktonic cell adaptation and biofilms of *S. Enteritidis* when exposed to sublethal doses of linalool, resulting in tolerance to previously lethal citral concentrations. Subsequently, the relative frequency and abundance of metabolites of samples treated with sublethal doses of terpenes (citral and linalool) were similar exhibiting equivalent cellular responses. The discriminatory analysis of OPLS (orthogonal partial least squares) provided a comprehensive view of the similarity between treatments that lead to the conclusion that this model was adequate to detect and predict possible phenomena of adaptation between bacteria against essential oil components. The second study sought new options for prevention and elimination of pathogenic bacteria by bringing nanoemulsion technology to improve the antimicrobial effect and, equally pertinently, the need for a better understanding of the cellular mechanisms of stress induced by sublethal doses of antimicrobial agents. In addition, the combination of nisin usually provide additional shelf life to processed foods. However, it can negatively interfere in the efficiency of the major components of essential oils against pathogenic bacteria. In this sense, natural compounds such as cinnamaldehyde, citral and linalool were tested alone, associated with nisin, and both in nanoemulsified forms in sensitivity tests against *Bacillus cereus* and a metabolomic test to identify possible changes between treatments. The results showed morphological changes in the structure of *B. cereus* cells treated with nisin and antagonistic effect of nisin-associated treatments compared to isolated and nanoemulsified treatments. Sensitivity tests and liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS) analyses indicated that nisin may react in conjunction with reduced bactericidal efficiency, while the citral effect was pointed out as unaffected by the nisin in nanoemulsions. Therefore, the nanoemulsions of natural compounds were of superior efficiency to the other antimicrobial agents tested and the metabolomic analyses proved useful in understanding the adaptive response induced by sublethal doses in pathogenic bacteria.

Keywords: bacterial stress; metabolism; nanotechnology; essential oils; nisin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 Patógenos bacterianos de interesse alimentar	10
2.1.1 <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis.....	11
2.1.2 <i>Bacillus cereus</i>	12
2.2 Resistência, tolerância e adaptação bacteriana	14
2.2.1 Estresse subletal.....	16
2.2.2 Adaptação cruzada.....	16
2.3 Antimicrobianos naturais	17
2.3.1 Óleos essenciais.....	18
2.3.2 Bacteriocinas.....	24
2.4 Metabolômica microbiana	28
2.4.1 Identificação e quantificação de metabólitos por HPLC-MS.....	29
2.4.2 Heatmap, Clustering e OPLS-DA.....	30
2.5 Nanotecnologia aplicada a indústria de alimentos	31
2.5.1 Nanoemulsões de óleos essenciais e seus componentes majoritários	32
2.5.2 Obtenção de nanoemulsões óleo-em-água (O/A)	35
2.5.3 Formulação e caracterização das nanoemulsões	36
2.5.4 Parâmetros de estabilidade de nanoemulsões.....	37
REFERÊNCIAS	38
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	57
ARTIGO 1 - Metabolomic approach of cross-adaptation in <i>Salmonella</i> ssp. induced by major compounds of essential oils.....	57
ARTIGO 2 - Morphological and metabolomic impact of sublethal doses of natural compounds and its nanoemulsions in <i>Bacillus cereus</i>.....	74

1 INTRODUÇÃO

A tolerância antimicrobiana é um problema de segurança alimentar, representando um risco direto a cadeia de produção higiênico-sanitária. O microrganismo patogênico tolerante possui arcabouço enzimático preparado para suportar condições ambientais hostis que outrora seriam consideradas letais, fato que gera preocupação entre pesquisadores e gestores de qualidade de alimentos. Dentre os microrganismos de interesse na indústria de alimentos encontram-se bastonetes Gram-negativos, como *Salmonella enterica*, e Gram-positivos, como *Bacillus cereus*. Ambos são caracterizados por apresentar elevada resistência a agente antimicrobianos seja na forma planctônica ou em biofilmes. Deste modo, tais bactérias possuem menor susceptibilidade à sanificantes comuns utilizados no mercado persistindo como foco de contaminação de produtos alimentícios que colocam em risco seu destino final, o consumidor.

Atualmente, um grande número de antimicrobianos tornaram-se ineficazes contra organismos previamente susceptíveis, o que intensifica o desafio de novas descobertas. Devido a sua elevada atividade antimicrobiana e por serem considerados como seguros (GRAS), os componentes majoritários tornaram-se uma alternativa de maior viabilidade para utilização na indústria de alimentos uma vez que, em combinações com compostos conhecidamente eficazes, como a nisina, podem ser utilizados em concentrações menores. Além disso, destacou-se o uso da nanotecnologia, que tem sido bastante estudada para a encapsulação de compostos, uma vez que os sistemas nanoestruturados podem ser capazes de aumentar a solubilidade, biodisponibilidade e controlar a estabilidade e liberação do composto, potencializando seu efeito em biofilmes e esporos formados em superfícies e equipamentos.

Embora a busca por novas tecnologias para o controle e prevenção de populações de bactérias patogênicas seja atrativa do ponto de vista científico e comercial, a pesquisa pelos perfis de resposta ao estresse subletal é de grande relevância para auxiliar na compreensão dos mecanismos celulares envolvidos em fenômenos de adaptação celular. Desta forma, a análise dos metabólitos intracelulares possibilitou a alucidação da resposta adaptativa destes microrganismos quando expostos ao estresse químico de compostos naturais, como componentes majoritários de óleos essenciais, bacteriocinas (ex: nisina), e seus produtos nanoemulsionados, em estudos de perfis metabolômicos.

Neste contexto, o presente trabalho direcionou os esforços para a melhor compreensão dos eventos celulares pós-estresse subletal em *Salmonella* Enteritidis e *Bacillus cereus* por meio de análises de cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massas, microscopia eletrônica de varredura, testes de sensibilidade e estatística multivariada para a avaliação de possíveis correlações entre o fenômeno de adaptação cruzada com perfis metabolômicos semelhantes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Patógenos bacterianos de origem alimentar

Bactérias causadoras de toxinfecções alimentares compõem fator importante em relação as taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Durante as últimas duas décadas, toxinfecções alimentares têm emergido como crescente problema econômico e de saúde pública em muitos países, principalmente os considerados subdesenvolvidos.. Há previsões de que o problema aumente no decorrer dos anos, especialmente com as várias mudanças globais, incluindo crescimento da população, pobreza, exportação de alimentos e rações animais, que influenciam a segurança alimentar internacional.

As doenças de origem alimentar podem ser provocadas por diversos grupos de microrganismos., sendo que as bactérias, pela sua diversidade e patogenia, constituem, de longe, o grupo microbiano mais importante e mais vulgarmente associado às doenças transmitidas pelos alimentos. Além disso, devido ao crescimento excessivo de populações bacterianas, algumas cepas são capazes de produzir toxinas (exotoxinas), que ao serem ingeridas com o alimento podem causar graves problemas.

A incapacidade da maioria dos microrganismos de transpor os diversos obstáculos que um patógeno intestinal deve superar a fim de causar a doença de origem alimentar é a razão pela qual apenas alguns são reconhecidos como patógenos alimentares. Os locais e os mecanismos de ligação são importantes fatores de virulência dos microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. Grandes esforços foram realizados a fim de descobrir enterotoxinas para a maioria das bactérias, porém, bem sucedidas apenas para algumas bactérias Gram-negativas.

Ao serem reconhecidos diferentes tipos de organismos causadores de doenças transmitidas por alimentos, é possível notar a existência de diversos mecanismos que podem dar início ao desenvolvimento das doenças alimentares. Geralmente, os mecanismos de patogênese de bactérias de importância alimentar são mais complexos, bem como a patogênese e as propriedades de virulência das bactérias Gram-negativas são consideravelmente diferentes e muito mais complexas do que aquelas verificadas em bactérias Gram-positivas.

Dentre os principais representantes de patógenos de origem alimentar, é possível reconhecer as espécies de *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* e *botulinum*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* e *Yersinia*. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera as DTA uma grande preocupação de saúde pública global e estima que, a cada ano, causem o adoecimento de uma a cada 10 pessoas no mundo. Além disso, DTA podem ser fatais, especialmente em crianças menores de 5 anos, causando 420 mil mortes. Na região das Américas, as doenças diarreicas são responsáveis por 95% das DTAs (BRASIL, 2010).

O centro de vigilância de doenças dos Estados Unidos - CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) estima que a cada ano cerca de 1 em cada 6 americanos (ou 48 milhões de pessoas) é acometido por DTAs, sendo 128 mil são hospitalizadas e 3.000 morrem. No Brasil, a vigilância

epidemiológica das DTA (VE-DTA) monitora os surtos de DTA e os casos das doenças definidas em legislação específica. De acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), são notificados em média, por ano, 700 surtos de DTA, com envolvimento de 13 mil doentes e 10 óbitos.

De forma geral, o conhecimento que hoje se tem das características dos microrganismos e dos métodos ou processos de controle microbiano permite, se rigorosamente aplicado, produzir alimentos com grande qualidade microbiológica e, portanto, relativamente seguros do ponto de vista sanitário para os consumidores. Todavia, é preocupação constante a vulnerabilidade de agentes antimicrobianos em relação a fenômenos adaptativos de populações microbianas que levam a tolerância bacteriana e ineficiência dos mesmos. Portanto, cada vez mais estudos tornam-se necessários para elucidar tais mecanismos de adaptação frente a alterações morfológicas e metabólicas.

Para auxiliar caracterização estrutural e ultra-estrutural de microrganismos existem diversas técnicas microscópicas que podem fornecer informações sobre morfologia e organização dos biofilmes microbianos. Entre as técnicas disponíveis, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é aquela que pode ser utilizada para aumentar o conhecimento da morfologia e da composição das populações microbianas (DÍAZ et al., 2004; ARAUJO et al., 2003).

2.1.1 *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis

Salmonella spp. são bactérias da família Enterobacteriaceae, Gram-negativas em forma de bastonetes, aeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, catalase-positivas, oxidase-negativas e redutoras de nitratos a nitritos. Possuem capacidade de se desenvolver em temperaturas que variam de 5,3 a 45°C, pH entre 6,6 a 8,2 e atividade de água de 0,94 (JAY, 2005). O gênero *Salmonella* é vasto, compreendendo mais de 2.300 sorotipos. Os principais antígenos que distinguem suas variedades sorológicas são o somático (O), flagelar (H) e capsular (K). A grande diversidade do gênero decorre da capacidade de esse microrganismo sofrer variação antigênica, da habilidade de criar mosaicos de genes para seus antígenos por meio de recombinação, de alterações no comprimento, de duplicações de genes e de mutações pontuais (SCHAECHTER et al., 2002).

Salmonella spp. é um dos principais agentes patogênicos de origem alimentar. Adquirida pela ingestão de alimentos contaminados, a salmonelose representa cerca de 10% a 15 % das gastroenterites, sendo as carnes de aves, ovos e produtos cárneos os principais alimentos veiculadores de *Salmonella* ao homem. Sua presença em alimentos é significativo problema de saúde pública (TUNON et al., 2008). A contaminação cruzada foi relatada como uma das principais causas de surtos de origem alimentar envolvendo *Salmonella* e o principal fator atribuído foi a insuficiente desinfecção de equipamentos e superfícies (TODD et al., 2009).

Pesquisas realizadas visando detectar *Salmonella* spp. em alimentos indicam sua presença naqueles com atividade de água acima de 0,94 e ricos em proteínas, como molhos de salada, maionese,

linguiças, ovos (CHAO et al., 2007) e frangos (SANTOS et al., 2001). O contato com aves poedeiras vivas, saudáveis, limpas e sem sinais de doença podem ainda conter *Salmonella* e, conseqüentemente, infectar pessoas e outros animais causando a salmonelose. Os ovos são importantes reservatórios de *S. Enteritidis*, pois esta pode colonizar o ovário de galinhas poedeiras, permitindo a contaminação antes da formação da casca, ainda no oviduto do animal. Dessa forma, os ovos armazenados à temperatura ambiente representam potencial fonte de disseminação por conter altas concentrações do microrganismo, até 10^{11} células por ovo (BHUNIA, 2008).

No Brasil, os registros de dados epidemiológicos de toxinfecções de origem alimentar são precários e ineficientes. Porém, mesmo com toda a dificuldade de coleta de notificações que sejam estatisticamente significativas, acredita-se que a incidência de doenças provocadas pelas bactérias do gênero *Samonella* seja elevada entre a população brasileira (DRAEGER, 2018). A série histórica de surtos e doentes por DVAs (Doenças veiculadas por alimentos) no Brasil de 2007 a 2017 revela a estimativa que de 2 em cada 3 (66,4%) dos registros foram declarados como ignorados ou inconclusivos quanto a origem microbiológica do alimento contaminado (BRASIL, 2017). Ou seja, a dificuldade de se identificar o agente causador é um fato que se repete historicamente.

O contato do alimento na fase de processamento industrial com biofilmes de *Salmonella* spp. constitui na forma de contaminação mais comum de superfícies pelo patógeno. Seu estabelecimento gera uma fonte de veiculação em potencial tanto para trabalhadores industriais como para consumidores finais do produto.

2.1.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é uma bactéria que se apresenta na forma de bastonete, Gram-positivo, aeróbio, formadora de esporo e amplamente encontrado na natureza. Este é considerado termodúrico, uma vez que seus esporos são termorresistentes podendo sobreviver aos processamentos térmicos utilizados na indústria de alimentos (GAILLARD; LEGUERINEL; MAFART, 1998; CRONIN; WILKINSON, 2008; AIRES et al., 2009). As células de *B. cereus* apresentam motilidade associada a flagelos peritríqueos e medem cerca de 1,0 a 1,2 μm de largura e 3,0 a 5,0 μm de comprimento (RAJKOWSKI; BENNET, 2003).

Bacillus cereus é comumente veiculado por grande variedade de alimentos processados e *in natura*, (ex. arroz, massas, fórmulas infantis, pimentas, leite, derivados lácteos e alimentos prontos para consumo) (SALVETTI et al., 2011; CHAVES; PIRES; VIVONI, 2011). *B. cereus* e *B. licheniformis* são predominantes encontradas em leite cru e em todas as etapas do processamento dos produtos lácteos (BANYKÓ; VYLETELOVÁ, 2009).

Os mecanismos de adaptação de *B. cereus* às condições ambientais são muito diversos e contribuem para sua sobrevivência e disseminação no ambiente (CARLIN et al., 2010). Sua temperatura ótima de multiplicação varia de 25 a 37 °C, mas já foram identificadas estirpes psicrotóricas e

termodúricas capazes de multiplicar entre 3 e 75 °C (KRAMER; GILBERT, 1989; DROBNIOWSKI, 1993; DUFRENNE et al., 1995).

A combinação das características termodúrica e psicrotrófica em uma espécie microbiana denota o seu grande potencial deteriorante, considerando que este microrganismo pode resistir aos principais tratamentos utilizados na indústria de alimentos e produzir lipases e proteases que irão afetar a qualidade do leite e derivados (MEER et al., 1991; MATTA; PUNJ, 1999). *B. cereus* é capaz de produzir a ampla variedade de substâncias potencialmente patogênicas, como as hemolisinas, fosfolipases, enterotoxinas, metaloproteases, colagenases e beta-lactamases, entre outras (MARTÍNEZ-BLANCH; SÁNCHEZ; AZNAR, 2009).

Bacillus cereus é responsável por dois tipos de doenças de origem alimentar: infecção chamada de síndrome diarreica, provocada por enterotoxinas produzida *in vivo*, ou seja, produzida no intestino do hospedeiro; e a síndrome emética, toxiose atribuída a toxina pré-formada no alimento (DROBNIOWSKI, 1993; AGATA et al., 1995; WIJNANDS; DUFRENNE; VAN LEUSDEN, 2002; ARNESEN; FAGERLUND; GRANUM, 2008; SALVETTI et al., 2011). A síndrome emética é caracterizada por ocorrência de náuseas e vômito, geralmente 2h após do consumo do alimento contaminado (KRAMER; GILBERT, 1989). Os sintomas da síndrome diarreica são manifestados após 12h do consumo do alimento contaminado, os quais incluem náuseas, mal-estar e diarreia.

Doenças associadas a *B. cereus* são subestimadas devido a curta duração e sintomas brandos na maioria dos casos, o que desestimula o paciente a procurar cuidados médicos. Adicionalmente, os casos e surtos nem sempre são associados com *B. cereus*. Os sintomas da síndrome emética são semelhantes aos da toxiose causada por *Staphylococcus aureus* e a síndrome diarreica apresenta os mesmos sintomas que os causados por *Clostridium perfringens* tipo A e acabam sendo tratados como se fossem dessas origens (ARNESEN; FAGERLUND; GRANUM, 2008).

Tal bactéria apresenta capacidade de adesão e de formação de biofilmes em superfícies de equipamentos utilizados em laticínios, sendo dificilmente removido pelos procedimentos de higienização rotineiros (SALUSTIANO et al., 2009). A adesão de esporos em superfícies de tanques de refrigeração dificulta sua remoção pelos procedimentos de higienização, mesmo com uso de água quente e detergente alcalino (SHAHEEN et al., 2010). A capacidade de formação de biofilmes é observada mesmo em temperaturas de refrigeração e seus esporos podem se aderir, germinar e multiplicar na superfície de equipamentos podendo alcançar o produto final, fato que denota contaminação pós-processamento (GIFFEL et al., 1997; BERNARDES, 2008).

As alterações associadas às contaminações de produtos lácteos com *B. cereus* são consideradas importantes sob o ponto de vista tecnológico, uma vez que provocam a redução do prazo de validade e o desenvolvimento de atributos sensoriais indesejáveis (ALMEIDA; SANTOS; CARVALHO, 2000; CHEN; COOLBEAR; DANIEL, 2004; FROOM; BOOR, 2004; REZENDE-LAGO et al., 2007; DE JONGHE et al., 2010).

2.2 Resistência, tolerância e adaptação bacteriana

Bactérias desenvolvem várias estratégias e alternativas para a sobrevivência e adaptação às condições adversas dos ambientes que colonizam, como o estresse sofrido durante o processamento de alimentos. A natureza específica destas condições adversas é dependente das características intrínsecas e extrínsecas do produto, etapas do processamento, presença de conservantes, e detalhes específicos da higienização dos ambientes de processamento de alimentos (VAN DER VEEN; ABEE, 2011).

Anteriormente aos conceitos de tolerância e adaptação bacteriana, faz-se necessário evidenciar o contexto de heterogeneidade na resposta celular ao estresse. Embora em uma cultura bacteriana de crescimento exponencial haja a suposição de homogeneidade, na verdade as células estão crescendo e se dividindo de forma balanceada e não sincronizada. Esta heterogeneidade no fenótipo expresso pode tornar-se vital quando as células são desafiadas pela condição de estresse, ou seja, muitas células dentro da população podem morrer, mas pequena proporção sobrevive porque suas condições fisiológicas exatas no momento da exposição se enquadram para sobrevivência. Em um outro cenário, nova população mostrará o mesmo nível de perda que com a primeira exposição se desafiada com o mesmo estresse (BOOTH, 2002).

Durante os processos de sanificação das linhas de produção e superfícies de manipulação de alimentos, os microrganismos podem ser expostos a concentrações subletais ou subinibitórias de sanitizantes, induzindo a resposta ao estresse. Uma das respostas mais comuns que bactérias utilizam para adaptarem-se a esses ambientes hostis é a resposta SOS (ERILL; CAMPOY; BARBÉ, 2007).

Nas indústrias de alimentos, são utilizados vários tratamentos de atividade bactericida que promovem dano ao DNA, seja de superfície como radiação ultravioleta (UV) ou agentes sanitizantes com compostos oxidantes. A ativação da resposta SOS pode proporcionar uma condição de proteção e adaptação cruzada às cepas que sobreviveram a tais tratamentos. Uma relação de resposta SOS mediada por estímulo foi estabelecida por *Salmonella* Typhimurium em ambiente do trato gastrointestinal humano, onde observou-se a aquisição de resistência ao dano oxidativo a estrutura do DNA bacteriano por sais biliares (PRIETO; RAMOS-MORALES; CASADESÚS, 2006).

Segundo Brauner et al. (2016), o termo “tolerância” a agentes antimicrobianos está associada à falha do tratamento com antibióticos e à recaída de muitas infecções bacterianas. No entanto, ao contrário do termo “resistência”, que é comumente medida utilizando a específica de concentração inibidora mínima (MIC), a tolerância é mal caracterizada, devido à falta de um indicador quantitativo semelhante. Isso pode levar à má classificação de cepas tolerantes como resistentes, ou vice-versa, e resultar em tratamentos ineficazes.

De fato, a resistência das bactérias aos antimicrobianos é oriunda de mecanismos ligados à espécie bacteriana e ao estado fisiológico, sejam herdados e não herdados (LEVIN; ROZEN, 2006). Estudos demonstram que determinados sanitizantes contribuem para o surgimento de microrganismos resistentes por pressão seletiva após exposição regular (LANGSRUD et al., 2003). Bactérias de mesmo

gênero e espécie podem apresentar diferentes graus de sensibilidade ao mesmo agente desinfetante. Além disso, sanitizantes com formulações químicas similares, porém não idênticas, têm eficácia diferenciada contra as mesmas bactérias (SANDER et al., 2002). Assim, é possível que a resistência dos microrganismos em biofilme a sanitizantes também possa ser consequência da exposição prolongada a doses subletais destes compostos (DAVIDSON; HARRISON, 2002).

Apesar da base da resistência bacteriana a antibióticos ser bastante conhecida, a resistência a sanitizantes e antimicrobianos naturais de alimentos, como óleos essenciais e seus componentes, ainda é pouco estudada. Os mecanismos bioquímicos exatos de adaptação e de resistência permanecem largamente desconhecidos (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; DAMBOLENA et al., 2017).

A resistência antimicrobiana é definida como a tolerância de microrganismos a determinado agente antimicrobiano contra o qual foram originalmente sensíveis. Esta questão tornou-se preocupação global, relatada pela primeira vez em 1940, e é preocupação crescente. Atualmente, grande número de antimicrobianos tornaram-se ineficazes contra organismos previamente susceptíveis. Este é o enorme desafio para os gestores de saúde em todo o mundo, agravado pela “falta de descoberta” de novos antibióticos (JINDAL; PANDYA; KHAN, 2015). A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) destacou que o uso excessivo de antibióticos no setor agropecuário tem provocado o aumento da tolerância dos microrganismos, os quais as drogas deveriam eliminar (MUHAMMAD et al., 2020).

O fenômeno de resistência cruzada pode ocorrer quando diferentes agentes antimicrobianos têm o mesmo alvo na célula, atingem rota comum de acesso aos respectivos alvos ou iniciam uma via comum para a morte celular, ou seja, o mecanismo de resistência é o mesmo para mais de um agente antibacteriano (CHAPMAN, 2003).

Evidências moleculares e fisiológicas apontam que bactérias causadoras de toxinfecções alimentares podem suportar e, ou adaptarem-se aos estresses subletais e, como consequência, tornarem-se resistentes em níveis anteriormente letais do agente estressante ou exibir proteção cruzada contra outros (LANDAU; SHAPIRA, 2012). Desta forma, extensa e minuciosa análise do estado metabólico das amostras celulares destaca-se como ferramenta capaz de identificar e quantificar os compostos presentes na população bacteriana.

A produção de alimentos em escala industrial, contribuiu para a diminuição da susceptibilidade dos microrganismos, facilitando o aparecimento e a disseminação de fatores de resistência através do uso intensivo de agentes antimicrobianos, sanitizantes e do comércio internacional de animais e de produtos alimentícios, cuja principal rota de transmissão entre animais e seres humanos ocorre por produtos alimentares, embora outras formas de transmissão, como contato direto e ambiente, também possam ocorrer (AARESTRUP; WEGENER; COLLIGNON, 2008).

2.2.1 Estresse subletal

Sanitizantes a base de ácidos e álcalis inorgânicas (por exemplo, ácido peracético e quaternário de amônio) são conhecidos por serem ineficientes após o uso contínuo e prolongado (KUMAR; MICALLEF, 2017) e a adaptação ao sanitizante pode levar ao aumento da tolerância a outros agentes similares (BUZÓN-DURÁN et al., 2017).

O uso inadequado de agentes antimicrobianos na indústria alimentícia (ex: alternância imprudente de sanitizantes) contribuiu para o surgimento de microrganismos tolerantes, o que compromete a segurança dos produtos alimentares (ONICIUC et al., 2019). Atualmente, um grande número de antimicrobianos tornaram-se ineficazes contra microrganismos previamente suscetíveis (MICHAEL; DOMINEY-HOWES; LABBATE, 2014). Neste âmbito, a busca por alternativas que não prejudicam a saúde da população tem levado ao uso de produtos naturais, especialmente os obtidos a partir de extratos de plantas (AMUKA et al., 2017).

Quando uma população de células de *Salmonella* é exposta ao estresse subletal, como tratamento térmico moderado (56 °C), congelamento seguido de degelo, choque osmótico ou químico, uma proporção das células morrem, mas algumas podem ser recuperadas no meio de crescimento. A proporção das células que podem ser recuperadas depende de uma série de fatores, incluindo o nível de estresse imposto, a natureza das condições de recuperação e a fase de crescimento em que as células se encontravam quando o estresse foi imposto. Em particular, as células da fase estacionária apresentam maior tolerância ao estresse do que aquelas em fase de crescimento exponencial. Tal resposta é vista em bactérias anaeróbias facultativas, como *E. coli*, mas não em anaeróbios estritos, como em *Streptococcus mutans*, ou ainda pode se manifestar em forma de resistência reduzida na fase estacionária como ocorre em *Campylobacter jejuni* (KELLY et al., 2001).

A resposta SOS foi apontada como componente ativo na indução da resistência a fatores estressantes às bactérias após a exposição a tais agentes e esta indução possivelmente geraria diversidade genética que resultaria em subpopulações resistentes a este estresse (VAN DER VEEN; ABEE, 2011). É constituída, de forma geral, em proteínas envolvidas no reparo de DNA, tais como exonucleases, helicases e recombinases, ou proteínas envolvidas na síntese de DNA, como DNA polimerases.

2.2.2 Adaptação cruzada

Um crescente interesse na compreensão dos mecanismos envolvidos na adaptação de células microbianas a condições ambientais tem sido enfatizado (DI PASQUA et al., 2006). Isso se deve a preocupação do aumento da resistência bacteriana na área clínica e farmacêutica, e nos ambientes de processamento de alimentos. É notório que a exposição subletal a condições ambientais e/ou substâncias antimicrobianas pode resultar no desenvolvimento de adaptação e da promoção da adaptação cruzada para compostos antimicrobianos (RUSSELL, 1984; YUK; MARSHALL, 2004).

Adaptação cruzada ocorre quando o mecanismo de resposta ao estresse é o mesmo para diversos agentes bacterianos, ou seja, diferentes agentes antimicrobianos atacam o mesmo alvo na célula, atingindo uma via comum para a morte celular, ou compartilham uma rota comum de acesso aos seus respectivos alvos (CHAPMAN, 2003). O estresse subletal induz o desenvolvimento e crescimento do microrganismo condicionado ao estresse, tornando-o fisiologicamente mais tolerante a níveis aumentados do mesmo ou proteção cruzada a outros estressores (HWANG et al., 2014; SMIGIC et al., 2009).

A resistência antimicrobiana representa risco direto à segurança alimentar sendo o uso prudente em humanos e a monitorização de antibióticos em animais e em todos os setores são aspecto chave para sua prevenção e controle. Novas medidas no controle de microrganismos devem ser tomadas, com o intuito de encontrar biocidas com amplo espectro de ação. Desde a antiguidade as plantas e seus extratos tais como os óleos essenciais, tem sido utilizadas na medicina popular. Os óleos essenciais demonstram ser uma alternativa no controle de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes uma vez que sua ação antimicrobiana tem sido comprovada por diversos trabalhos (MIRANDA et al., 2016; DIAS et al., 2015; NAZZARO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012).

2.3 Antimicrobianos naturais

A sanificação dos ambientes de indústrias alimentares tem importante papel na manutenção da qualidade e no aumento da vida útil dos produtos. A escolha e a aplicação adequada do sanificante para a prevenção de formas vegetativas, biofilmes e esporos bacterianos são fundamentais para a indústria de alimentos (SANTOS, 2003). Em razão da eficácia restrita na redução de contaminantes, sanificantes alternativos, como ácidos orgânicos, podem ser efetivos em inibir o crescimento de bactérias (SALIM et al., 2018).

A busca por tratamentos alternativos seja devido às possíveis restrições quanto à utilização de sanitizantes convencionais, seja pela crescente demanda por produtos livres de aditivos químicos, têm conduzido à avaliação de diversos agentes antimicrobianos, dentre os quais pode-se destacar os ácidos orgânicos e os antimicrobianos naturais como os óleos essenciais provenientes de plantas (HEREDIA et al., 2018).

O ácido cinâmico, ou cinamaldeído, é um ácido graxo α,β -insaturado aromático presente de forma natural em muitas plantas, além da canela e cravo, pimenta preta, cilantro, ameixas secas entre outras. Sua atividade antimicrobiana tem sido demonstrada por vários pesquisadores desde meados da década de 1980 (SALMOND; KROLL; BOOTH, 1984; RAMOS-NINO; CLIFFORD; ADAMS, 1996; KOUASSI; SHELEF, 1998; CHAMBEL; VIEGAS; SÁ-CORREIA, 1999; ROLLER; SEEDHAR, 2002).

Neste contexto, a busca por novos agentes antimicrobianos levou as pesquisas a convergirem para a combinação de substâncias conhecidamente eficazes, como as bacteriocinas (ex: nisisna), com

compostos alternativos produzidos por plantas condimentares. Todavia, mesmo combinações de potencial antimicrobiano reconhecido, microrganismos se comportam de maneira semelhante quando expostos a concentrações subletais de quaisquer agentes estressores tornando-se metabolicamente resiliente.

Devido à alta ocorrência de tolerância microbiológica a antibióticos e desinfetantes convencionais, o emprego de óleos essenciais e derivados para a conservação de alimentos e segurança industrial vem sendo muito estudado. Tal fato propicia o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de substâncias oxidantes, espécies reativas de oxigênio e microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias alimentícias (ANDRADE, 2012).

2.3.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de plantas medicinais, aromáticas e condimentares surgem como alternativa aos sanitizantes químicos comumente utilizados no setor alimentício devido às suas conhecidas propriedades antimicrobianas. Seu uso como bioconservante é de grande importância principalmente na indústria de alimentos visto que os consumidores preferem aditivos naturais ao invés de sintéticos (LANG; BUCHBAUER, 2012).

Os óleos essenciais são misturas naturais complexas constituídas por 20 a 60 componentes presentes em diferentes concentrações. Geralmente, os componentes predominantes, denominados majoritários, determinam que suas propriedades biológicas sejam atribuídas a mais de um mecanismo específico e que o efeito ocorra em vários sítios celulares (SESSOU; FAROUGOU; SOHOUNHLOUÉ, 2012). Entretanto, os componentes presentes em menores concentrações ou traços podem atuar de forma sinérgica com os majoritários aumentando a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008)

Também chamados de óleos voláteis ou etéreos, por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente, são oriundos do metabolismo secundário das plantas encontrados em folhas, flores, sementes, caule e raiz (SIMÕES; SPITZER, 2004). Todos os órgãos de uma planta são capazes de sintetizar óleos essenciais, porém sua composição pode variar segundo a localização, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (OUSSALAH et al., 2007).

Os óleos essenciais são misturas de várias substâncias químicas como: terpenos, terpenoides, fenilpropanoides e outros compostos, todos caracterizados pelo seu baixo peso molecular (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). O principal componente dos óleos essenciais pode constituir até 85 %, e os outros componentes encontram-se geralmente em níveis traço (GROSSO et al., 2008). Na atualidade é conhecida uma ampla variedade de óleos essenciais de origem vegetal, extraídos de diferentes partes das plantas, podendo ser obtidos por fermentação, extração ou destilação sendo o último método o mais utilizado comercialmente (FERRENTINO et al., 2019).

A maioria dos óleos essenciais é considerada como substâncias GRAS, portanto, sua utilização na indústria de alimentos é permitida (FDA, 2020). São aplicados principalmente como aromatizantes tanto os óleos essenciais como seus componentes (BURT, 2004), e em menor grau como conservantes devido ao forte sabor e odor (LAMBERT et al., 2001). A ISO (International Standard Organization) define óleos essenciais como os subprodutos vegetais obtidos mediante extração pelo método de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por processamento dos pericarpos carnosos de frutos.

Os terpenos ou isoprenóides é a classe de metabólitos secundários oriundos de produtos naturais, originados a partir da via do mevalonato. Sua biossíntese ocorre inicialmente com unidades C₅, como difosfato isopentenil (IPP) ou difosfato de dimetilalilo (DMAPP), e formados tipicamente por condensação (OLDFIELD; LIN, 2012; VIRIATO, 2014; RATHORE et al., 2015).

Terpenos apresentam variadas atividades biológicas: antibacteriana, antifúngica antiparasitária, anti-inflamatória e hipotensora (VIRIATO, 2014; RATHORE et al., 2015). Assim como os fenilpropanoides, os mecanismos de ação antimicrobiana dos monoterpenos causam granulação citoplasmática, ruptura da membrana, e inativação e/ou inibição da síntese de enzimas intra e extracelulares. Quando alteram a permeabilidade celular, os terpenos penetram entre as cadeias de ácidos graxos presente na membrana citoplasmática, destroem a barreira lipídica, modificam a fluidez da membrana, e causam o extravasamento do conteúdo citoplasmático levando à morte (MAREI; RASOUL; ABDELGALEIL, 2012).

Os terpenoides são encontrados com maior frequência e compreendem todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (2-metil-1,3-butadieno) e são sintetizadas pela via do mevalonato. Os compostos terpênicos comumente encontrados em óleos essenciais são os monoterpenos (cadeia de dez carbonos), mais identificadas nos óleos essenciais (90%), e os sesquiterpenos (cadeia de quinze carbonos), formados por duas e três unidades de isopreno respectivamente. A origem dos metabólitos secundários ocorre a partir da via glicolítica por dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (SANTOS, 2004).

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais se dá por diversos modos, devido à grande variedade de componentes presentes em sua constituição. Contudo é consenso que o principal alvo na célula microbiana é a membrana citoplasmática (Nazzaro et al, 2013).

A permeabilidade da membrana da célula bacteriana é influenciada pela sua composição e da hidrofobicidade dos compostos que a atravessam. Em razão do caráter hidrofóbico dos óleos essenciais, a ação desses compostos provoca danos estruturais e funcionais à membrana plasmática das células bacterianas (BURT, 2004; SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994; BAKKALI et al., 2008) alterando sua estrutura e fluidez (PASQUA et al., 2007), e como consequência há dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do *pool* de ATP, desordem do pH interno e do potencial elétrico e perda de metabólitos e íons, como os de potássio e fosfato (LAMBERT et al., 2001; BAKKALI et al., 2008).

A hidrofobicidade dos terpenos fenólicos facilita sua ação sobre as membranas celulares, mas apenas isso não confere toxicidade. A presença de grupos hidroxilas na estrutura do terpeno, auxilia no potencial antimicrobiano, uma vez que podem facilitar a dissociação do H⁺, e desse modo, permitir a passagem dos prótons e de cátions monovalentes através da membrana, diminuindo o pH e alterando o gradiente de cátions. Isso altera a permeabilidade celular, através da abertura de canais, levando a uma rápida desestabilização membranar (RAO et al., 2010).

2.3.1.1 *Cinnamomum cassia*

A espécie *Cinnamomum cassia* é uma planta aromática, medicinal pertencente à família Lauraceae, conhecida no Brasil como canela, canela-da-china, cassia ou cassia-da-china. O emprego medicinal do vegetal é principalmente no tratamento de gastrite, distúrbios da circulação e doenças inflamatórias. *C. cassia* é considerada uma das especiarias mais antigas e utilizadas no mundo em alimentos, bebidas e cosméticos (OLIVEIRA, 2011). A parte da planta de onde é mais comumente extraído o óleo essencial é seu caule, que pode ser encontrada em cascas, pequenos pedaços ou em pó (KWON; YU; PARK, 2003).

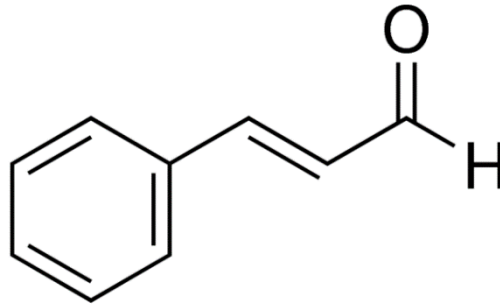
O óleo essencial de canela apresenta diferenças em sua composição quando obtidos em regiões distintas da planta. Quando obtido da casca, observa-se prevalência do composto aldeído cinâmico (ou cinamaldeído) seguido do eugenol com porcentagens de 55% e 12% respectivamente, e quando obtido de folhas da canela, encontra-se o eugenol (94%) como componente majoritário e traços de aldeído cinâmico (1%) (KOKETSU et al., 1997). O óleo obtido da casca é utilizado na aromatização de alimentos, ao passo que o das folhas, na cosmética e na aromaterapia (GROSSMAN, 2005). Unlu et al. (2010) obtiveram como composto majoritário (E)-cinamaldeído (68.95%) identificado em óleo de casca de *C. zeylanicum* originária da Turquia.

A atividade antibacteriana de *C. cassia*, é comprovada tanto do óleo essencial quanto do componente majoritário. Estudos demonstram que óleo essencial de *C. cassia*, bem como o cinamaldeído são igualmente efetivos na inibição do crescimento de *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella*. Typhimurium (OOI et al., 2006), sendo o cinamaldeído capaz de inibir a divisão celular quando testado contra *B. cereus* (KWON; YU; PARK, 2003), e de promover inibição do metabolismo energético de *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus sakei* quando expostas a concentrações bactericidas de cinamaldeído (GILL; HOLLEY, 2004).

O trans-cinamaldeído conhecido também como cinamaldeído é uma substância química, presente como componente principal nos óleos a base de canela (FRIEDMAN; KOZUKUE; HARDEN, 2000) (Figura 1). Caracteriza-se por ser um líquido amarelo, oleoso, com um forte cheiro de canela, doce, solúvel em éter e clorofórmio, miscível em álcool e óleos (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, 2004), e tem um ponto de ebulição de 250°C (SIGMA-ALDRICH, 2020). Esta

substância está aprovada pela FDA para uso em alimentos como aromatizante sintético sendo considerado como aditivo GRAS (FDA, 2020).

Figura 1 - Estrutura química do componente majoritário trans-cinamaldeído.



Fonte: Sigma-Aldrich (2020).

Pesquisas realizadas demonstraram que o trans-cinamaldeído possui característica antimicrobiana contra uma ampla gama de patógenos transmitidos por alimentos, sejam Gram-positivos, como: *S. aureus*, *Clostridium* ssp., *Enterococcus* ssp., *Streptococcus* ssp. (FERRO et al., 2016; ROSHAN; RILEY; HAMMER, 2017; RIBEIRO et al., 2018); ou Gram-negativos, como: *Acinetobacter baumannii*, *S. enterica*, *E. coli*, *P. aeruginosa* (NARAYANAN et al., 2017; KARUMATHIL et al., 2018; SILVA et al., 2018; FERRO et al., 2019).

O trans-cinamaldeído tem modo de ação de pelo menos três mecanismos celulares: em baixas concentrações, o trans-cinamaldeído atua na citocinese pela inibição de enzimas ou em outras funções celulares; em concentrações letais ele altera estruturalmente a membrana celular; e em concentrações subletais, atua como um inibidor de ATPase (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Desta forma, o trans-cinamaldeído provoca a redução do ATP intracelular pela atividade de ATPase sem alteração significativa da membrana celular, como observado em estudos com contra *E. coli* e *L. monocytogenes* (GILL; HOLLEY, 2006; RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2007). Portanto, concentrações letais de trans-cinamaldeído causam ruptura da membrana celular suficiente para dispersar a força motriz de prótons por vazamento de pequenos íons, todavia, sem fuga de componente celular grandes, como ATP (GILL; HOLLEY, 2004).

Os mecanismos de ação relatados para cinamaldeído contra bactérias são continuamente revisados (SHREAZ et al., 2016; FRIEDMAN, 2017). Jia et al. (2011) ressaltam que o poder de penetração celular do cinamaldeído é devido a sua hidrofobicidade, característica importante que provoca um distúrbio na bicamada lipídica, causando um aumento da permeabilidade dos prótons, e consequente desestabilidade e morte celular. Recentemente, a ação antimicrobiana do cinamaldeído também foi atribuída a proteínas ligadas a inibição da divisão celular, como a FtsZ (do inglês, *filamentation temperature sensitive protein Z*) (LI et al., 2015).

Novas tecnologias para controle de patógenos bacterianos em ambiente de indústrias alimentares utilizam de combinação de compostos majoritários para equiparar ou superar a eficiência de sanitizantes químicos, bem como diminuir a ocorrência de adaptação por tolerância a concentrações subletais de agentes antimicrobianos. Assim, é de grande relevância a investigação da ação antimicrobiana de compostos naturais, e produtos derivados, para a prevenção de adaptação cruzada entre populações bacterianas.

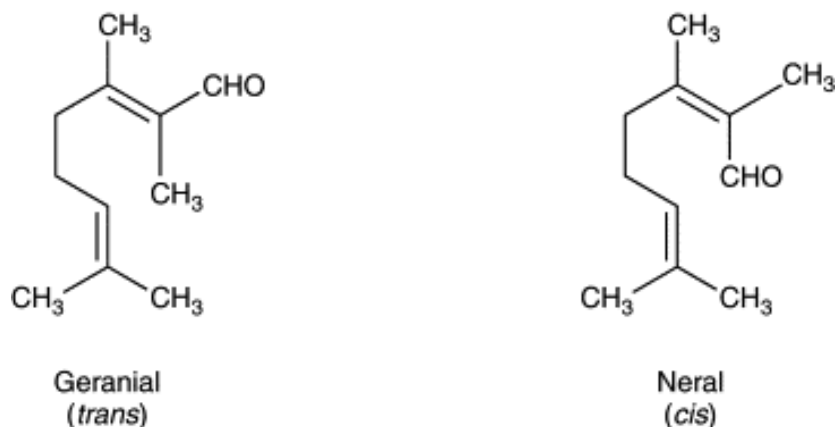
2.3.1.2 *Cymbopogon citratus*

Cymbopogon citratus, popularmente conhecido no Brasil como capim-limão, ou também como erva-cidreira, capim-cidreira capim-cheiroso e capim-cidrão, é uma espécie vegetal pertencente à família das Poáceas. Herbáceo, perene e rasteiro, o capim-limão não forma caule e exibe folhas longas recobertas por camada fina de cera. (CASTRO; RAMOS, 2003). No Brasil, é comum o consumo da infusão de suas folhas por apresentarem propriedades diuréticas, sedativas, antipiréticas e anti-reumáticas (FIGUEIREDO; DELACHIAVE; MING, 2002).

O citral é constituinte majoritário do óleo de capim-limão sendo o responsável por muitas atividades de interesse econômico, tais como antimicrobianas, repelentes de insetos, entre outras aplicações na indústria farmacêutica. Além do citral, a composição química do óleo de capim-limão apresenta vários aldeídos, como o citronelal, isovaleraldeído e decilaldeído; bem como cetonas e álcoois como o geraniol, nerol e farnesol (COSTA et al., 2005; PEREIRA et al., 2006).

O citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) é um dos monoterpenos mais amplamente estudados. O citral difere isomericamente em duas formas (Figura 2): geranial ((2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal, citral A ou isômero E) e neral ((2Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal, citral B ou isômero Z) (EL FATTAH et al., 1992). Iijima et al. (2006) propõe uma rota bioquímica para a formação do citral a partir do geraniol difosfato (GPP), onde este sofre reação catalisada pela geraniol sintase (GES), sendo convertido em geraniol. O geraniol é, então, oxidado pela ação da geraniol desidrogenase (GEDH1) originando o geranial, e que por meio de uma tautomerização ceto-enólica, que facilita a rotação da ligação entre os carbonos dois e três, o geranial que possui a configuração E é convertido em neral configuração Z.

Figura 2 - Formas isoméricas do citral Geranial e Neral.



Fonte: Sigma-Aldrich (2020).

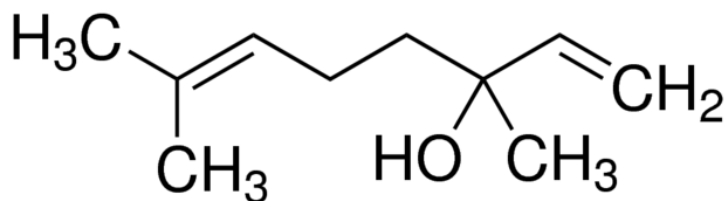
Está presente em muitos óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas, sendo seu aroma cítrico conferido pelo geranial, enquanto que o sabor de limão, pelo neral. Devido a estas características é utilizado em produtos farmacêuticos, alimentícios e cosméticos (LEITE et al., 2014; MIRON et al., 2014). Foi observado que possui melhor atividade antimicrobiana em pH alcalino e pode ser utilizado em combinação com outros agentes, apresentando ação sinérgica (FERREIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2016).

2.3.1.3 *Ocimum basilicum* L.

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.), pertencente à família Lamiaceae, faz parte de um grupo de plantas medicinais e aromáticas de grande valor econômico, muito utilizado para diversos fins: ornamental, condimentar, medicinal, aromático, na indústria de perfumaria e de cosméticos. Trata-se de espécie herbácea, fortemente aromática, que pode ser anual ou perene conforme o local de plantio. A qualidade da planta de manjericão é definida pela composição de seu óleo essencial (CARVALHO FILHO et al., 2006).

Na medicina, o óleo essencial de manjericão possui potencial comprovado como sedativo (SUGAWARA et al., 1998), anticonvulsivo (ELISABETSKY; BRUM; SOUZA, 1999) e antinociceptivo (VENÂNCIO, 2006). Dentre os diferentes constituintes do óleo essencial de manjericão os linalol (Figura 3) e o eugenol destacam-se como os componentes majoritários.

Figura 3 - Estrutura química do componente majoritário linalol.



Fonte: Sigma-Aldrich (2020).

O linalol, 3,7- dimetilocta-1,6-dien-3-ol, é um monoterpene alcoólico terciário de cadeia aberta encontrado em várias espécies de plantas aromáticas como o manjeriço (*Ocimum basilicum*) (ZHELJAZKOV; CALLAHAN; CANTRELL, 2008). O linalol é um líquido incolor ao amarelo pálido que é comercializado como ingrediente de muitos produtos cosméticos como shampoos, perfumes, sabonetes dentre outros. É também utilizado em produtos de limpeza como detergentes (LETIZIA et al., 2003). Efeitos letais sobre diversos organismos como acaros (PRATES et al., 1998), e microrganismos como bactérias, fungus (BELAICHE; TANTAOUI-ELARAKI; IBRAHIMY, 1995) e giardia (ALMEIDA et al., 2007) são observados. .

Tal composto majoritário é um constituinte químico de grande valor no mercado de cosméticos e perfumaria além de seu efeito bactericida há tempos ter sido descrito como promissor (PEREIRA et al., 2018). Mazzanti, Battinelli e Salvatore (1998) utilizaram óleos essenciais de *Hyssopus officinalis* L. variação decumbens, com alto teor de linalol (51.7%) em testes de inibição microbiológica e detectaram doses diminutas necessárias para a inibição de bactérias Gram-positivas e negativas.

2.3.2 Bacteriocinas

A utilização de peptídeos antimicrobianos apresenta grande potencial para o controle de biofilmes na indústria de alimentos e visa aumentar a vida útil e a inocuidade de alimentos. Diversos são os peptídeos que apresentam atividade antimicrobiana, podendo ser obtidos de degradação de proteínas presentes em alimentos ou sintetizados por bactérias, que são denominadas de bacteriocinas.

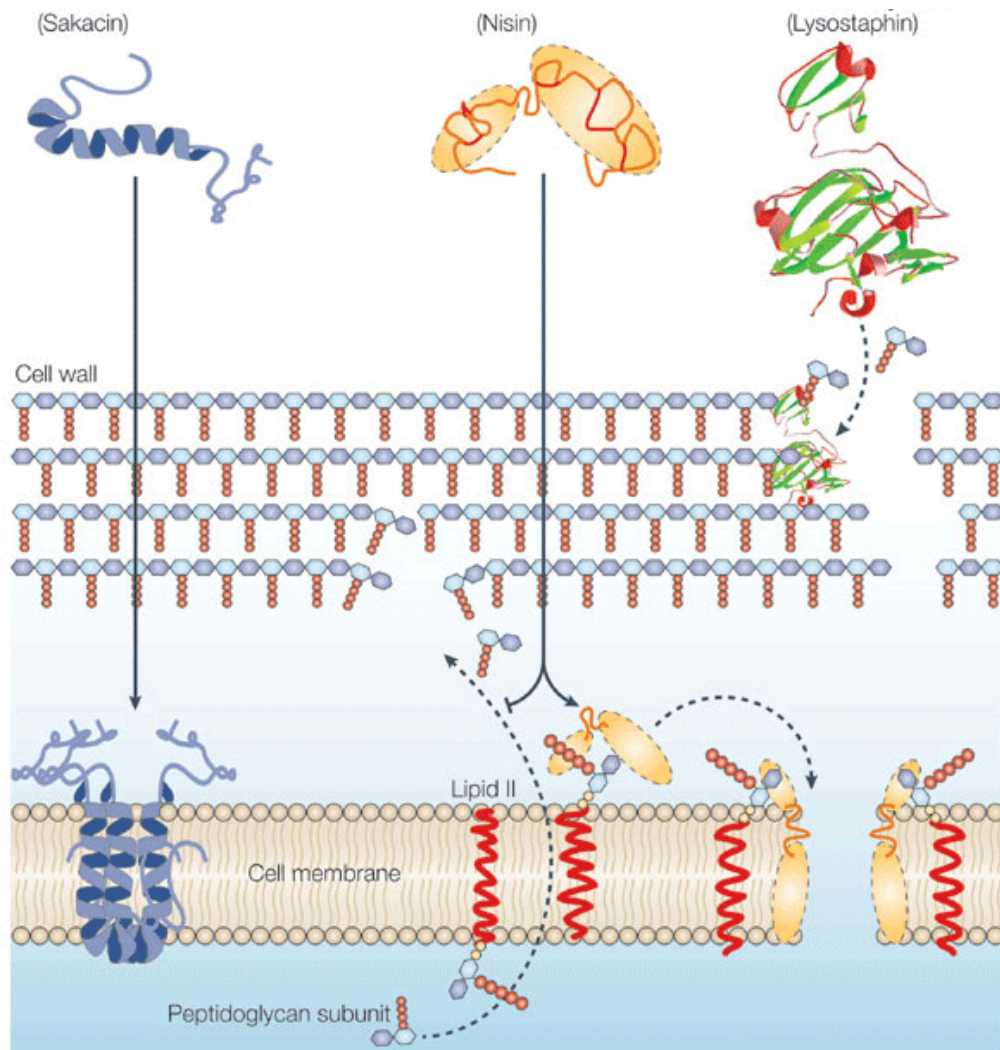
Bacteriocinas são um grupo heterogêneo de peptídeos ou proteínas, sintetizadas ribossomicamente, que apresentam ação comprovada contra diversos microrganismos (GÁLVEZ; LOPEZ; ABRIOUEL, 2008; TODOROV; FRANCO; VAZ-VELHO, 2009). Vários autores têm pesquisado o potencial antimicrobiano das bacteriocinas em alimentos, demonstrando sua ação contra microorganismos patogênicos e deteriorantes em carne e produtos cárneos (LISERRE, et al., 2002; KRUGER, 2006; BELLO et al., 2010; KOUAKOU et al., 2010). As bacteriocinas diferem dos antibióticos principalmente quanto à síntese, ao espectro e modo de ação, à toxicidade e aos mecanismos de resistência (TODOROV et al., 2010).

As bacteriocinas agem sobre as células sensíveis pela formação de poros na membrana celular (Figura 4), com a interferência na força próton motriz (FPM), no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e no gradiente de pH (ΔpH), resultando no efluxo dos constituintes celulares e privando a célula de sua fonte essencial de energia (AMMOR; MAYO, 2007; ARAUZ et al., 2009). A FPM controla a síntese de ATP e o acúmulo de íons e outros metabólitos no interior das células, e com o seu colapso ocorre a paralisação de todas as reações que requerem energia, levando à morte celular. Essas alterações ocorrem em dois estágios. O primeiro consiste na adsorção da bacteriocina à membrana celular, o que não provoca alterações permanentes à célula, uma vez que a adsorção é reversível. No segundo estágio, a bacteriocina penetra a membrana celular causando alterações letais irreversíveis à célula (ARAUZ et al., 2009).

Por serem moléculas carregadas positivamente com regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, as interações eletrostáticas com grupamentos fosfato negativamente carregados contribuem para a ligação inicial das bacteriocinas com a membrana das células sensíveis resultando na penetração da porção hidrofóbica na membrana formando poros (CHATTERJEE et al., 2005; ARAUZ et al., 2009; ASADUZZAMAN; SONOMOTO, 2009). Porém, a atividade destes compostos está relacionada apenas a bactérias Gram-positivas. As bactérias Gram-negativas possuem uma camada externa composta por fosfolipídios, proteínas e lipopolissacarídeos que é impermeável à maioria das moléculas e não admite o acesso de partículas com tamanho superior a 600Da (a menor bacteriocina conhecida possui 3 kDa).

Entretanto, a presença de outros compostos que alteram a estrutura da membrana externa de microrganismos Gram-negativos pode permitir a entrada de moléculas maiores, o que seria uma alternativa para a utilização de bacteriocinas no controle da multiplicação destas bactérias (DIEP; NES, 2002, ARAUZ et al., 2009). As diferentes bacteriocinas apresentam variações no espectro de atividade, modo de ação, peso molecular, origem genética e propriedades bioquímicas e entre todas estas bacteriocinas apenas a nisina é atualmente aplicada na conservação de alimentos (CASTELANO et al., 2008; ARAUZ et al., 2009), sendo regulamentada no Brasil pela ANVISA para utilização em queijos e produtos industrializados cozidos (ANVISA, 2013).

Figura 4 - Modo de ação de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas.



Fonte: Cotter; Hill; Ross (2005).

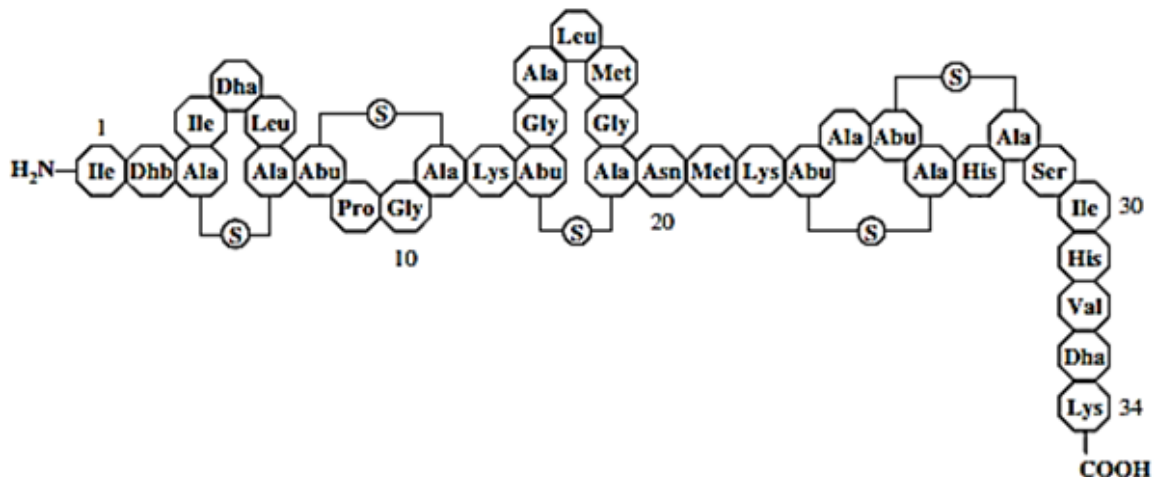
2.3.2.1 Nisina

Nisina é um polipeptídeo de baixo peso molecular produzido pela cultura *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. A descoberta deste composto ocorreu no fim da década de 1920 e sua utilização como conservante alimentício é reconhecida há mais de 60 anos (MCCLINTOCK et al., 1952). A caracterização da molécula foi conduzida pela primeira vez por Mattick e Hirsch (1947), que cunhou seu nome a partir do termo “substância inibitória N”. Naquela época, o microrganismo produtor foi classificado por Lancefield como grupo serológico *Streptococcus* N. A nisina tornou-se um conservante de alimentos amplamente utilizado porque tem um espectro muito mais amplo do que a maioria das outras bacteriocinas e pode manter ou até mesmo prolongar a vida útil dos alimentos tratados com calor, o que contribui de forma crucial para a sua segurança.

A estrutura da nisina é determinada por seus anéis tioéter internos, o que a torna flexível e tridimensional. Ela pode formar dímeros ou até mesmo oligômeros. Gross e Morell (1971) foram os

primeiros pesquisadores que elucidaram a estrutura incomum da nisina, que é um polipeptídeo de 34 aminoácidos com uma massa molecular de 3510 Daltons. É classificada como uma bacteriocina de classe I, onde as moléculas caracterizadas por seus aminoácidos incomuns. A nisina contém os aminoácidos lantionina (Ala-S-Ala) e β -metillantionina (Abu-S-Ala), bem como ácido amino-butírico (Abu), deidroalanina (Dha), e deidrobutirino (Dhb; também conhecido como β -metilaldeídoalanina) (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática da estrutura da nisina.



Fonte: Cheigh; Pyun (2005).

A carga resultante de nisina é dependente de pH e possui caráter anfipático; o terminal-N contém vários resíduos hidrofóbicos, enquanto o terminal-C é mais hidrofílico. A nisina tem se mostrado ter atividade emulsionante em um estudo comparativo com o Tween 80 (um emulsionante alimentar não-iônico comum) e β -caseína (um estabilizador de emulsão alimentar), mas esta atividade era altamente dependente da concentração de pH e nisina (BANI-JABER et al., 2000). O grau de associação da nisina com a membrana é altamente dependente do tipo de lipídeos presentes e principalmente da carga destes lipídeos. Como molécula catiônica, a nisina é mais ativa na presença de moléculas carregadas negativamente na membrana citoplasmática (MCAULIFFE; ROSS; HILL, 2001; AASEN et al., 2003; TODOROV; FRANCO; VAZ-VELHO, 2009).

A nisina é um aditivo alimentar que possui histórico de uso bem sucedido como conservante de alimentos, excelente registro de segurança, e atividade antimicrobiana de amplo espectro. Além disso, os testes de toxicidade que comprovam sua segurança para o consumo humano são reconhecidos desde 1962 (FRASER; SHARRATT; HICKMAN, 1962).

A nisina foi aprovada para uso em alimentos em 1969 pela Organização Conjunta de Alimentos e Agricultura / Organização Mundial da Saúde (FAO / OMS) e pelo “Committee on Food Additives”

foi considerado como seguro (GRAS) nos Estados Unidos em 1988 (FDA, 1988). Desde então, continua a ser a única bacteriocina permitida nos alimentos como conservante.

O efeito antimicrobiano da nisina possui ação predominantemente sobre bactérias Gram-positivas, como *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. e também inibindo células vegetativas ou esporos de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. Apesar de não haver atividade reconhecidamente comprovada contra Gram-negativos, fungos e leveduras, sabe-se que seu uso em combinação com agentes que modifiquem a permeabilidade da membrana externa pode representar potencial de utilização da nisina contra bactérias Gram-negativas (PRANOTO; RAKSHIT; SALOKHE, 2005; SAMELIS et al., 2005; ARAUZ et al., 2009; ASADUZZAMAN; SONOMOTO, 2009).

A ação antimicrobiana da nisina é influenciada por sua concentração e pela quantidade de população bacteriana alvo. O efeito antibacteriano é decorrente de suas interações com os fosfolípidios que compõem a membrana citoplasmática atuando como agente despolarizador, através de um modelo potencial-dependente. Tal fenômeno provoca a formação de poros por onde ocorre o efluxo de constituintes citoplasmáticos de baixo peso molecular como ATP, íons de potássio e aminoácidos (ASADUZZAMAN; SONOMOTO, 2009; TODOROV; FRANCO; VAZ-VELHO, 2009).

Portanto, a aplicação prática da nisina tem sido bastante explorada pela indústria de alimentos devido à sua resistência a temperaturas elevadas e pH ácido, além da capacidade de impedir a germinação de esporos bacterianos (ARAUZ et al., 2009). Este último fator é de extrema importância para sua aplicação em alimentos, uma vez que um teor residual suficiente de nisina deve ser mantido durante toda a vida útil do produto para que se tenha a manutenção da conservação (DELVES-BROUGHTON; GASSON, 1994).

2.4 Metabolômica microbiana

A grande área de estudo da metabolômica aborda a determinação e quantificação simultânea de compostos metabólicos produzidos e modificados por organismos vivos incluindo peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis, alcalóides e minerais (JEWETT; HOFMANN; NIELSEN, 2006; WISHART, 2008). Desta forma, vem sendo aplicada na área da Ciência dos Alimentos pelo monitoramento da qualidade, da segurança e de análises microbiológicas tanto da matéria-prima quanto do produto final (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009).

As análises metabolômicas têm sido amplamente utilizadas na pesquisa básica e aplicada nos últimos anos, e gradualmente se torna uma técnica mutuamente complementar à genômica, transcriptômica e proteômica (DUMAS, 2012; CASTRO-SANTOS; LABORDE; DIAZ-PENA, 2015). Portanto, tais análises podem prover um panorama instantâneo do estado fisiológico das células e indicar como o perfil metabólico de um sistema biológico complexo é alterado em resposta ao estresse, como

fatores adversos ou adaptação fisiológica às alterações ambientais (PATEL; AHMED, 2015; GIBBONS; O'GORMAN; BRENNAN, 2015).

Comparado às demais ômicas, os estudos metabolômicos fornecem informações diretas da resposta celular integrada às mudanças no ambiente interno e externo utilizando material de relativo baixo custo para a preparação da amostra (FUHRER; ZAMBONI, 2015). Peng, Li e Peng (2015) afirmam que análises metabolômicas surgem para descobrir não somente os metabólitos de células ou organismos em diferentes condições, mas também para avaliar a frequência e abundância relativa de metabólitos exógenos, que foram denominados como metabolômica de descoberta.

Ao passo que a metabolômica é uma das áreas emergentes nos estudos de biologia sistêmica, a genômica funcional fornece abordagens mais recentes para a confirmação de fenótipos de interesse. A integração do metaboloma com análises transcriptômicas alvo, facilitam a compreensão da funcionalidade do gene e de sua regulação em várias vias metabólicas (GUPTA et al., 2014). Para tanto, análises de genes específicos de vias metabólicas conhecidas tornam-se peças chave em estudos em microbiologia sistêmica pela capacidade de correlação entre a presença de tais genes, sua expressão (RNA) e abundância relativa de metabólitos.

A análise metabolômica não-direcionada surge como uma importante ferramenta para descobrir, quantificar e comparar perfis de microrganismos de relevância nas ciências alimentares. Além disso, a análise funcional dos metabólitos pode fornecer um ponto de partida para a correlação dos dados obtidos com as vias metabólicas, que são informações convergentes entre testes de suscetibilidade antimicrobiana e análise metabolômica não-direcionada (CAMERON; TAKÁTS, 2018). Uma abordagem do perfil de metabólitos identificados em bactérias patogênicas pode associar a frequência e abundância relativa de tais metabólitos com papéis biológicos, tais como respostas adaptativas a exposições subletais a agentes estressores (MALLICK et al., 2017).

2.4.1 Identificação e quantificação de metabólitos por HPLC-MS

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia gasosa (GC) e a eletroforese capilar (CE), atualmente são as técnicas de separação mais utilizadas para quantificação de compostos de interesse. Para a detecção, as técnicas mais comuns incluem espectrometria de massas (MS), ressonância magnética nuclear (MNR) e espectrometria de infravermelho próximo (NIR) (MOZZI et al., 2013). Em HPLC, podem ser obtidas separações altamente eficientes, rápidas e sem tratamentos prévios rigorosos da amostra. Por esta técnica, diferentes compostos são separados por sua interação diferenciada com uma fase estacionária, constituída por colunas empacotadas por partículas porosas de 3 a 5 μm . Dessa forma, cada *peak* cromatográfico possui um tempo de retenção específico correspondente à um metabólito, sendo que sua área relativa permite calcular a concentração de cada metabólito presente na amostra (MOZZI et al., 2013).

A espectrometria de massas (EM) constitui uma importante ferramenta de análise, em que o propósito central é converter uma substância em subprodutos, ou seja, fragmentos moleculares mensuráveis que irão revelar a estrutura da molécula original. É uma técnica largamente utilizada na análise de massas moleculares diversas. Devido à alta sensibilidade (pg- μ g) é utilizada na análise de substâncias em baixas concentrações (controle de doping, contaminação ambiental e de produtos, etc.) em diferentes matrizes (ambientais, biológicas, alimentos, etc.) (VAN HOVE; SMITH; HEEREN, 2010).

Para a identificação de compostos desconhecidos, elucidação estrutural, determinação de propriedades moleculares e, sobretudo, quantificação de substâncias em traços e ultra traços, a EM-*tandem* (EM/EM) é amplamente utilizada. É uma das metodologias mais utilizadas na elucidação estrutural de metabólitos, sendo geralmente associada com uma técnica de separação. A EM/EM pode fornecer informações através da fragmentação controlada de moléculas (variando-se a energia de colisão), particularmente, para a identificação de analitos, elucidação estrutural e informações relativas a grupos funcionais de metabólitos microbianos (TEUNISSEN et al., 2010; DAHMANE et al., 2010; DELLAGRECA et al., 2007; MATEJÍCEK; KUBAN, 2007; SORA et al., 2010; WEN et al., 2008).

Podem-se caracterizar alguns dos principais sistemas de EM-*tandem*, como, por exemplo, CL-EM/EM – Cromatografia Líquida acoplada a um detector de EM, que possui dois analisadores filtros de massas (Q1 e Q3) do tipo triplo-quadrupolo e uma célula de colisão (Q2) para fragmentação da molécula (ARDREY, 2003). Atualmente, a técnica de CL-EM/EM também pode ser classificada como híbrida, através do advento de um analisador/filtro de massas (Q3) (MARCH; TODD, 2005; CHHABIL, 2007).

2.4.2 Heatmap, Clustering e OPLS-DA

A comparação do metaboloma de um grupo sujeito a alterações ambientais ou genéticas, alimentares, de tratamento terapêutico, etc. (grupo teste), com um grupo de indivíduos não alterados (grupo controle) pode fornecer informações importantes no que diz respeito ao entendimento do fenótipo de um organismo, desempenhando um papel fundamental na biologia de sistemas (KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013). Para análise metabolômica global, aplicam-se etapas de alinhamento, agrupamento, correção do tempo de retenção e de linha de base e normalização. Existem atualmente, diversos softwares livres e licenciados para tratamento de dados metabolômicos (LUDWIG, GÜNTHER, 2011; SMITH et al., 2006; KATAJAMAA; MIETTINEN; OREŠIČ, 2006; LOMMEN, 2009). Misra e Van der Hoof (2016) descrevem uma série desses softwares de tratamento de dados, e bases de dados para correlações de massas e rotas metabólicas.

Uma vez produzida uma matriz de dados a partir de dados brutos, as etapas subsequentes geralmente envolvem diferentes formas de análise estatística e obtenção de dados para permitir a identificação de amostras ou variáveis (metabólitos) que capturam a maior parte da variação entre conjuntos de dados e que podem representar candidatos a variáveis biologicamente significativas.

Análises típicas de dados metabolômicos consistem em duas fases; inicialmente, uma visão geral dos conjuntos de dados é gerada por meio de análise multivariada e picos individuais são posteriormente classificados por análise univariada baseados em MS (BOCCARD; VEUTHEY; RUDAZ, 2010; TOHGE; FERNIE, 2009).

A análise de *clustering* é um método estatístico que envolve a divisão de conjuntos de dados observados em várias subclasses ou clusters com base em uma função de distância estatística selecionada. Existem dois tipos de algoritmos de *clustering*: métodos hierárquicos e não hierárquicos. Ambos os algoritmos particionam os conjuntos de dados observados em subgrupos para que conjuntos de dados com perfis metabolômicos semelhantes sejam colocados em cada subgrupo. O agrupamento hierárquico (HCL) alinha conjuntos de dados gerando dendrogramas utilizando o seguinte procedimento: 1) calcular a semelhança das duas amostras usando uma métrica específica, como correlação de Pearson, euclidiano, informações mútuas e valores de covariância; 2) alinhar as amostras mais semelhantes aos vizinhos ou emparelhá-las como um único aglomerado; e 3) reiterar os passos 1 e 2 até que todas as amostras estejam alinhadas (BLEKHERMAN et al., 2011).

As análises estatísticas compõem uma ferramenta importante para obter informações relevantes dos dados através de métodos de análise. As análises podem ser classificadas como univariadas e multivariadas. Nas análises multivariadas, a classificação e discriminação de entidades ou metabólitos responsáveis por diferenciar os grupos de amostras são realizadas através da avaliação do conjunto da matriz de dados extraídos na etapa de trabalho anterior.

São aplicados métodos não supervisionados, como análise de componentes principais (PCA, do inglês, *principal component analysis*), e métodos supervisionados, como análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, *partial least squares discriminant analysis*), e projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês, *orthogonal partial least squares discriminant analysis*). Já nas análises univariadas, as variáveis de estudo (entidades ou metabólitos) são avaliadas separadamente e, ao contrário dos métodos multivariados, são desprezadas as relações entre elas. Testes estatísticos como ANOVA, teste t de Student, ou de Mann-Whitney U, são frequentemente utilizados (SUGIMOTO et al., 2012).

2.5 Nanotecnologia aplicada a indústria de alimentos

A nanotecnologia é uma ciência emergente que tem atraído o interesse de pesquisadores devido ao seu grande potencial de aplicação. Com o status de tecnologia convergente, a manipulação de partículas em escala nanométrica abrange o cenário multidisciplinar com ênfase nos campos da física, química, biologia, engenharia de materiais, eletrônica e medicina humana (FERNANDES; FILGUEIRAS, 2008). Os avanços nas pesquisas refletem a tendência tecnológica mundial em todos os setores de produção, que pode ser traduzida em “quanto menor, melhor”. Denomina-se esta revolução

de nanotecnologia, cujo termo é originário da unidade de medida que equivale a 10^{-9} metros (um milionésimo de milímetro) (ARAKI, 2007).

Dada a versatilidade e funcionalidade dos compostos gerados, a nanotecnologia é empregada nos mais diversos segmentos, destacando-se os setores farmacêutico, alimentício e cosmético (ARAKI, 2007). Recentes avanços na área da nanotecnologia estão sendo reconhecidos de forma crescente pela comunidade científica, uma vez que a manipulação da matéria em escala nanométrica oferece inúmeras oportunidades. No âmbito da indústria de alimentos, as pesquisas em nanotecnologia concentram-se no desenvolvimento de ingredientes e aditivos em tamanho nanométrico ou nanoencapsulados, bem como materiais de embalagem ativas e nanocarregadores (CHAUDHRY; WATKINS; CASTLE, 2010).

A busca por sistemas de encapsulação de componentes lipofílicos bioativos (LI; MCCLEMENTS, 2010) e pela substituição de sanitizantes comuns, desperta considerável interesse no desenvolvimento de sistemas nanométricos de carregamento para incorporação de óleos essenciais e ou seus componentes (DONSÍ et al., 2011). Dentre as diversas formas de se nanoencapsular compostos bioativos lipofílicos, destacam-se as nanoemulsões.

As emulsões são sistemas formados por dois ou mais líquidos imiscíveis, sendo, um deles disperso na forma de gotas ou glóbulos (fase dispersa) no outro (fase contínua). Agentes ativos de superfície, como os tensoativos, exibem duas funções principais: diminuir a tensão interfacial entre as fases, de forma a facilitar a formação da emulsão, e estabilizar a fase dispersa contra coalescência após sua formação (BRÖSEL; SCHUBERT, 1999; PAL, 2011). Neste contexto, processos de alta energia são aplicados a estas emulsões a fim de diminuir o tamanho das partículas à escala nanométrica.

2.5.1 Nanoemulsões de óleos essenciais e seus componentes majoritários

Nanoemulsões costumam ter aspecto leitoso, baixa viscosidade e as moléculas ativas estão preferencialmente dissolvidas no núcleo oleoso da nanoestrutura (DIAS et al., 2014), são ideais como carreadores de óleos essenciais, ou seus compostos, devido à alta afinidade criada na formação das gotas, gerando compatibilidade com diversos alimentos ricos em água e atravessando membranas biológicas com facilidade, além da simplicidade de obtenção em escala industrial (DONSÍ et al., 2011).

Devido à baixa solubilidade em água, os componentes dos óleos essenciais precisam ser encapsulados em sistemas, por vezes nanoemulsionados, de carregamento adequados a fim de permanecerem ativos (WEISS et al., 2009). Segundo Kralova e Sjöblom (2009), tensoativos não-iônicos, tais como Tween 80, são surfactantes moleculares capazes de adsorver nas superfícies das gotículas, facilitando o rompimento por métodos físicos (como ultrassom) e protegendo contra a agregação das gotas.

Óleos essenciais submetidos à nanoencapsulação são alternativas viáveis e eficiente para aumentar a estabilidade física dos compostos bioativos, protegendo-os das interações com outros

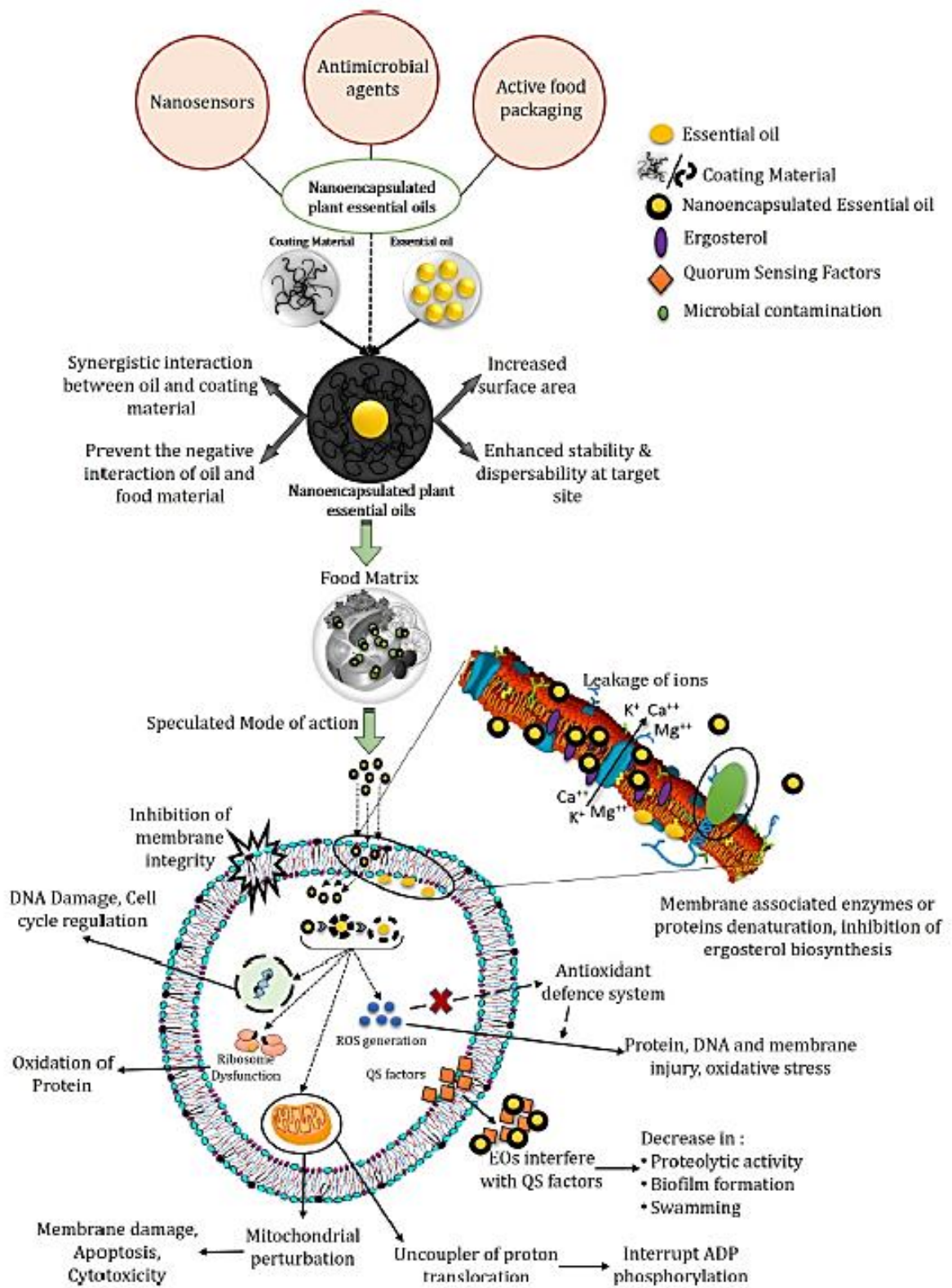
componentes. Devido ao tamanho diminuto, aumenta-se sua atividade devido a prevalência de mecanismos passivos de absorção celular (WEISS et al., 2009) (Figura 6).

Desta forma, nanoemulsões de óleos essenciais ou seus componentes podem ter novas aplicabilidades na área de alimentos conferindo maior efeito antimicrobiano quando comparado à aplicação do óleo essencial diretamente em superfícies ou em equipamentos, bem como nos alimentos. Isto deve-se ao fato de que materiais em tamanho nanométrico, geralmente, apresentam maior área superficial de contato em relação ao seu volume e possuem maior permeabilidade celular. A produção de nanoemulsões com nanogotículas de óleos essenciais apresenta-se como nova possibilidade de aplicação destes óleos essenciais em alimentos.

Assim, em muitos aspectos, a encapsulação de componentes lipofílicos funcionais em nanoemulsões oferece várias vantagens. Isto é válido para compostos majoritários de óleos essenciais, onde as questões de estabilidade físico-química, de impacto minimizado nos produtos onde são incorporados, bem como a maior atividade antimicrobiana e baixo resíduo perceptível são de interesse considerável para aplicações industriais como antimicrobianos naturais.

Portanto, a incorporação dos compostos majoritários de óleos essenciais: cinamaldeído e citral, bem como uma blenda dos mesmos, para a produção de nanoemulsões sanificantes de superfícies e equipamentos, pode ser uma tecnologia interessante para a indústria alimentícia para o controle de biofilmes bacterianos e ou como conservante. Assim, novas possibilidades de melhorias tecnológicas para o controle e higiene alimentar são destacadas com o uso de compostos naturais aliados a nanotecnologia.

Figura 6 - Representação esquemática do modo de ação de óleos essenciais nanoencapsulados frente à microrganismos de origem alimentar.



Fonte: Prakash et al. (2018).

2.5.2 Obtenção de nanoemulsões óleo-em-água (O/A)

O diferencial do uso de nanoemulsões (geralmente óleo em água, O/A) é devido ao tamanho das gotas de óleo da fase dispersa serem menores que 300 nm e por serem cineticamente estáveis, onde a separação de fases é dificultada pelo intenso movimento Browniano do sistema que supera a taxa de segregação induzida pela gravidade (ANTON; VANDAMME, 2011). O tamanho médio de gota obtido nas nanoemulsões influencia diretamente o efeito pretendido, permitindo o uso de baixas concentrações de princípios ativos e aumentando sua interação com as matrizes, visando liberação controlada e atividade máxima (HUANG; YU; RU, 2010; WEISS et al., 2009).

Os processos de nanoemulsificação de baixa energia baseiam-se na formação espontânea de gotículas de óleo nos sistemas mistos de óleo-água-tensoativo, quando a solução ou as condições ambientais são alteradas, utilizando a energia química do sistema. Já os métodos de obtenção das nanoemulsões, pertencentes ao grupo de alta energia de emulsificação, têm potencial para utilização nas indústrias de alimentos devido tanto à disponibilidade de equipamentos para uso em nível industrial, quanto à capacidade para produzir sistemas nanoemulsificados sem a adição de solventes orgânicos (SALVIA-TRUJILLO et al., 2013).

Normalmente, nos processos de nanoemulsificação por alta energia ocorre primeiramente a mistura das fases oleosa e aquosa, resultando em uma emulsão grosseira com tamanho de gotícula grande e após, esta é forçada a passar por um sistema com introdução de força de cisalhamento, a qual irá reduzir o tamanho médio de gota (JAFARI; HE; BHANDARI, 2007; MCCLEMENTS; RAO, 2011). Alguns dispositivos utilizados para a produção de nanoemulsões pelo método de alta energia são: homogeneizadores, microfluidizadores e ultrassonicadores (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008; MCCLEMENTS; RAO, 2011).

Métodos de obtenção de nanoemulsões por ultrassom baseiam-se na perturbação da interface óleo-água e consequente formação de pequenas gotículas induzidas por fenômeno de cavitação. As ondas alternadas de baixa pressão e alta pressão geradas por ultrassons em alta frequência (> 18 kHz) induzem em líquidos a passagem rápida das condições de formação de bolhas de vapor para o colapso da bolha de vapor. As bolhas de imersão conduzem a intensas ondas de choque de cavitação, com pressões locais no líquido circundante aumentando para 1,35 Mpa, que é um valor de pressão relativamente baixo comparado a outros trabalhos (MAA; HSU, 1999).

A seleção de um emulsionante adequado e sua concentração em relação à fase oleosa devem levar em conta vários fatores, como a) a cobertura superficial necessária para as emulsões estáveis, b) a tensão interfacial, c) a cinética de adsorção em interfaces O/A, bem como o rearranjo molecular no caso de emulsionantes de elevado peso molecular, tais como proteínas e polissacarídeos e, d) o balanço hidrófilo-lipofílico (HLB) das moléculas tensoativas (DONSÍ et al., 2011). A concentração de surfactante é extremamente importante, estando diretamente relacionada com a cobertura superficial da gota, assim como à tensão interfacial O/A (CHANG; MCLANDBOROUGH; MCCLEMENTS, 2013).

2.5.3 Formulação e caracterização das nanoemulsões

Os métodos de obtenção das nanoemulsões pertencentes ao grupo de alta energia de emulsificação têm potencial para utilização nas indústrias de alimentos aliando a ação bactericida de compostos majoritários de óleos essenciais com as potencialidades de nanoencapsulação de tais componentes. A disponibilidade de equipamentos em escala industrial e a produção de sistemas nanoemulsificados sem a adição de solventes orgânicos são os principais fatores a serem considerados para a implantação de tais métodos em ambiente industrial e quanto à capacidade para produzir sistemas nanoemulsificados sem a adição de solventes orgânicos (SALVIA-TRUJILLO et al., 2013).

O uso ideal de tensoativos pode prevenir coalescência e floculação de nanoemulsões, sendo a maturação de Ostwald o principal mecanismo de desestabilização. Em teoria, nanoemulsões produzidas por processos de alta energia, que causam ruptura das gotas e diminuição do tamanho das mesmas, são termodinamicamente instáveis, porém, como a cinética de desestabilização de nanoemulsões costuma ser lenta, são consideradas cineticamente estáveis (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; SIVAKUMAR; TANG; TAN, 2014).

Assim, nanoemulsões são especificadas como sistemas de entrega de elementos lipofílicos, encapsulados numa matriz, com um tamanho de gotículas notavelmente pequeno (SOLANS et al., 2005; MASON et al., 2006; McCLEMENTS, 2011). Segundo Solé et al. (2006) e Pey et al. (2006), as nanoemulsões são uma classe de emulsões cujo diâmetro de gotículas está em torno de 10 a 500 nanômetros, com tamanho médio de gota variando tipicamente entre 20 e 200 nm (SAGALOWICZ; LESER, 2010). Li, Feng e Yang (2010) relatam que o tamanho de gotículas é um parâmetro de estabilidade, sendo relevante e de grande importância para os sistemas emulsionados.

A caracterização de formulações em nanossistemas coloidais requer diversas técnicas básicas como o aspecto visual, pH, diâmetro médio de partícula, superfície de carga de partículas, estabilidade química dos componentes, fornecendo informações úteis (KLANG; VALENTA, 2011). Adicionalmente, para determinação de tamanho de partículas são empregadas técnicas, tais como, de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de microscopia eletrônica de transmissão (MET) que permitem, também, observar a morfologia, tamanho e estrutura das nanopartículas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Dentre as principais vantagens da técnica de obtenção de nanoemulsões por ultrassom quando comparadas com as nanoemulsões preparadas por outros dispositivos mecânicos são a ocorrência reduzida de "processamento excessivo" (JAFARI; HE; BHANDARI, 2007; LEONG et al., 2009), baixa polidispersidade e maior estabilidade (ABISMAÏL et al., 1999; IZQUIERDO et al., 2005). Soluções de nanoemulsões podem ser produzidas usando ferramentas de alta energia de emulsificação, como métodos de alta pressão ou ultrassom, ou por baixa energia de emulsificação, os quais empregam as propriedades químicas do sistema como rota de obtenção de nanogotículas a partir de microemulsão matriz (ANTON et al., 2007; SOLÉ et al., 2010).

2.5.4 Parâmetros de estabilidade de nanoemulsões

Dentre as principais propriedades dos sistemas multifásicos, como as nanoemulsões, encontram-se o diâmetro, a distribuição de partículas da fase interna e o potencial zeta. De uma forma geral, as nanopartículas obtidas através de diferentes métodos, após a preparação, apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996; GOVENDER et al., 1999; AVGOUSTAKIS et al., 2002). Como resultado, obtém-se a média do tamanho das gotas e o índice de polidispersibilidade (PDI). A distribuição do tamanho das gotas representa a homogeneidade do sistema nanoemulsionado, sendo um pequeno PDI, inferior a 0,2, indicativo de uma distribuição estreita no tamanho das partículas e estabilidade ideal.

Os diâmetros das partículas das nanoemulsões são geralmente medidas utilizando a metodologia espectroscópica de espalhamento a laser, por meio de um analisador de tamanho de partículas em nanoescala. O equipamento designado para tal análise realiza a leitura numa faixa específica de turbidez da amostra, de modo a evitar espalhamento excessivo da luz por aglomerados formados em amostras.

As medidas do tamanho das partículas após o preparo e durante o período de armazenamento fornecem indicações sobre a estabilidade do sistema. Quanto mais rápido as gotículas aumentam de tamanho por coalescência, menor a estabilidade do sistema (KULMYRZAEV; SCHUBERT, 2003; ROLAND et al., 2003). Rao e McClements (2012) observaram um aumento no diâmetro médio das gotículas das nanoemulsões de óleo de limão após armazenagem, de cerca de 217 nm, imediatamente após o seu preparo, para 296 nm após o armazenamento durante uma noite. Os mesmos autores atribuíram esta variação à distribuição bimodal (duas distribuições de tamanhos de partículas) formada após o armazenamento durante a noite, à instabilidade destes sistemas e à maturação de Ostwald.

Donsí et al. (2011), empregaram alta energia de emulsificação por meio de microfluidização e relataram gotas de tamanhos entre 74,4 a 356,7 nm em nanoemulsões de d-limoneno e/ou uma mistura de terpenos com várias formulações e processados durante 10 ciclos a 300 MPa. Dentre outros resultados, os autores observaram que as nanoemulsões com baixas concentrações dos terpenos foram capazes de retardar e inibir o crescimento microbiano sem prejudicar as propriedades organolépticas dos sucos de frutas.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (MAGENHEIM; BENITA, 1991; MOSQUEIRA et al., 2000). Este parâmetro está relacionado à estabilidade das dispersões coloidais, indicando a força de repulsão entre as partículas adjacentes igualmente carregadas. Um elevado valor de potencial zeta em módulo (>30 mV) é importante para a estabilidade físico-química das emulsões, uma vez que forças repulsivas tendem a evitar possíveis agregações da fase interna (ARAÚJO et al., 2011).

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C.; COLLIGNON, P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 6, p. 733-750, 2008.
- AASEN, I. M.; MARKUSSEN, S.; MØRETRØ, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L.; NATERSTAD, K. Interaction of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 35-43, 2003.
- ABISMAÏL, B.; CANSELIER, J. P.; WILHELM, A. M.; DELMAS, H.; GOURDON, C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 6 (1-2), p. 75-83, 1999.
- AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M.; ISOBE, M. A novel dodecadedepsipeptide, cerulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 129, n. 1, p. 17-20, 1995.
- AIRES, G. S. B.; WALTER, E. H. M.; JUNQUEIRA, V. C. A.; ROIG, S. M.; FARIA, J. A. F. *Bacillus cereus* in refrigerated milk submitted to different heat treatments. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 6, p. 1301-1305, 2009.
- ALMEIDA, I. C.; SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P. Pesquisa de atividade lipolítica e/ou proteolítica em estirpes psicrotróficas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 71, p. 58-60, 2000.
- ALMEIDA, I.; ALVIANO, D. S.; VIEIRA, D. P.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; LOPES, A. H.; ALVIANO, C. S.; ROSA, M. S. Anti-giardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. **Parasitology Research**, v. 101, n. 2, p. 443-452, Mar. 2007.
- AMMOR, M. S.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. **Meat Science**, v. 76, p. 138-146, 2007
- AMUKA, O.; TARUS, P. K.; RUTTOH, E. K.; MACHOCHO, A. K.; OKEMO, P. O. Natural extractives and the role they play in human health. **Gastroenterology and Liver Clinical and Medicals**, v. 1, p. 1-13, 2017.
- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, Abr./Jun. 2012.
- ANTON, N.; GAYET, P.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 44-52, 2007.
- ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 978-985, 2011.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 8, de 6 de Março de 2013. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/legis > Acessado em: 5 de março de 2020.
- ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1484-1490, 2007.

ARAUJO, J. C.; TÉRAN, F. C.; OLIVEIRA, R. A.; NOUR, E. A.; MONTENEGRO, M. A.; CAMPOS, J. R.; VAZOLLER, R. F. Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge. **Journal of electron microscopy**, v. 52, n. 4, p. 429-433, 2003.

ARAÚJO, F.; KELMANN, R.; ARAÚJO, B.; FINATTO, R.; TEIXEIRA, H.; KOESTER, L. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 238-245, 2011.

ARAUZ, L. J.; JOZALA, A. F.; MAZZOLA, T. C.; PENNA, V. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 146-154, 2009.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography– Mass Spectrometry: An Introduction**. John Wiley & Sons, Ltd: UK, 2003.

ARNESEN, L. P. S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 579-606, 2008.

ASADUZZAMAN, S. M.; SONOMOTO, K. Lantibiotics: diverse activities and unique mode of action. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 10, n. 5, p. 475-487, 2009.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; KARYDAS, A.; ITHAKISSIOS, D. PLGA–mPEG nanoparticles of cisplatin: in-vitro nanoparticle degradation, in-vitro drug release and in-vivo drug residence in blood properties. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 123-35, 2002;

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BANI-JABER, A.; MCGUIRE, J.; AYRES, J. W.; DAESCHEL, M. A. Efficacy of the antimicrobial peptide nisin in emulsifying oil in water. **Journal of food science**, v. 65, n. 3, p. 502-506, 2000.

BANYKÓ, J.; VYLETELOVÁ, M. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 318-323, 2009.

BASSOLÉ, I. H. N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; TIROGO, S.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R. C.; DICKO, M. H. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7825-7839, 2010.

BELAICHE, T.; TANTAOUI-ELARAKI, A.; IBRAHIMY, A. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. **Sciences des Aliments**, v. 15, p. 571-578, 1995.

BELLO, B. D.; RANTSIUO, K.; BELLIO, A.; ZEPPA, G.; AMBROSOLI, R.; CIVERA, T.; COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1151-1159, 2010.

BERNARDES, P. C. **Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão**. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. New York: Spring Science Business, (Food Science Text Series), p. 276, 2008.

BLEKHERMAN, G.; LAUBENBACHER, R.; CORTES, D. F.; MENDES, P.; TORTI, F. M.; AKMAN, S.; TORTI, S. V.; SHULAEV, V. Bioinformatics tools for câncer metabolomics. **Metabolomics**, v. 7, n. 3, p. 329-343, 2011.

BOCCARD, J.; VEUTHEY, J. L.; RUDAZ, S. Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling. **Journal of separation science**, v. 33, n. 3, p. 290-304, 2010.

BOOTH, I. R. Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. **International journal of food microbiology**, v. 78, n. 1-2, p. 19-30, 2002.

BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 31–37, Jan. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 2017**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>>.

BRAUNER, A.; FRIDMAN, O.; GEFEN, O.; BALABAN, N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 320, 2016.

BRÖSEL, S.; SCHUBERT, H. Investigations on the role of surfactants in mechanical emulsification using a high-pressure homogenizer with an orifice valve. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 38, p. 533-540, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUZÓN-DURÁN, L.; ALONSO-CALLEJA, C.; RIESCO-PELÁEZ, F.; CAPITA, R. Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. **Food Microbiology**, v. 65, p. 294-301, 2017.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 530-536, 1996.

CAMERON, S. J. S; TAKÁTS, Z. Mass spectrometry approaches to metabolic profiling of microbial communities within the human gastrointestinal tract. **Methods**, v. 149, p. 13-24, 2018.

CARLIN, F.; BRILLARD, J.; BROUSSOLLE, V.; CLAVEL, T.; DUPORT, C.; JOBIN, M.; GUINEBRETIERE, M. H.; AUGER, S.; SOROKINE, A.; NGUYEN-THÉ, C. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1885-1894, 2010.

CARVALHO FILHO, J. L. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; EHLERT, P. A. D.; MELO, A. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R. Influence of the

harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 24-30, Jan./Mar. 2006.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, v. 79, p. 483-499, 2008.

CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais. **Boletim Técnico da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária**, n. 11, 2003.

CASTRO-SANTOS, P.; LABORDE, C. M.; DIAZ-PENA, R. Genomics, proteomics and metabolomics: their emerging roles in the discovery and validation of rheumatoid arthritis biomarkers. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 33, n. 2, p. 279-286, 2015.

CERRUTTI, P.; ALZAMORA, S. M. Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.29, n. 2-3, p. 379-386, 1996.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; REYES-DE-CORCUERA, J. L.; ETXEBERRIA, E.; DANYLUK, M. D.; RODRICK, G. E. Metabolomic analysis in food science: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 20, n. 11/12, p. 557-566, Dec. 2009.

CHAMBEL, A.; VIEGAS, C. A.; SÁ-CORREIA, I. Effect of cinnamic acid on the growth on plasma membrane H⁺-ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 173-179, 1999.

CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D.J. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 61, p. 8906-8913, 2013.

CHAO, M. R.; HSIEN, C. H.; YEH, C. M.; CHOU, S. J.; CHU, C.; SU, Y. C.; YU, C. Y. Assessing the prevalence of *Salmonella enterica* in poultry hatcheries by using hatched eggshell membranes. **Poultry Science**, v. 86, p. 1651-1655, 2007.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 51, n. 4, p. 271-276, 2003.

CHATTERJEE, C.; PAUL, M.; XIE, L.; VAN DER DONK, W. A. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 633-683, 2005.

CHAUDHRY, Q.; WATKINS, R.; CASTLE, L. Nanotechnologies in the Food Arena: New Opportunities, New Questions, New Concerns. In: CHAUDHRY, Q.; CASTLE, L.; WATKINS, R. (Eds.). Nanotechnologies in Food. Cambridge: **The Royal Society of Chemistry**, p. 1-17, 2010.

CHAVES, J. Q.; PIRES, E. S.; VIVONI, A. M. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 12-16, 2011.

CHEIGH, C. I.; PYUN, Y. R. Nisin biosynthesis and its properties. **Biotechnology letters**, v. 27, n. 21, p. 1641-1648, 2005.

CHEN, L.; COOLBEAR, T.; DANIEL, R. M. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 495-504, 2004.

CHHABIL, D. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2007.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1065-1073, 2008.

COSTA, L. C. do B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 956-959, Out./Dez. 2005.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

CRONIN, U. P.; WILKINSON, M. G. *Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and low-temperature storage. **Food microbiology**, v. 25, n. 2, p. 235-243, 2008.

CUSHEN, M.; KERRY, J.; MORRIS, M.; CRUZ-ROMERO, M.; CUMMINS, E. Nanotechnologies in the food industry—recent developments, risks and regulation. **Trends in food science & technology**, v. 24, n. 1, p. 30-46, 2012.

DAHMANE, E.; MERCIER, T.; ZANOLARI, B.; CRUCHON, S.; GUIGNARD, N.; BUCLIN, T.; LEYVRAZ, S.; ZAMAN, K.; CSAJKA, C.; DECOSTERD, L. A. An ultra performance liquid chromatography–tandem MS assay for tamoxifen metabolites profiling in plasma: First evidence of 4'-hydroxylated metabolites in breast cancer patients. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 32, p. 3402-3414, 2010.

DAMBOLENA, J. S.; OMARINI, A., MERLO, C.; PIZZOLITTO, R. P.; ZUNINO, M. P.; ZYGADLO, J. A. Antibacterial and Anti-biofilm Activities of Essential Oils and Their Components Including Modes of Action. In: **Essential Oils and Nanotechnology for Treatment of Microbial Diseases**. CRC Press, p. 111-138, 2017.

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

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension - A Review. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058–1071, 2006.

DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; DE BLOCK, J.; COILLE, E. V.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Toxigenic and spoilage potential aerobic spore-formers isolated from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 318-325, 2010.

DELLAGRECA, M.; IESCE, M. R.; ISIDORI, M.; NARDELLI, A.; PREVITERA, L.; RUBINO, M. Phototransformation products of tamoxifen by sunlight in water. Toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 67, n. 10, p. 1933-1939, 2007.

DELVES-BROUGHTON, J.; GASSON, M. J. Nisin. In: DILLON, V. M.; BOARD, R. G. **Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation**. Wallingford: CAB INTERNATIONAL. cap. 4, p. 99-131, 1994.

DIAS, D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; KAISER, S.; LUCCA, L. G.; TEIXEIRA, H. F.; LIMBERGER, R. P.; VEIGA, V. F.; KOESTER, L. S. Optimization of Copaiba oil-based

nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 154-162, 2014.

DIAS, N. A. A.; RODRIGUES, L. T. D. S.; PALHARES, P. C.; RAMOS, E. M.; PICCOLI, R. H. Antimicrobial activity of essential oils on *Clostridium perfringens* type a inoculated in mortadella. **Journal of Food Safety**, v. 35. n. 4, p. 466-472, 2015.

DÍAZ, I.; PÉREZ-PARIENTE, J.; TERASAKI, O. Structural study by transmission and scanning electron microscopy of the time-dependent structural change in M41S mesoporous silica (MCM-41 to MCM-48, and MCM-50). **Journal of Materials Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 48-53, 2004.

DIEP, D. B.; NES, I. F. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. **Current drug targets**, v. 3, n. 2, p. 107-122, 2002.

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2745-2749, 2006.

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

DRAEGER, C. L. **Incidência das doenças transmitidas por alimentos no Brasil: uma análise de 2007 a 2017**. 2018. 36 p. Tese (Doutorado em Nutrição Humana) - Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 324-338, 1993.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J. Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science**, v. 74, p. 690–696, 2006.

DUFRENNE, J.; BIJWAARD, M.; GIFFEL, M.; BEUMER, R.; NOTERMANS, S. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 175-183, 1995.

DUMAS, M. E. Metabolome 2.0: quantitative genetics and network biology of metabolic phenotypes. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 10, p. 2494-2502, 2012.

EL FATTAH, M. A.; EL ZAHWEY; HARIDY, I. M.; EL DEEB, S. A. Effect of drying on the physicochemical properties and chemposition of lemongrass oil. **Menofia Journal of Agricultural Research**, v. 17, n. 3, p. 1211-1230, 1992.

ELISABETSKY, E.; BRUM, L. F. S.; SOUZA, D. O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, v.6, n. 2, p. 107-113, May. 1999.

ERILL, I.; CAMPOY, S.; BARBÉ, J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 6, p. 637-656, Nov. 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Sulfiting agents; affirmation of GRAS status. Fed. Reg. 53(243):51065, 1988.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **CFR-Code of federal regulations title 21**, v. 3. Cite: 21CFR182.60. [200-?b]. Revised: 1 abr 2019. Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=182.60>>.

Acessado em: 3 mar 2020.

FERNANDES, M. F. M.; FILGUEIRAS, C. A. L. Um panorama da nanotecnologia no Brasil e seus macro-desafios. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2205-2213, 2008.

FERREIRA, T. M.; SILVA, F. D. S.; TEODORO, G. R.; COSTA, A. C. B. P. D.; MARIA, A.; BELTRAME JÚNIOR, M.; KHOURI, S. Citral antifungal activity against *Candida* genus yeasts isolated from hospitalized patients. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 68, n. 1, p. 118-125, 2009.

FERRENTINO, G.; MOROZOVA, K.; HORN, C.; SCAMPICCHIO, M. Extraction of essential oils from medicinal plants and their utilization as food antioxidants. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 5, 2019.

FERRO, T. A.; ARAUJO, J. M.; DOS SANTOS PINTO, B. L.; DOS SANTOS, J. S.; SOUZA, E. B.; DA SILVA, B. L.; COLARES, V. L.; NOVAIS, T. M.; FILHO, C. M.; STRUVE, C.; CALIXTO, J. B.; MONTEIRO-NETO, V.; DA SILVA, L. C.; FERNANDES, E. S. Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a galleria mellonella model. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2052-2051, 2016.

FERRO, T. A. F.; SOUZA, E. B.; SUAREZ, M. A. M.; RODRIGUES, J. F. S.; PEREIRA, D. M. S.; MENDES, S. J. F.; GONZAGA, L. F.; MACHADO, M. C. A. M.; BOMFIM, M. R. Q.; CALIXTO, J. B.; ARBISER, J. L.; MONTEIRO-NETO, V.; ANDRÉ, E.; FERNANDES, E. S. Topical application of cinnamaldehyde promotes faster healing of skin wounds infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1627, 2019.

FIGUEIREDO, R. O.; DELACHIAVE, M. E. A.; MING, L. C. Effect of growth regulators in citral content in lemongrass in different seasons. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 569, n. 22, p. 47-50, Nov. 2002.

FRASER, A. C.; SHARRATT, M.; HICKMAN, J. R. The biological effects of food additives. 1. Nisin. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 13, p. 32-42, 1962.

FRIEDMAN, M.; KOZUKUE, N.; HARDEN, L. A. Cinnamaldehyde content in foods determined by gas chromatography– mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5702-5709, 2000.

FRIEDMAN, M. Chemistry, antimicrobial mechanisms, and antibiotic activities of cinnamaldehyde against pathogenic bacteria in animal feeds and human foods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 48, p. 10406-10423, 2017.

FROMM, H. I.; BOOR, K. J. Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. 207-214, 2004.

FUHRER, T.; ZAMBONI, N. High-throughput discovery metabolomics. **Current opinion in biotechnology**, v. 31, p. 73-78, 2015.

GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I.; MAFART, P. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 5, p. 887-889, 1998.

GÁLVEZ, A.; LOPEZ, R. L.; ABRIQUEL, H. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 125- 152, 2008.

- GIBBONS, H.; O'GORMAN, A.; BRENNAN, L. Metabolomics as a tool in nutritional research. **Current opinion in lipidology**, v. 26, n. 1, p. 30-34, 2015.
- GIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R.; LANGEVELD, L. P. M.; ROMBOUITS, F. M. The role of heat exchangers in the contamination of milk with *Bacillus cereus* in dairy processing plants. **International Journal of Dairy Technology**, v. 50, n. 2, p. 43- 47, 1997.
- GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5750-5755, 2004.
- GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International journal of food microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1-9, 2006.
- GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**. v. 57, p. 171-185, 1999.
- GREER, G. G.; DILTIS, B. D. Control of meatborne *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta* by a bacteriocinogenic *Brochothrix campestris* ATCC 43754. **Food Microbiology**, v. 23, p. 785-790, 2006.
- GROSS, E.; MORELL, J. L. Structure of nisin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 18, p. 4634-4635, 1971.
- GROSSMAN, L. **Óleos essenciais na culinária, cosmética e saúde**. São Paulo: Optonline, p. 300, 2005.
- GROSSO, C.; FERRARO, V.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; COELHO, J. A.; PALAVRA, A. M. Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 197-203, 2008.
- GUERRIERI, E.; NIEDERHAUSERN, S.; MESSI, P.; SABIA, C.; ISEPPI, R.; ANACARSO, I.; BONDI, M. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. **Food Control**, v. 20, p. 861-865, 2009.
- GUPTA, V.; THAKUR, R. S.; BAGHEL, R. S.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Seaweed metabolomics: a new facet of functional genomics. In: **Advances in Botanical Research**. Academic Press, v. 71, p. 31-52, 2014.
- HEREDIA, A. G.; DÁVILA-AVIÑA, J. E.; ZOELLNER, C.; GARCIA-AMEZQUITA, L. E.; HEREDIA, N. Essential oils and plant extracts as natural antimicrobial agents. In: **Emerging Postharvest Treatment of Fruits and Vegetables**. Apple Academic Press, p. 345-380, 2018.
- HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**. v. 75, p. 50-57, 2010.
- HWANG, C.; SHEEN, S.; JUNEJA, V.; HWANG, C.; YIN, T.; CHANG, N. The influence of acid stress on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on cooked ham. **Food Control**, v. 37, p. 245-250, 2014.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 12, 2012.

IJIMA, Y.; WANG, G.; FRIDMAN, E.; PICHERSKY, E. Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 448, n.1-2, p. 141-149, Apr. 2006.

IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal Colloid Interface Science**, v. 285, n. 1, p. 388-394, 2005.

JAFARI, S. M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques, **Journal Food Engineering**, v.82, n. 4, p. 478-488, 2007.

JANKOWSKA, A.; LAUBITZ, D.; ANTUSHEVICH, H.; ZABIELSKI, R.; GRZESIUK, E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. **BioMed research international**, v. 2008, 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, p. 711, 2005.

JEWETT, M. C.; HOFMANN, G.; NIELSEN, J. Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, n. 2, p. 191-197, Apr. 2006.

JIA, P.; XUE, Y. J.; DUAN, X. J.; SHAO, S. H. Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Letters in applied microbiology**, v. 53, n. 4, p. 409-416, 2011.

JINDAL, B. A. K.; PANDYA, M. K.; KHAN, M. I. D. Antimicrobial resistance: A public health challenge **Medical Journal Armed Forces India**, p. 178-181, 2015.

KARUMATHIL, D. P.; NAIR, M. S.; GAFFNEY, J.; KOLLANOOR-JOHN, A.; VENKITANARAYANAN, K. Trans-cinnamaldehyde and eugenol increase *Acinetobacter baumannii* sensitivity to beta-lactam antibiotics. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1011, 2018.

KATAJAMAA, M.; MIETTINEN, J.; OREŠIČ, M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. **Bioinformatics**, v. 22, n. 5, p. 634-636, 2006.

KELLY, A. F.; PARK, S. F.; BOVILL, R.; MACKAY, B. M. Survival of *Campylobacter jejuni* during stationary phase: evidence for the absence of a phenotypic stationary-phase response. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2248-2254, 2001.

KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, p. 55-76, 2011.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R. L. O.; LOPES, D.; MORSEBACH, N. The bark and leaf essential oils of cinnamon (*Cinnamomum verum* Presl) grown at Paraná, Brazil. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 281-285, Set./Dez.1997.

KOUAKOU, P.; GHALFI, H.; DORTU, C.; EVERARD, P.; THONART, P. Combined use of bacteriocin-producing strains to control *Listeria monocytogenes* regrowth in raw pork meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 5, p. 937-943, 2010.

KOUASSI, Y.; SHELEF, L. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by cinnamic acid: possible interaction of the acid with cystenyl residues. **Journal of Food Safety**, v. 18, p. 231-242, 1998.

KRALOVA, I.; SJÖBLÖM, J. Surfactants used in food industry: a review. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30, n. 9, p. 1363-1383, 2009.

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: DOYLE, M. P. (Ed.). **Food Born Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker, New York, EUA, p. 21-70, 1989.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. 2006. 70p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. **Chemical reviews**, v. 113, n. 4, p. 2437-2468, 2013.

KULMYRZAEV, A. A.; SCHUBERT, H. Influence of KCl on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions. **Food Hydrocolloids**. v. 18, p. 13-21, 2003.

KUMAR, G. D.; MICALLEF, S. A. Biofilms: a community-based strategy for bacterial persistence and relevance to food safety, In: **Trends in Food Safety and Protection**, p. 107-130, 2017.

KWON, J. A.; YU, C. B.; PARK, H. D. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 37, n. 1, p. 61-65, Jul. 2003.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LANDAU, E.; SHAPIRA, R. Effects of subinhibitory concentrations of menthol on adaptation, morphological, and gene expression changes in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5361–5367, Aug. 2012.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 1, p.13-39, Jan. 2012.

LANGSRUD, S; SIDHU, M. S.; HEIR, E.; HOLCK, A. L. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 283-290, Jun. 2003.

LEITE, M. C. A.; BEZERRA, A. P. D. B.; SOUSA, J. P. D.; GUERRA, F. Q. S.; LIMA, E. D. O. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

LEONG, T. S. H.; WOOSTER, T. J.; KENTISH, S. E. M.; ASHOKKUMAR, M. Minimizing oil droplet size using ultrasonic emulsification, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 6, p.721-727, 2009.

LETIZIA, C. S.; COCCHIARA, J.; LALKO, J.; API, A. M. Fragrance material review on linalool. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 7, p. 943-964, 2003.

LEVIN, B. R.; ROZEN, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n.7, p. 556–562, Jul. 2006.

LI, X. F.; FENG, X. Q.; YANG, S. A mechanism of antibacterial activity of chitosan against Gram-negative bacteria. **Food Science**, v. 13, p. 037, 2010.

- LI, Y.; McCLEMENTS, D. J. New mathematical model for interpreting pH-Stat digestion profiles: impact of lipid droplet characteristics on in vitro digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 8085-8092, 2010.
- LI, X.; SHENG, J.; HUANG, G.; MA, R.; YIN, F.; SONG, D.; ZHAO, C.; MA, S. Design, synthesis and antibacterial activity of cinnamaldehyde derivatives as inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 32-41, 2015.
- LISERRE, A. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere packaged brazilian sausage. **Meat Science**, v. 61, n. 4, p. 449-455, 2002.
- LOMMEN, A. MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 8, p. 3079-3086, 2009.
- LUDWIG, C.; GÜNTHER, U. L. MetaboLab-advanced NMR data processing and analysis for metabolomics. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 366, 2011.
- MAA, Y. F.; HSU, C. C. Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 4, p. 233-240, 1999.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.
- MALLICK, H.; MA, S.; FRANZOSA, E. A.; VATANEN, T.; MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Experimental design and quantitative analysis of microbial community multiomics. **Genome biology**, v. 18, n. 1, p. 228, 2017.
- MARCH, R. E.; TODD, J. F. J. **Quadrupole ion trap mass spectrometry**. 2^a Ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, v. 165, 2005.
- MAREI, G. I. K.; RASOUL, M. A. A.; ABDELGALEIL, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 103, n. 1, p. 56-61, 2012.
- MARTÍNEZ-BLANCH, J. F.; SÁNCHEZ, G.; AZNAR, R. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 15-21, 2009.
- MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 18, n. 41, p. 635-666, 2006.
- MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J.; GALIOTOU, M.; DROSINOS, E. H. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Meat Science**, v. 64, p. 265-271, 2003.
- MATĚJČEK, D.; KUBÁŇ, V. High performance liquid chromatography/ion-trap mass spectrometry for separation and simultaneous determination of ethynylestradiol, gestodene, levonorgestrel, cyproterone acetate and desogestrel. **Analytica chimica acta**, v. 588, n. 2, p. 304-315, 2007.
- MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, sporeforming bacteria from raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 52, n. 2, p. 59-62, 1999.

- MATTICK, A. T. R.; HIRSCH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. **Lancet**, v. 5, p. 5-8, 1947.
- MAZZANTI, G.; BATTINELLI, L.; SALVATORE, G. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 5, p. 289–294, Sep./Oct. 1998.
- McAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 285-308, 2001.
- McCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297-2316, 2011.
- McCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 285-330, 2011.
- MCCLINTOCK, M.; SERRES, L.; MARZOLF, J. J.; HIRSCH, A.; MOCQUOT, G. Action inhibitrice des streptocoques producteurs de nisine sur le développement des sporulés anaérobies dans le fromage de Gruyère fondu. **Journal of Dairy Research**, v. 19, n. 2, p. 187-193, 1952.
- MEER, R. R.; BAKER, J.; BODYFELT F. W.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 12, p. 969-979, 1991.
- MICHAEL, C. A.; DOMINEY-HOWES, D.; LABBATE, M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. **Frontiers in public health**, v. 2, p. 145, 2014.
- MINEI, C. C.; GOMES, B. C.; RATTI, R. P.; D'ANGELIS, C. E. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Influence of peroxyacetic acid, nisin and co-culture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 634-638, 2008.
- MIRANDA, A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.
- MIRON, D.; BATTISTI, F.; SILVA, F. K.; LANA, A. D.; PIPPI, B.; CASANOVA, B.; GNOATTO, S.; FUENTEFRIA, A.; MAYORGA, P.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 660-667, 2014.
- MISRA, B. B.; VAN DER HOOFT, J. J. J. Updates in metabolomics tools and resources: 2014–2015. **Electrophoresis**, v. 37, n. 1, p. 86-110, 2016.
- MOSQUEDA-MELGAR, J.; RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MARTÍN-BELLOSO, O. Combination of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices. **Food Microbiology**, n. 25, p. 479-491, 2008.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, B.; Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 614-626, 2000.

- MOZZI, F.; ORTIZ, M. E.; BLECKWEDEL, J.; VUYST, L. D.; PESCUA, M. Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. **Food Research International**, Barking, v. 54, n. 1, p. 1152-1161, Nov. 2013.
- MUHAMMAD, J.; KHAN, S.; SU, J. Q.; HESHAM, A. E. L.; DITTA, A.; NAWAB, J.; ALI, A. Antibiotics in poultry manure and their associated health issues: a systematic review. **Journal of Soils and Sediments**, v. 20, n. 1, p. 486-497, 2020.
- NAJJARI, A.; OUZARI, H.; BOUDABOUS, A.; ZAGOREC, M. Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 3, p. 342-351, 2008.
- NARAYANAN, A., MUYARIKKANDY, M. S., MOOYOTTU, S., VENKITANARAYANAN, K., & AMALARADJOU, M. A. R. Oral supplementation of trans-cinnamaldehyde reduces uropathogenic *Escherichia coli* colonization in a mouse model. **Letters in applied microbiology**, v. 64, n. 3, p. 192-197, 2017.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of Essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451-1474, 2013.
- OLDFIELD, E.; LIN, F. Y. Terpene biosynthesis: modularity rules. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 5, p. 1124-1137, 2012.
- OLIVEIRA, M. M. M. de. **Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica**. 2011. 138 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; DO NASCIMENTO, J. A.; BATISTA, N. N.; PICCOLI, R. H. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed in stainless steel surfaces. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 5, p. 821-832, 2012.
- ONICIUC, E. A.; LIKOTRAFITI, E.; ALVAREZ-MOLINA, A.; PRIETO, M.; LÓPEZ, M.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain. **Current Opinion in Food Science**, v. 30, p. 21-26, 2019.
- OOI, L. S.; LI, Y.; KAM, S. L.; WANG, H.; WONG, E. Y.; OOI, V. E. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **The American journal of Chinese medicine**, v. 34, n. 03, p. 511-522, 2006.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oil on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May. 2007.
- PAL, R. Influence of interfacial rheology on the viscosity of concentrated emulsions, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 356, p. 118-122, 2011.
- PASQUA, R. D.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D. MAURIELLO, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4863-4870, 2007.
- PATEL, S.; AHMED, S. Emerging field of metabolomics: big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 107, p. 63-74, 2015.

PENG, B.; LI, H.; PENG, X. X. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. **Protein & Cell**, v. 6, n. 9, p. 628-637, 2015.

PEREIRA, M. C.; VILELA, C. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F. da; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N. da; PICCOLI, R. H. Inhibition fungi growth through of utilization essential oils of spice. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, July/Ago. 2006.

PEREIRA, I.; SEVERINO, P.; SANTOS, A. C.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 566-578, 2018.

PEY, C. M.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano emulsions prepared by low energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, p. 144-150, 2006.

PRAKASH, B. K. A.; YADAV, A.; KUMAR, A.; SINGH, P. P.; DUBEY, N. K. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1-11, 2018.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)**, v. 38, p. 859-865, 2005.

PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A.; OLIVEIRA, A. B. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 2, p.193-197, Apr. 1998.

PRIETO, A. I.; RAMOS-MORALES, F.; CASADESÚS, J. Repair of DNA damage induced by bile salts in *Salmonella enterica*. **Genetics**, v. 174, n. 2, p. 575-584, Oct. 2006.

RAJKOWSKI, K. T.; BENNETT, R. W. *Bacillus cereus*. In: **International handbook of foodborne pathogens**. CRC Press, p. 47-60, 2003.

RAMOS-NINO, M. E.; CLIFFORD, M. N.; ADAMS, M. R. Quantitative structure activity relationship for the effect of benzoic acids, cinnamic acids and benzaldehydes on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 303-310, 1996.

RAO, A.; ZHANG, Y.; MUEND, S.; RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5062-5069, 2010.

RAO, J.; McCLEMENTS, D. J. Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions. **Food Chemistry**, v. 134, p. 749-757. 2012.

RATHORE, S. S.; SHARMA, L. K.; AGARWAL, D.; SING, B.; SAXENA, S. N. Assessment of variability in leaf essential oil of three coriander (*Coriandrum sativum* L.) genotypes. **International Journal of Seed Spices**, v. 5, p. 86-88, 2015.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; SOBRINO-LÓPEZ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Shelf-life extension of fresh-cut “Fuji” apples at different ripeness stages using natural substances. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 2, p. 265-275, 2007.

- REZENDE-LAGO, N. C. M.; ROSSI, O. D.; VIDAL-MARTINS A. M. C.; AMARAL L. A. Occurrence of *Bacillus cereus* in whole milk and enterotoxigenic potential of the isolated strains. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1563-1569, 2007.
- RIBEIRO, M.; MALHEIRO, J.; GRENHO, L.; FERNANDES, M. H.; SIMÕES, M. Cytotoxicity and antimicrobial action of selected phytochemicals against planktonic and sessile ***Streptococcus mutans***. **PeerJ**, v. 6, p. e4872, 2018.
- RODRÍGUEZ, A.; BATLLE, R.; NERÍN, C. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. **Progress in Organic Coatings**, v. 60, n. 1, p. 33-38, 2007.
- ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design, **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 263, p. 85-94, 2003.
- ROLLER, S.; SEEDHAR, P. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in freshcut melon and kiwifruit at 4° and 8 °C. **Letters in Applied Microbiology**, n. 35, p. 390-394, 2002.
- ROSHAN, N.; RILEY, T. V.; HAMMER, K. A. Antimicrobial activity of natural products against *Clostridium difficile* in vitro. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 1, p. 92-103, 2017.
- RUSSELL, N. J. Mechanism of thermal adaptation in bacteria: Blueprints for survival. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 9, p. 108-112, 1984.
- RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the response of microorganisms to biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 52, n. 5, p. 750–763, Sep. 2003.
- SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E. Delivery systems for liquid food products. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1, p. 61–72, 2010.
- SALIM, H.; HUQUE, K. S.; KAMARUDDIN, K. M.; BEG, M. D. Global restriction of using antibiotic growth promoters and alternative strategies in poultry production. **Science progress**, v. 101, n. 1, p. 52-75, 2018.
- SALUSTIANO, V. C.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. F.; LIMA, J. C.; BERNARDES, L. M. P.; FERNANDES, P. E. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by portpasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 439-442, 2009.
- SALVETTI, S.; FAEGRI, K.; GHELARDI, E.; KOLSTØ, A. B.; SENESI, S. Global gene expression profile for swarming *Bacillus cereus* bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5149-5156, 2011.
- SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 401- 407, 2013.
- SALMOND, C. V.; KROLL, R. G.; BOOTH, I. R. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. **Journal of Geneneral Microbiology**, v. 130, p. 2845-2850, 1984.
- SAMELIS, J.; BEDIE, G. K.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH, G. C. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)**, v. 38, p. 21-28, 2005.

SANDER, J. E.; HOFACRE, C. L.; CHENG, I. H.; WYATT, R. D. Investigation of Resistance of Bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. **Avian Diseases**, Washington, v. 46, n. 4, p. 997-1000, Oct. 2002.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; RIBEIRO, A. R.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 247-250, 2001.

SANTOS, H. P. dos. **Influência da sanificação sobre a qualidade de melão amarelo (*Cucumis melo L.*) minimamente processado**. 2003, 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, p. 467-495, 2004.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 642, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHMANN A. R. Caracterização Físico-química e Estabilidade de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SERVIN, A. L.; COCONNIER, M. H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 741-754, 2003.

SESSOU, P.; FAROUGOU, S.; SOHOUNHLOUÉ, D. Major component and potential applications of plant essentials oils as natural food preservatives: a short review research results. **International of Journal Biosciences**, v. 2, n. 8, p. 45-57, 2012.

SHAHEEN, R.; SVENSSON, B.; ANDERSON, M. A.; CHRISTIANSSON, A.; SALKINOJA-SALONEN, M. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 347-355, 2010.

SHREAZ, S.; WANI, W. A.; BEHBEHANI, J. M.; RAJA, V.; IRSHAD, M.; KARCHED, M.; ALI, I.; SIDDIQI, W.; HUN, L. T. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, v. 112, p. 116-131, 2016.

SIGMA ALDRICH: **Ficha de informações de segurança de produtos químicos: Trans-cinamaldeído 99%**, 2020, Versão 5.0. Disponível em:
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/transcinnamaldehyde132161437110911>>. Acessado em: 3 mar. 2020.

SIGMA ALDRICH: **Ficha de informações de segurança de produtos químicos: Linalol 97%**, 2020, Versão 5.0. Disponível em:
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/linalool154257870611>>. Acessado em: 3 mar. 2020.

SIGMA ALDRICH: **Ficha de informações de segurança de produtos químicos: Citral 95%**, 2020, Versão 5.0. Disponível em:
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/citral15223539240511>>. Acessado em: 3 mar. 2020.

- SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.
- SILVA, A. F.; DOS SANTOS, A. R.; TREVISAN, D. A. C.; RIBEIRO, A. B.; CAMPANERUT-SÁ, P. A. Z.; KUKOLJ, C.; SOUZA, E. M.; CARDOSO, R. F.; SVIDZINSKI, T. I. E.; ABREU FILHO, B. A. A.; JUNIOR, M. M.; MIKCHA, J. M. G. Cinnamaldehyde induces changes in the protein profile of *Salmonella Typhimurium* biofilm. **Research in microbiology**, v. 169, n. 1, p. 33-43, 2018.
- SILVA, H.D.; CERQUEIRA, M.A; VICENTE, A.A. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. **Food and Bioprocess Technology**. v. 5, p. 854-867, 2012.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, p. 467-495, 2004.
- SIVAKUMAR, M.; TANG, S. Y.; TAN, K. W. Cavitation technology—a greener processing technique for the generation of pharmaceutical nanoemulsions. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 21, n. 6, p. 2069-2083, 2014.
- SMIGIC, N.; RAJKOVIC, A.; ANTAL, E.; MEDIC, H.; LIPNICK, B.; UTTENDAELE, M.; DEVLIEGHERE, F. Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 with lactic acid, neutralized electrolyzed oxidizing water and chlorine dioxide followed by growth under sub-optimal conditions of temperature, pH and modified atmosphere. **Food Microbiology**, v. 26, p. 629-637, 2009.
- SMITH, C. A.; WANT, E. J.; O'MAILLE, G.; ABAGYAN, R.; SIUZDAK, G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. **Analytical chemistry**, v. 78, n. 3, p. 779-787, 2006.
- SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nanoemulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, p. 102–110, 2005.
- SOLÉ, I.; MAESTRO, A.; PEY, C. M.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Nanoemulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, p. 138–143, 2006.
- SOLÉ, I.; PEY, C. M.; MAESTRO, A.; GONZÁLEZ, C.; PORRAS, M.; SOLANS, C., et al. Nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method: Preparation variables and scale up. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, n. 2, p. 417-423, 2010.
- SORA, D. I.; UDRESCU, Ş.; ALBU, F.; DAVID, V.; MEDVEDOVICI, A. Analytical issues in HPLC/MS/MS simultaneous assay of furosemide, spironolactone and canrenone in human plasma samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 52, n. 5, p. 734-740, 2010.
- SOUZA, A. A.; DIAS, N. A. A.; PICCOLI, R. H.; BERTOLUCCI, S. K. V. Determination of minimum bactericidal concentration of sixteen essential oils on enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 105-112, 2016.
- SUGAWARA, Y.; HARA, C.; TAMURA, K.; FUJII, T.; NAKAMURA, K.; MASUJIMA, T.; AOKI, T. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. **Analytica Chimica Acta**, v. 365, n. 1-3, p. 293-299, Jun. 1998.
- SUGIMOTO, M.; KAWAKAMI, M.; ROBERT, M.; SOGA, T.; TOMITA, M. Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. **Current bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 96-108, 2012.

- TEUNISSEN, S. F.; ROSING, H.; SCHINKEL, A. H.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H. Bioanalytical methods for determination of tamoxifen and its phase I metabolites: a review. **Analytica chimica acta**, v. 683, n. 1, p. 21-37, 2010.
- TODD, E. C. D.; GREIG, J. D.; BARTLESON, C. A.; MICHAELS, B. S. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. **Journal of Food Protection**, v. 72, n.1, p.202-219, 2009.
- TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Production of bacteriocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, as recorded in the presence of different medium components. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1585–1590, 2005.
- TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; VAZ-VELHO, M. Bacteriocin producing lactic acid bacteria from and for production of salami-like products. **International Review of Food Science and Technology**, v. 25, p. 57-61, 2009.
- TODOROV, S. D.; HO, P.; VAZ-VELHO, M.; DICKS, L. M. T. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. **Meat Science**, v. 84, p. 334-343, 2010.
- TOHGE, T.; FERNIE, A. R. Web-based resources for mass-spectrometry-based metabolomics: a user's guide. **Phytochemistry**, v. 70, n. 4, p. 450-456, 2009.
- TUNON, G. I. L.; NUNES, R. N.; SILVA, T. M.; CALASANS, M. W. M. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* sp. isolada de carne de frango resfriada comercializada em Aracaju, Sergipe. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 52, p. 4-6, 2008.
- UNLU, M.; ERGENE, E.; UNLU, G. V.; ZEYTINOGLU, H. S.; VURAL N. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3274-3280, Nov. 2010.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES. **Toxicology and carcinogenesis studies of trans-cinnamaldehyde (Microencapsulated)**. United States, 2004, NTP TECHNICAL REPORT 514, NIH Publication N° 04-4448, 2004.
- VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Bacterial SOS response: a food safety perspective. **Current opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 136-142, Apr. 2011.
- VAN HOVE, E. R. A.; SMITH, D. F.; HEEREN, R. M. A concise review of mass spectrometry imaging. **Journal of chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 3946-3954, 2010.
- VENÂNCIO, A. M. **Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), em *Mus musculus* (camundongos)**. 2006. 108p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2006.
- VIRIATO, A. Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida Berkhout*, causadoras de infecções hospitalares. **Mundo saúde (1995)**, v. 38, n. 1, p. 40-50, 2014.
- WEI, C. I.; COOK, D. L.; KIRK, J. R. Use of chlorine compounds in the food industry. **Food Technology**, n. 1, p. 107-115, 1985.

WEISS, J.; GAYSINKSY, S.; DAVIDSON, M.; MCCLEMENTS, J.; Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. **IUFoST World Congress Book: Global Issues in Food Science and Technology**. Elsevier Inc., Amsterdam, 2009.

WEN, B.; COE, K. J.; RADEMACHER, P.; FITCH, W. L.; MONSHOUWER, M.; NELSON, S. D. Comparison of in vitro bioactivation of flutamide and its cyano analogue: evidence for reductive activation by human NADPH: cytochrome P450 reductase. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 12, p. 2393-2406, 2008.

WIJNANDS, L. M.; DUFRENNE, J. B.; VAN LEUSDEN, F. M. **Characterization of *Bacillus cereus***. Dutch National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Holanda, 2002. Disponível em: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/250912002.pdf>. Acesso em: 28 out. 2019.

WILEY, R. C. Introduction to minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits & vegetables**, New York: Chapman & Hall, p. 1-14, 1994.

WINKELSTRÖTER, L. K.; GOMES, B. C.; THOMAZ, M. R. S.; SOUZA, V. M.; DE MARTINIS, E. C. P. *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 22, p. 1404- 1407, 2011.

WISHART, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 9, p. 482-493, 2008.

WOOSTER, T. J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. **Journal of the American Chemical Society**. v. 24, p. 12758–12765, 2008.

YUK, H. G.; MARSHALL, D. L. Adaptation of *Escherichia coli* O157: H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3500-3505, 2004.

ZHELJAZKOV, V. D.; CALLAHAN, A.; CANTRELL, C. L. Yield and oil composition of 38 basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions grown in Mississippi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 241-245, 2008.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Metabolomic approach of cross-adaptation in *Salmonella* ssp. induced by major compounds of essential oils

Artigo será submetido de acordo com as normas da revista Food Control (FI: 4.24)

Abstract

Food industry environments are continuously focus of concern in terms of health security due potential microbiological pathogens. Additionally, cross-adaptation phenomena in bacterial populations induced by sublethal doses of antibacterial solutions are a major problem in food safety field. In this regard, essential oils and its major compounds appear as an alternative to common sanitizers in food industry environments, although, deeper studies are still needed to fully comprehend their secure applicability. In order to prevent bacterial adaptation to sanitizers, a different approach is needed to identify, understand and predict the occurrence of highly-tolerant bacteria. Therefore, the search for new options for prevention and elimination of biofilms of pathogenic bacteria without threatening the quality of food products is equally pertinent as the necessity for a better comprehension of cellular stress mechanics induced by sublethal doses of antimicrobial agents. Thus, the aim of this work was to evaluate the untargeted metabolomic analyses of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis previously exposed to sublethal doses of cinnamaldehyde, citral and linalool. Preliminary tests exhibited adaptation phenotype of planktonic and sessile cells of *S. Enteritidis* when exposed to sublethal doses of linalool, resulting in tolerance to previous lethal concentrations of citral. Therefore, the relative frequency and abundance of metabolites of samples treated with sublethal doses of terpenes (citral and linalool) were closely similar exhibiting equivalent cellular responses. Finally, the discriminant analysis of Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) provided a comprehensive insight of similarity amongst treatments leading to conclude that this model is well-fit to detect and predict possible adaptation and cross-adaptation phenomena between pathogenic bacteria against natural compounds of essential oils.

Keywords: bacterial tolerance; biofilm; terpenes; untargeted metabolomics; discriminant analysis.

Introduction

In the food industry, the group of microorganisms with the highest predominance in contaminated surfaces and equipment is bacteria due to high multiplication rates, great adaptability and production of extracellular substances and structures (SIDDIQUI et al., 2015). It is well known that bacteria of the genus *Salmonella* can form resistant and persistent biofilms on common surfaces in the food industry. Hence, it can explain the high number of outbreaks of foodborne diseases worldwide. For instance, about 1.2 million *Salmonella*-related cases occur annually in the U.S. (CDC, 2019).

Several stages of food processing are vulnerable to possible sources of microbial contamination, especially in the form of biofilms. Thus, active ingredients based on acids and inorganic bases become inefficient in sanitification process after continuous and prolonged use (KUMAR; MICALLEF, 2017). Also, the inappropriate use of antimicrobial agents in industry has contributed to the emergence of tolerant microorganisms, which endangers the safety of food products. In this regard, stressor agents in mild concentrations can induce the occurrence of cellular modifications in genetic expression, proteomic and metabolomic profiles (CABRAL et al., 2016).

As a result, bacterial populations develop the ability to survive the exposure of common sanitizers triggering resistance to several types of antibiotics. In addition, mechanisms of cross-adaptation in complex microbial communities, such as biofilms, reduce the potential of entire groups of natural compounds (e.g. terpenes) in the control and prevention of bacterial strains (BUZÓN-DURÁN et al., 2017). Therefore, it opens a gap in the prevention and control of resistant serotypes of pathogenic bacteria, such as *Salmonella ssp.*, turning them adapted to previously effective concentrations.

The maintenance of microbiologically safe environments in food industries is an unceasing ideal nowadays. In this context, technological innovations that predict and prevent bacterial tolerance and adaptation are sought with the purpose of ensuring food safety, prolonging the shelf-life of food products and satisfying consumers (MOTA; JUNIOR; CHIARI-ANDRÉO, 2017). Hence, the reduction or suppression of chemical additives associated with food is also considered a market trend. In this regard, the search for alternatives that do not harm the health of the population have led to the employment of natural products (AMUKA et al., 2017).

Natural products, especially those obtained from plant extracts, act in a non-specific way in the microbial cells, without a definite target site. Vital bacterial regions such as membrane, cellular proteins and genetic material (DNA and RNA) are more vulnerable to the action of natural antimicrobials (KALILY et al., 2016). In this context, essential oils are attractive options, as their major components can cause structural and functional damage to the bacterial cell membrane, intracellular proteins and enzymes (CLEMENTE et al., 2016).

Essential oils have been used in popular medicine as an alternative treatment for a set of diseases. Moreover, the effect of essential oils has been widely tested in several studies and used as a promising option in controlling pathogenic and spoilage microbial strains in food (MIRANDA et al., 2016; DIAS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2012). Even though, essential oils and/or its major compounds

are still susceptible to bacterial adaptation and cross-adaptation phenomena even considering the non-specific mode of action in cells. As can be seen in several studies, sublethal doses of natural compounds triggers physiological responses which consolidate metabolic and enzymatic apparatus in order to fortify the bacterial population against next exposures.

Accordingly, a growing interest in understanding the mechanisms involved in the adaptation of microbial cells to environmental conditions has been emphasized, since antimicrobial resistance is also a problem of food safety (CAPALONGA et al., 2014). In this context, metabolomic analyses propose an advanced study for visualization of the pattern and the level of adaptation on such adverse conditions. Yet, it becomes necessary to elucidate the mechanisms involved in the microbial response (e.g. expulsion or consumption of active compounds) against chemical stressor agents. Therefore, the presence and relative abundance of cellular metabolites are subject great importance nowadays since the over or under expression of cellular compounds can be decisive in bacterial survival.

Untargeted metabolomic analysis emerges as an important tool to discover, quantify and compare profiles of microorganisms of relevance in the food sciences. In addition, functional analysis of metabolites can provide a starting point for the correlation of data obtained with metabolic pathways, which provide pertinent information regarding bacterial behavior in susceptibility tests (CAMERON; TAKÁTS, 2018). Thus, a metabolic profile approach identified in pathogenic bacteria can associate the presence and quantity of such metabolites with biological roles, such as adaptive responses to sublethal exposures to stressor agents (MALLICK et al., 2017).

Peng, Li and Peng (2015) state that metabolomic analyses arise to discover not only metabolites of cells or organisms under different conditions, but also to assess the frequency and relative abundance of exogenous metabolites, which have been named as discovery metabolomics. Therefore, such analyses can provide an instant overview of the physiological state of cells and indicate how the metabolic profile of a complex biological system is altered in response to stress, such as adverse factors or physiological adaptation to changes (PATEL; AHMED, 2015; GIBBONS; O'GORMAN; BRENNAN, 2015).

Furthermore, the metabolomic untargeted analyses of exposed cells to sublethal stress become visible as a semi-quantitative tool for identification and comparison among fundamental and stressed condition of cells. Additionally, the ultra-high-performance liquid chromatography coupled with Electron-Spray, as source of ionization, and Quadruple Time-of-Flight mass spectrometry (UHPLC-ESI-QTOF-MS), can be considered as the state-of-the-art technology in this context. Hence, a discriminant analysis of OPLS in face of the heatmap and clustering tools of the metabolomic post-tests may establish the correspondence between the physiological effect of sublethal exposure to natural compounds and the relative frequency and abundance of metabolites in bacterial samples.

In this regard, a plenty of research focused on omics analyses are developed to observe stress responses of bacterial pathogen strains. Still, a precise and comprehensive study of natural compounds, such as terpenes and phenylpropanoids, appearing as potential source of cross-adaptation in pathogenic bacteria represent a pertinent subject of investigation. Accordingly, the aim of this study was to perform

the untargeted metabolomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis previously exposed to sublethal doses of major compounds of essential oils: cinnamaldehyde, citral and linalool, in order to verify the occurrence of cross-adaptation profiles in both phenotype and metabolomic perspectives.

Materials and Methods

Microorganisms and major compounds

The bacterial strains of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis S64 and Typhimurium S190 were cordially supplied by LABENT (Laboratory of Enterobacteria) from FIOCRUZ (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil). Stock cultures were stored at -20 °C during the study. Subsequently, they were thawed at room temperature and reactivated by inoculating 100 µL aliquots into tubes containing 10 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) (Hi-Media, Mumbai, India) followed by 37°C/24 h incubation. The major components cinnamaldehyde (99%), citral (95%) and linalool (97%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Susceptibility tests

The minimum bactericidal concentration (MBC) of the major components cinnamaldehyde, citral and linalool were determined using microdilution on 96-well polystyrene plates, according to NCCLS (M7-A10) (CLSI, 2018) with adaptations. TSB solutions with addition of 0.5% Tween 80 and each major component were prepared at the concentrations of: 0.015; 0.03; 0.06; 0.12; 0.25; 0.50; 1.00; and 2.00 % (v/v). Aliquots of 10 µL of standardized culture (2×10^8 CFU mL⁻¹) were added into the wells containing 190 µL of TSB medium (final inoculum at concentration of 1×10^6 CFU mL⁻¹). Then, microplates were incubated at 37°C for 24 h. After this time, three aliquots of 10 µL from each well exhibiting cultures with positive growth were plated in Petri dishes containing Tryptic Soy agar (TSA) (Hi-Media, Mumbai, India) using the microdroplet technique. Finally, Petri dishes were incubated at 37°C for 24 h for confirmation of positive growth.

To obtain the biofilm minimum bactericidal concentration (BMBC) of major compounds, biofilms were formed in the wells of the microplates after the inoculation of aliquots (50 µL) of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* standard cultures in 150 µL of TSB and incubation at 37°C for 48 h. After this time, the cultures were removed and the wells washed three times with 0.85 % NaCl solution (w/v) to remove unbounded cells. Subsequently, aliquots of 200 µL of aqueous solutions of major components containing 0.5 % Tween 80 (v/v) were added into the wells in order to test the biofilm susceptibility. The concentrations used were: 0.015; 0.03; 0.06; 0.12; 0.25; 0.50; 1.00; and 2.00 % of cinnamaldehyde and citral, while linalool concentrations were: 1.00; 2.00; 3.00; 4.00; 5.00; 6.00; 7.00; and 8.00 %.

In order to quantify the obtained biofilms, the optical densities of grown cultures were measured (600 nm) using technique described by Merritt, Kadouri and O'Toole (2011) with adaptations. Thus,

biofilms were classified according to Stepanović et al. (2000). The final values were the arithmetic means of the obtained absorbance readings within 8 replicates.

Adaptation and cross-adaptation tests

For the adaptation tests, cultures of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* were exposed to sub-lethal concentrations of the major essential oil components ($\frac{1}{4}$ of the obtained MBC) (DI PASQUA et al., 2010). Subsequently, the same concentrations of cinnamaldehyde and linalool BMBC tests were used and new concentrations of citral (0.25; 0.50; 1.00; 2.00; 3.00; 4.00; 5.00; and 6.00 %) were tested.

In order to verify the occurrence of cross-adaptation, the *Salmonella* samples were cultured for 48 h in TSB medium containing 0.5 % Tween 80 (v/v) and the addition of sub-lethal concentrations (0.06% linalool for *S. Enteritidis*; 0.03% linalool for *S. Typhimurium*; 0.015% cinnamaldehyde for both serotypes; and 0.06% citral for both serotypes) of a given major component and tested against the two other major components used in the present study.

Untargeted profiling of *S. Enteritidis* metabolites by UHPLC-QTOF mass spectrometry

An aliquot of each treatment of *S. Enteritidis* standard culture (1×10^6 CFU mL⁻¹) was collected in amber vials for the metabolomics-based profiling. In particular, a 1290 liquid chromatograph was coupled with a G6550 mass spectrometer detector via a Dual Electrospray Jet Stream ionization system (all from Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The UHPLC-QTOF instrumental conditions for the analyses of metabolic compounds of *S. Enteritidis* were adapted from Rocchetti et al. (2019). Briefly, a reverse phase chromatographic separation, using an acetonitrile-water binary gradient (5% to 90% acetonitrile in 34 min) was adopted. Besides, formic acid 0.1% (v/v) was added to both phases. The mass spectrometer worked in FULL SCAN mode with a nominal resolution at 30,000 FWHM and in positive polarity. For the mass-acquisition, a range of 100–1100 m/z was set up. The injection volume was 6 μ L considering three replicates for each sample.

Raw metabolomic data were aligned and deconvoluted using the Agilent Profinder B.06 software and then annotated according to the ‘find-by-formula’ algorithm, using the combination of monoisotopic accurate mass and the entire isotopic pattern (i.e., isotopic spacing and isotopic ratio) against Metacyc, the comprehensive database on metabolic compounds available online (<http://metacyc.org>). A mass accuracy tolerance below 5-ppm was used for annotation purposes, and features were recursively identified using a retention time tolerance of ± 0.1 min for alignment (ROCCETTI et al., 2018, 2019). This approach allowed gaining a higher confidence in the annotation step and was in compliance to the Level 2 of identification (i.e., putatively annotated compounds), as previously reported by COSMOS Metabolomics Standards Initiative (<http://cosmos-fp7.eu/msi>). The Agilent Profinder B.06 software was used also for the post-acquisition data filtering: only those compounds putatively annotated within 100% of replications in at least one condition were retained.

Statistical analyses

The Mass Profiler Professional B.12.06 (Agilent technologies) was then used for the elaboration of the untargeted UHPLC/QTOF data by unsupervised hierarchical cluster analysis (HCA), based on the fold-change heat map, as previously reported (ROCCHETTI et al., 2019). Thereafter the raw metabolomic dataset was exported and elaborated into SIMCA 13 software (Umetrics, Malmo, Sweden) by supervised Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) multivariate statistics. For the OPLS model, raw data were Log₂ transformed, UV scaled and then analysed by OPLS-DA. The variation between the groups was separated into predictive and orthogonal (i.e., related to technical and biological variation) components. The presence of outliers into the OPLS model was checked according to Hotelling's T₂ (i.e., the distance from the origin in the model), using 95% and 99% confidence limits for suspect and strong outliers, respectively.

The model cross-validation was then carried out using CV-ANOVA ($p < .01$), whereas permutation testing ($N = 100$) was done to exclude overfitting. Model parameters, i.e., R²Y (goodness-of-fit) and Q²Y (goodness-of-prediction) were also recorded. Afterwards, the variables selection methods namely VIP (i.e., variable importance in projection) was used to evaluate the importance of each metabolic and to select those having the highest discrimination potential (VIP score > 1.85). Finally, a Fold-Change (FC) analysis was carried out considering the UHPLC/QTOF data, in order to evaluate in detail, the impact of sublethal exposure of different compounds in *S. Enteritidis*.

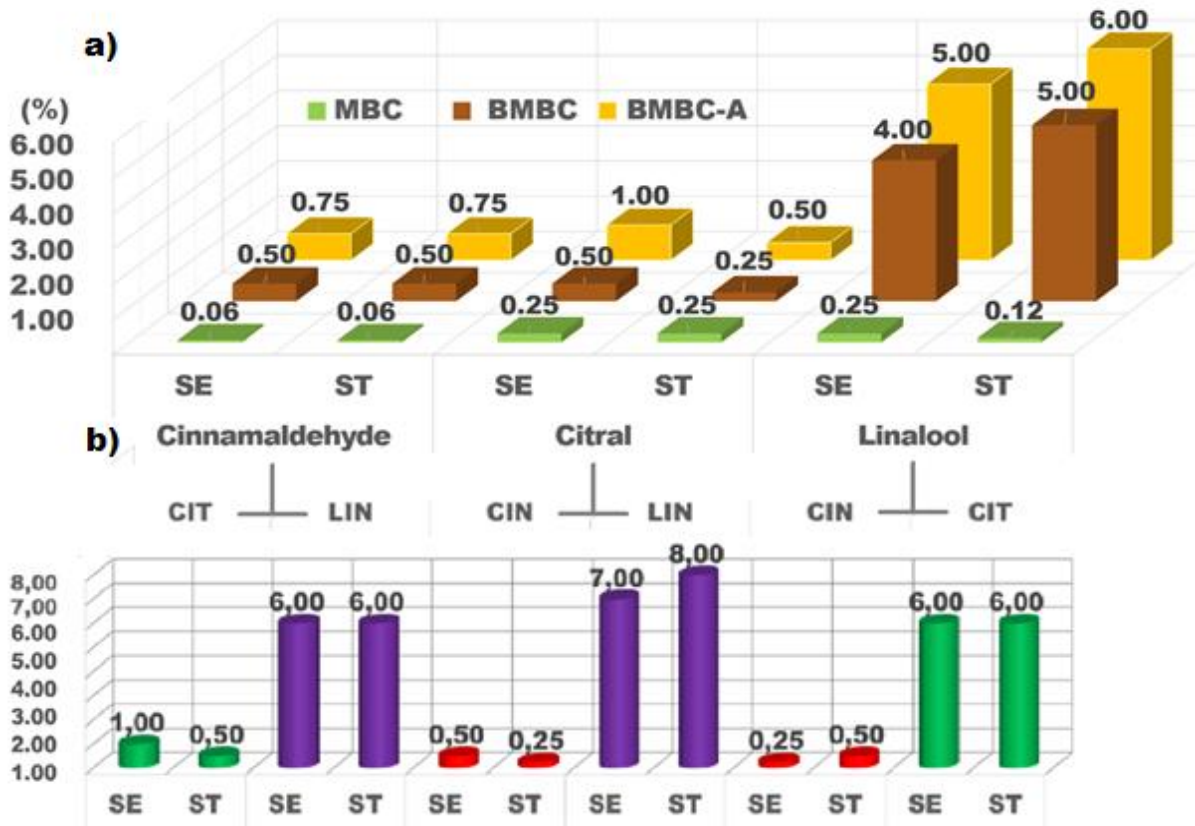
Results and Discussion

Susceptibility, adaptation and cross-adaptation tests

The Minimum Bactericidal Concentration (MBC), biofilms MBC (BMBC), adapted cells (BMBC-A) and cross-adaptation tests of cinnamaldehyde, citral and linalool are shown in Figure 1 (sensitivity tests in section “a” and cross-adaptations in section “b”). Cinnamaldehyde totally inhibited the growth of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* planktonic cells at the concentration of 0.06% (v/v). Proving the potential of using natural products as sanitizing agents, Beraldo et al. (2013) found MBCs of $>0.02\%$ using cinnamon essential oil (67.58% cinnamaldehyde) and of 0.04% for the use of clove essential oil (77.58% eugenol) against *Salmonella* sp. in comparison to MBC of sodium hypochlorite (0.2%), a common sanitizer in food industry.

The bactericidal action of phenylpropanoids, such as cinnamaldehyde, and terpenes, such as citral and linalool, is still not fully understood. However, it is known that they cause the rupture of the bacterial cell membrane considering the lipophilic nature of these compounds (COWAN, 1999). The distortion of the physical structure of the cell and consequent membrane destabilization modify the cell permeability, causing denaturation of essential enzymes and alteration of proton motive force. These changes result in variations in pH and electrical potential, and finally, loss of intracellular material such as ions, ATP and nucleic acid (TROMBETTA et al., 2005).

Figure 1 – Sensibility (a) and Cross-adaptation tests (b) of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*.



SE - *Salmonella* Enteritidis; ST - *Salmonella* Typhimurium; MBC – Minimum Bactericidal Concentration; BMBC – Biofilms Minimum Bactericidal Concentration; BMBC-A – Biofilm Minimum Bactericidal Concentration of Adapted cells; CIN – Cinnamaldehyde; CIT – Citral; LIN – Linalool.

It is also highlighted that the effect of linalool was drastically affected by biofilm formation of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* requiring up to 4.00 to 5.00 % (v/v) to full inhibition of growth. On the other hand, the other terpene (citral) exhibited the best performance compared to the other components, especially against *S. Typhimurium* sessile cells. The results obtained corroborate with Adukwu et al. (2012) testing resistant strains of *S. aureus* against lemongrass oil containing 33% of geranial and 47% of neral (both citral isomers). Authors stated that the component has high anti-biofilm activity at concentrations of 0.06 to 0.12% (v/v). Thus, the present study exposes a discrepancy of the effect exhibited by linalool (eight times less efficient than cinnamaldehyde and citral against *S. Enteritidis* biofilms and 20 times less efficient than citral for *S. Typhimurium*).

Adaptation to sub-lethal concentrations of sanitizing agents is a common event among pathogenic bacteria as occurred in *Salmonella* Typhimurium with hypochloric acid (BELESSI et al., 2011; MØRETRØ et al., 2012), *E. coli* colonies with the use of trisodium phosphate, sodium nitrite and sodium hypochlorite and in *Listeria monocitogenes* with peracetic acid, chlorine and quaternary ammonium salts (CAPITA et al., 2014; ALONSO-CALLEJA et al., 2015).

Zhang et al. (2014) attributed anti-biofilm properties to citral and cinnamaldehyde with reduction of auto-inducing elements of bacterial communication signals (AI-2) in *S. aureus* and *S. Enteritidis*. Also, Korenblum et al. (2013) obtained MBC and sub-lethal concentrations of 0.17 mg/mL and 0.085 mg/mL, respectively, using citral and lemongrass oil against *Desulfovibrio alaskensis*. In this case, the exposure of cells (10^5 CFU/mL) to the major components, for 24 hours, reduced 1 log of the planktonic cell population and caused elimination of biofilms grown on glass and steel coupons stained with iodinated propidium, whereas the control group exhibited populations of 10^7 CFU/mL⁻¹.

In the present study, cross-adaptation tests evaluated the bactericidal action of major components after exposing *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* planktonic cells to other major component present in study in sublethal concentrations. Thus, the cross-adapted BMBCs results were also similar to those obtained in the adaptation tests of planktonic cells using $\frac{1}{4}$ of the MBCs reported in susceptibility tests.

As observed in the Figure 1 (lower section), after exposure to sub-lethal doses of citral in *S. Typhimurium* and of linalool in *S. Enteritidis*, cinnamaldehyde obtained increased efficiency when compared to previous tests (upper section). Linalool required increased concentrations (6%) to eliminate serotypes of *Salmonella* adapted to sub-lethal doses of cinnamaldehyde and citral, demonstrating the high potential for bacterial adaptive response.

Alonso-Calleja et al. (2015) investigated factors of adaptability related to cell physiology. Efflux pumps and changes in hydrophobicity of the cell surface in strains of *E. coli* were submitted to cross-adaptation with the use of common sanitizing agents in the food industry. The authors considered that precautionary measures should be taken when using sublethal concentrations because of the highly efficient ability of several inhibitory factors when used together.

As can also be noticed in Figure 1, when both serotypes were previously exposed to sublethal doses of linalool and then tested against citral, they revealed higher tolerance against it demanding increased concentrations (6.00 %) to inhibit the biofilm formation, confirming cross-adaptation behaviour in *Salmonella* serovars. The previous exposure to linalool may have promoted enzymatic alteration in the mechanism of bacterial resistance to terpenes, resulting in the increased tolerance to citral. These findings suggest that alternated cycles of application of sanitizing agents in industrial environments may not be efficient in the microbiological control and safety if precaution measures in regard to sublethal doses are not considered.

According to the classification adopted (STEPANOVIĆ et al., 2000), the results presented in Table 1 indicate that *S. Enteritidis* strains are strong biofilm promoters, while *S. Typhimurium* exhibit moderate biofilm formation capacity of unexposed cells. Yet, as can be seen in Table 2, a considerable increase in the mean of measured optical densities for adapted biofilms in comparison to those not exposed to sub-lethal stress (four times higher than negative control). Therefore, *S. Typhimurium* was classified as strong biofilm promoter. These data confirm the intensification of the tolerance to major components in biofilms of the *Salmonella* serotypes caused by adaptation in the planktonic phase.

Table 1 - Spectrophotometric measurements of biofilms of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*

Biofilm formation in microplate			
	Odb	Odcn	Classification
<i>S. Enteritidis</i>	0.29805	0.05144	Strong.
<i>S. Typhimurium</i>	0.14591	0.05246	Mod.

Odb – Optical density of biofilm; Odcn – Optical density of negative control; Strong. – Strongly biofilm forming; Mod. – Moderately biofilm forming.

Table 2 - Spectrophotometric measurements of biofilm formation.

	Cinnamaldehyde			Citral			Linalool		
	Odb	Odcn	Class.	Odb	Odcn	Class.	Odb	Odcn	Class.
<i>S. E.</i>	0.5537	0.0503	Strong.	0.4082	0.0532	Strong.	0.4006	0.0509	Strong.
<i>S. T.</i>	0.1825	0.0564	Mod.	0.2058	0.0585	Mod.	0.3157	0.0571	Strong.

S. E. – *Salmonella* Enteritidis; *S. T.* – *Salmonella* Typhimurium; Odb – Optical density of biofilm; Odcn – Optical density of negative control; Class. – Classification; Strong. – Strongly biofilm forming; Mod. – Moderately biofilm forming.

Espina et al. (2015) tested clinical isolates of *S. aureus* submitted to sublethal doses of carvacrol, citral and limonene (separately) for 8 hours indicating a decrease of bacterial population (1.5 log CFU mL⁻¹) while the negative controls for major components increased from 10⁷ to 10⁸ CFU/mL⁻¹. Authors state that the incubation time should be considered as important factor for comparison purposes between bacterial strains. In addition, these authors suggest that major components affect cell viability still during the planktonic phase, which may alter the biofilm formation cycle. This fact would explain the difference in cell mass observed in the presence/absence of major components.

Untargeted metabolomic analyses using UHPLC-ESI-QTOF-MS

The untargeted metabolomic analyses in *S. Enteritidis* treatments revealed 3483 putatively annotated compounds (according to the level of identification as established by the COSMOS Metabolomics Initiative). In this way, the MetaCyc database (metacyc.org) was used exploring the IDBrowser identification approach provided by the Mass Profiler Professional (Agilent) software. All treatments: cinnamaldehyde (CIN); citral (CIT); and linalool (LIN) were submitted to a fold-change analysis compared to negative control treatment without exposure to sublethal stress (named “No stress”). This analysis allowed observing 276 compounds ranging from at least 1 log in relative abundance (expressed positively or negatively) when compared to negative control.

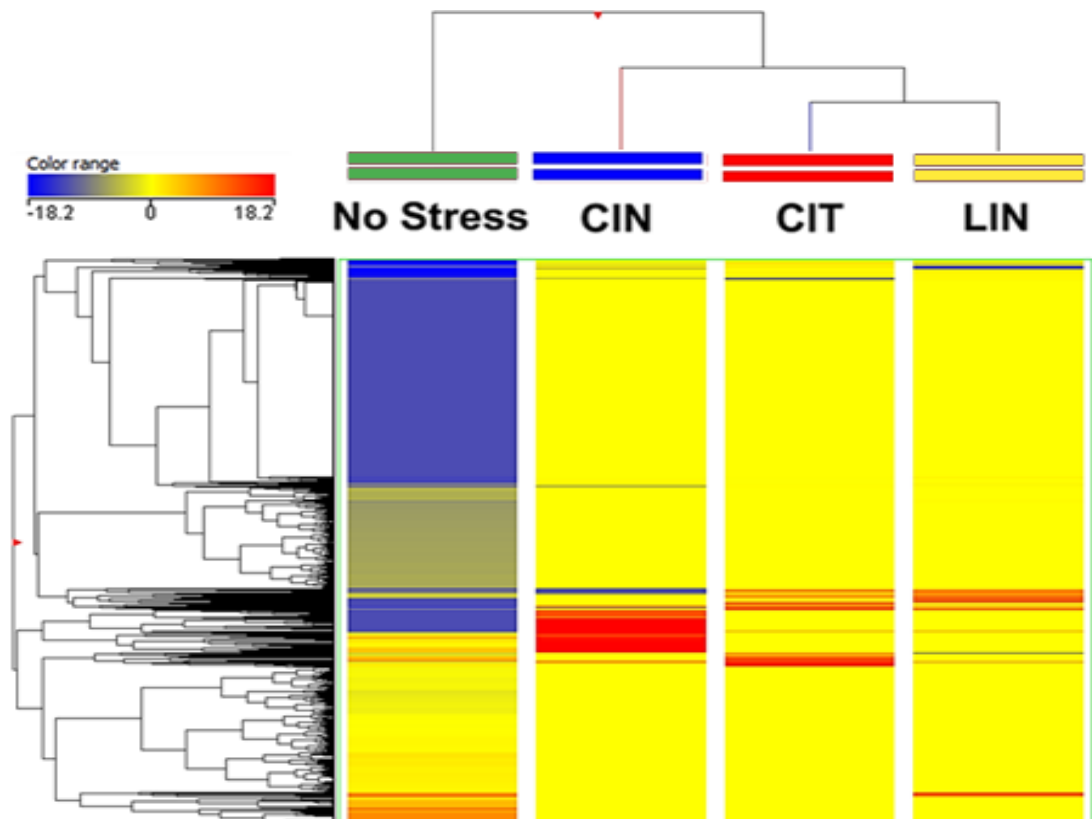
The selection method of VIP markers (variable importance in projection) was used to separate metabolites that have the highest prediction score. Thus, 107 metabolites were characterized by a VIP score >1.85. These compounds have proven to be the most discriminating metabolites and,

consequently, the most critically involved in cell changes during sublethal stress. Most of these compounds are represented by the groups of metabolites involved in secondary metabolite degradation processes, such as terpenoids, followed by biosynthesis of fatty acids and lipids, and antibiotic derivatives.

In this context, sublethal stress responses in *S. Enteritidis* triggers survival mechanisms aimed primarily at neutralizing harmful exogenous compounds (e.g., terpenoids) and synthesis of membrane and cell wall precursors (fatty acids and lipids). The presence of antibiotics in this section is characterized by the nonspecific response of bacteria, in which the synthesis of such compounds may be related to a stress-mediated condition, a fact that is important for tolerance to a possible subsequent exposure to similar compounds.

Subsequently, the hierarchical cluster analysis (HCA) of the analyzed treatments exhibits sets of distinct metabolic profiles (Figure 2). In such data, it is possible to observe that negative control (No Stress) and CIN treatment exhibited statistically different frequencies and abundances of metabolites compared to CIT and LIN treatments. Accordingly, this information can be directly associated with the absence of cross-adaptation events in bacteria exposed to CIN sublethal stress.

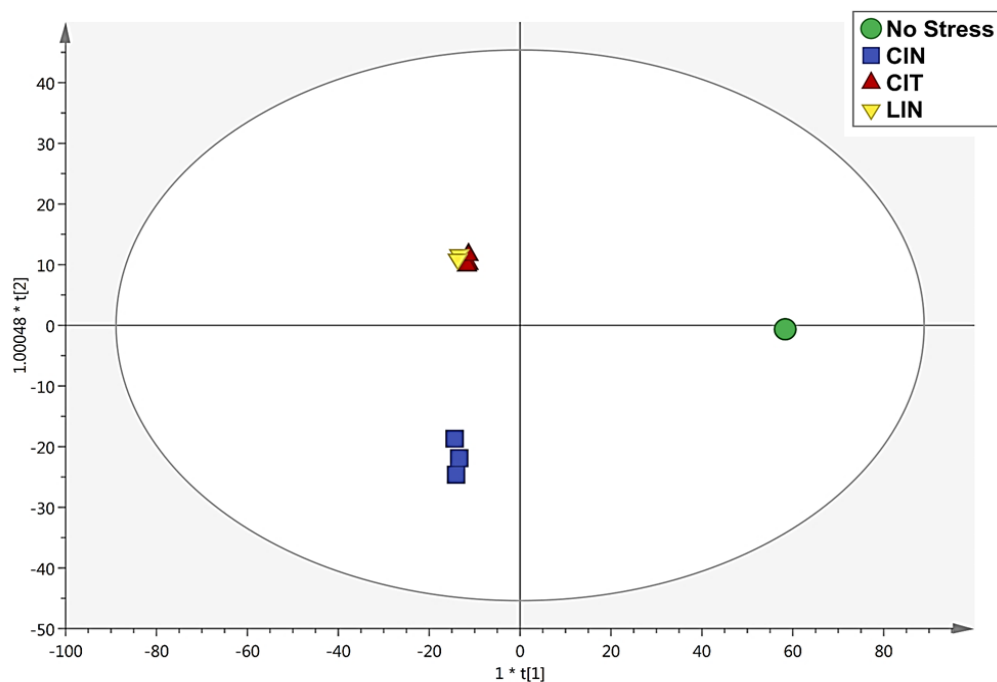
Figure 2 - Heatmap and Clustering of *S. Enteritidis* treatments.



CIN – Cinnamaldehyde; CIT – Citral; LIN – Linalool

In connection with cross-adaptation tests, the OPLS-DA analysis (Figure 3) revealed strong statistical similarities in the treatments of bacteria that suffered sublethal stress of CIT and LIN. This fact means that these two conditions produce an almost identical set of identified compounds and it is possible to infer that a similar set of enzymes and regulatory factors is formed, leading to sharing very similar pathways of degradation of terpenes.

Figure 3 - OPLS-DA of *Salmonella* Enteritidis treatments.



In addition, the "Pathway Tools Omics Dashboard" tool (metacyc.org) was a useful tool to perform a more in-depth analysis of the cellular response induced to sublethal stress of CIN, CIT and LIN (Figure 4). Overall, it was observed that CIN treatment in *S. Enteritidis* produced higher relative frequencies and abundances of metabolites (only VIP markers) involved in biosynthesis, degradation, energy-related processes and other pathways (inorganic nutrient metabolism and detoxification) when compared to CIT and LIN treatments. It is also noticed that the metabolites identified in CIT and LIN treatments occur regularly in similar relative abundances and frequencies, reinforcing evidence of sharing analogue mechanisms mediated by sublethal stress in *S. Enteritidis*.

In regard to the specific metabolites found in the VIP marker approach, stress mediated by sublethal doses of CIN significantly increased the relative abundance of amino acids (cysteine and histidine), sterols (30-oxolanoesterol), sphingolipids (2-hydroxyhexadecanal), tocotrienols (vitamin E), sulfur containing cytokinins (O-acetyl serine), prostaglandins (Ai, C1, F2a), leukotrienes (leukotriene B4), lipoxins (HPETE), L-arginines (γ -glutamyl-L-putrescine), L-carnitines (γ -butyrobetaine), N-acetyl derived compounds, trienoates, salicylates and phenylethylacetate. The most abundant phenylpropanoid derivatives in this cluster were eugenol and similar isomers (isogenol and pseudoisogenol), which indicates a possible process of cinnamaldehyde detoxification within the cell.

On the other hand, the classes of metabolites that were increased in the CIT and LIN treatments were the metabolites involved in the degradation of aromatic compounds such as gallates, methyl gallate, vanillin and protocatechuates. It was also observed that all treatments showed a significant increase in biosynthesis of guanine, siderophores (e.g.: hydroxy-L-ornithine), folates (4-aminobenzoate), phyloquinones (dimethyl phyloquinone), nitrogenous secondary compounds (sarpagine), homocarnosine and D-alanyl-D-serine.

An important observation between the identified terpenes involved in the biosynthesis of secondary metabolites (Figure 5) in regard of negative control (No Stress treatment), is that 84% (16 out of 19) were overexpressed in the treatment submitted to sublethal stress of CIN, which is a phenylpropanoid, and underexpressed in treatments CIT and LIN. Simultaneously, 64% (9 out of 14) phenylpropanoid derivatives were found in greater quantity in CIT and LIN treatments, which are compounds belonging to the terpene class.

These data allow us to infer that many of the compounds are intermediate in convergent pathways between phenylpropanoids and terpenes resulting, hypothetically, in conversion of derivatives of both pathways with various metabolic functions without necessarily culminating in phenotypes of cross-adaptation. As proposed in previous analyses (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015), adaptation tests in which sublethal doses of linalool can induce a condition of citral tolerance in *S. Enteritidis*, cross-adaptation induced by terpenes can be deduced by a high percentage of similarity in the frequencies and relative abundances of metabolites (97% of VIP markers) found in both bacteria treatments that suffered sublethal stress of CIT and LIN.

The verification of the activation of convergent metabolic pathways can be performed through two alternatives: using metabolic flow tests using reactive carbon species, or the analysis of expression of genes of interest. The RNA extraction and amplification using real-time PCR specific gene transcripts support the correlation of data observed in metabolomic analyses with the quantification of expression of genes of interest (TANG; TANG; BLANKENSHIP, 2011). Future research is necessary to elucidate the participation of genes from both metabolic pathways (degradation of phenylpropanoids and terpenes) in treatments analyzed in *S. Enteritidis*.

Conclusion

The prudent administrating and monitoring of chemicals use in all food chain are a key factor to prevent antimicrobial tolerance. In this regard, the metabolomic approach on *Salmonella* Enteritidis exhibited an important insight over cross-adaptation induced by sublethal doses of major compounds of essential oils proving that many pathways may be involved in bacterial tolerance. Finally, a comprehensive discriminant analysis of OPLS proved to be an interesting predictive model for adaptation events in pathogenic bacteria in view of global engagement for preventing and controlling foodborne outbreaks.

Figure 4 - Classification of VIP markers identified compounds in *S. Enteritidis* untargeted metabolomic analyses.

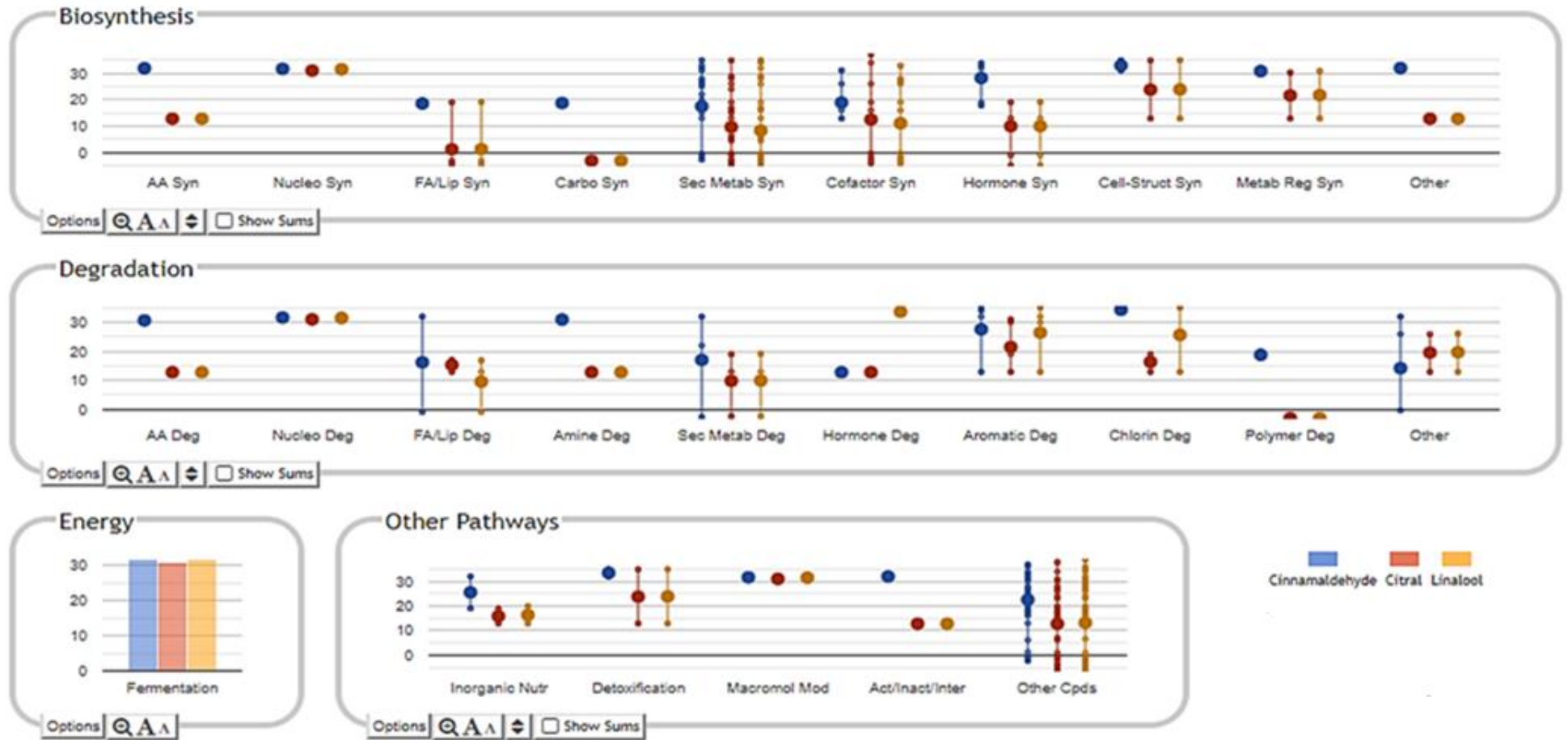
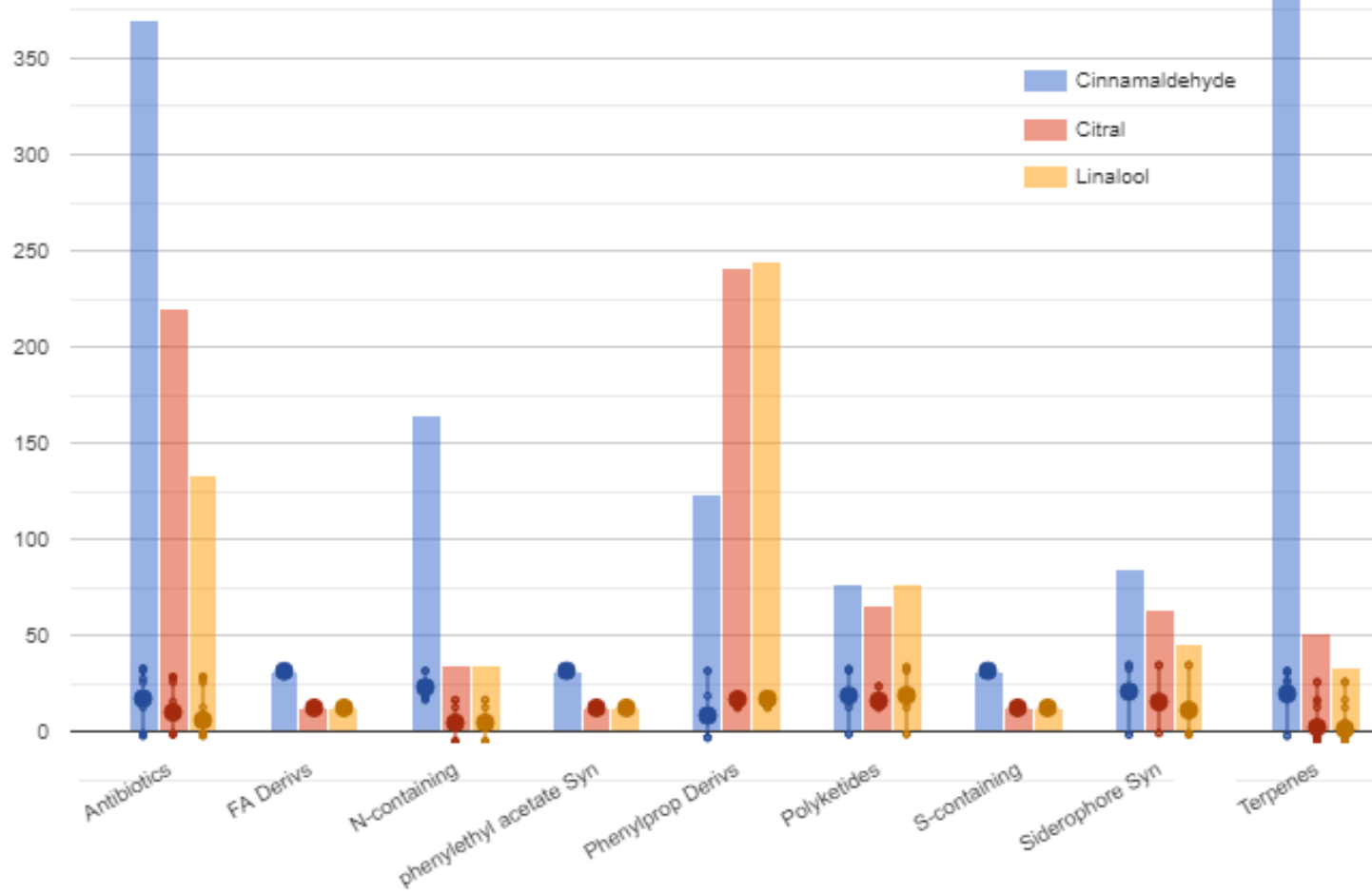


Figure 5 - Metabolites involved in the secondary metabolite biosynthesis of treatments *S. Enteritidis*.



References

- ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1217–1227, Aug. 2012.
- ALONSO-CALLEJA, C.; GUERRERO-RAMOS, E.; ALONSO-HERNANDO, A.; CAPITA, R. Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. **Food Control**, v. 56, p. 86-94, Oct. 2015.
- AMUKA, O.; TARUS, P. K.; RUTTOH, E. K.; MACHOCHO, A. K.; OKEMO, P. O. Natural extractives and the role they play in human health. **Gastroenterology and Liver Clinical and Medicals**, v. 1, p. 1-13, 2017.
- BELESSI, C. E.; GOUNADAKI, A. S.; PSOMAS, A. N.; SKANDAMIS, P. N. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions . **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, s. 1, p. 46-52, Mar. 2011.
- BERALDO, C.; DANELUZZI, N. S.; SCANAVACCA, J.; DOYAMA, J. T.; FERNANDES JUNIOR, A.; MORITZ, C. M. F. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 436-440, Oct./Dec. 2013.
- BUZÓN-DURÁN, L.; ALONSO-CALLEJA, C.; RIESCO-PELÁEZ, F.; CAPITA, R. Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. **Food Microbiology**, v. 65, p. 294-301, 2017.
- CABRAL, B. E. M.; ALMEIDA, F. H. S.; GUIMARÃES, M.; NETTO, M. P. Variação no conteúdo de cálcio e proteína entre leite e bebida láctea e suas implicações ao consumidor. **Revista científica da FAMINAS**, v. 4, n. 2, 2016.
- CAMERON, S. J. S; TAKÁTS, Z. Mass spectrometry approaches to metabolic profiling of microbial communities within the human gastrointestinal tract. **Methods**, v. 149, p. 13-24, 2018.
- CAPALONGA, R.; RAMOS, R. C.; BOTH, J. M. C.; SOEIRO, M. L. T.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; TONDO, E. C. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 7, p. 811-817, 2014.
- CAPITA, R.; RIESCO-PELÁEZ, F.; ALONSO-HERNANDO, A.; ALONSO-CALLEJA, C. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1268–1280, Feb. 2014.
- CDC (Centers For Disease Control And Prevention) (2019). Multistate outbreaks of human *Salmonella* infections linked to live poultry in backyard flocks, Available in: <<https://www.cdc.gov/salmonella/live-poultry-06-17/index.html>>, Accessed in: 19/06/2019.
- CLEMENTE, I.; AZNAR, M.; SILVA, F.; NERÍN, C. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 26-33, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, CLSI Standard Document M7-A10, NCCLS, Wayne, Pa, USA, 2018.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, Oct. 1999.

DIAS, N. A. A.; RODRIGUES, L. T. D. S.; PALHARES, P. C.; RAMOS, E. M.; PICCOLI, R. H. Antimicrobial activity of essential oils on *Clostridium perfringens* type a inoculated in mortadella. **Journal of Food Safety**, v. 35. n. 4, p. 466-472, 2015.

DI PASQUA, R. D.; MAMONE, G.; FERRANTI, P.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v. 10, n. 5, p. 1040-1049, Mar. 2010.

ESPINA, L.; PAGÁN, R.; LÓPEZ, D.; GARCÍA-GONZALO, D. Individual Constituents from Essential Oils Inhibit Biofilm Mass Production by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11357-11372, Jun. 2015.

GIBBONS, H.; O’GORMAN, A.; BRENNAN, L. Metabolomics as a tool in nutritional research. **Current opinion in lipidology**, v. 26, n. 1, p. 30-34, 2015.

KALILY, E.; HOLLANDER, A.; KORIN, B.; CYMERMAN, I.; YARON, S. Mechanisms of resistance to linalool in *Salmonella* Senftenberg and their role in survival on basil. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 3673-3688, 2016.

KORENBLUM, E.; GOULART, F. R. V.; RODRIGUES, I. A.; ABREU, F.; LINS, U.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; VALONI, E.; SEBASTIÁN, G. V.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; SELDIN, L. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. **AMB Express**, v. 33, Aug. 2013.

KUMAR, G. D.; MICALLEF, S. A. Biofilms: a community-based strategy for bacterial persistence and relevance to food safety, In: **Trends in Food Safety and Protection**, p. 107-130, 2017.

MALLICK, H.; MA, S.; FRANZOSA, E. A.; VATANEN, T.; MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Experimental design and quantitative analysis of microbial community multiomics. **Genome biology**, v. 18, n. 1, p. 228, 2017.

MERRITT, J. H.; KADOURI, D. E.; O'TOOLE, G. A. Growing and Analyzing Static Biofilms. **Current Protocols in Microbiology**, s. 22, unit. 1B.1, Aug. 2011.

MIRANDA, A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MØRETRØ, T.; HEIR, E.; NESSE, L. L.; VESTBY, L. K.; LANGSRUD, S. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 532-544, Mar. 2012.

MOTA, V. A. M.; JUNIOR, J. A. O.; CHIARI-ANDRÉO, B. G. O controle da contaminação microbiológica de produtos magistrais. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 20, n. 1, p. 33-48, 2017.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; DO NASCIMENTO, J. A.; BATISTA, N. N.; PICCOLI, R. H. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed in stainless steel surfaces. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 5, p. 821-832, 2012.

PATEL, S.; AHMED, S. Emerging field of metabolomics: big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 107, p. 63-74, 2015.

PENG, B.; LI, H.; PENG, X. X. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. **Protein & Cell**, v. 6, n. 9, p. 628-637, 2015.

ROCCHETTI, G.; CHIODELLI, G.; GIUBERTI, G.; LUCINI, L. Bioaccessibility of phenolic compounds following in vitro large intestine fermentation of nuts for human consumption. **Food chemistry**, v. 245, p. 633-640, 2018.

ROCCHETTI, G.; BLASI, F.; MONTESANO, D.; GHISONI, S.; MARCOTULLIO, M. C.; SABATINI, S.; COSSIGNANI, L.; LUCINI, L. Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves. **Food Research International**, v. 115, p. 319-327, 2019.

SIDDIQUI, F. M.; AKRAM, M.; NOUREEN, N.; NOREEN, Z.; BOKHARI, H. Antibiotic susceptibility profiling and virulence potential of *Campylobacter jejuni* isolates from different sources in Pakistan. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 3, p. 197-202, 2015.

SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. Adaptation and Cross adaptation of *Listeria monocytogenes* to eugenol and carvacrol compounds. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 528-533, 2015.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, Apr. 2000.

TANG, K. H.; TANG, Y. J.; BLANKENSHIP, R. E. Carbon metabolic pathways in phototrophic bacteria and their broader evolutionary implications. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 165, 2011.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M. DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, Jun. 2005.

ZHANG, H.; ZHOU, W.; ZHANG, W.; YANG, A.; LIU, Y.; JIANG, Y.; HUANG, S.; SU, J. Inhibitory effects of citral, cinnamaldehyde, and tea polyphenols on mixed biofilm formation by foodborne *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 6, p. 927-933, Jun. 2014.

ARTIGO 2

Morphological and metabolomic impact of sublethal doses of natural compounds and its nanoemulsions in *Bacillus cereus*

O artigo será submetido de acordo com as normas da revista *Biomolecules* (IF: 4.69)

Abstract

The association of natural bacteriocins, such as nisin, generally provide an additional shelf-life to many food derivatives. However, it may interfere negatively in the efficiency of major compounds of essential oils against foodborne pathogenic bacteria. Otherwise, the technology of nanoemulsion formation interestingly increase the bactericidal potential of both natural compounds acting synergistically. In this regard, natural compounds such as cinnamaldehyde (CIN), citral (CIT) and linalool (LIN) were tested in singular, associated with nisin, and both nanoemulsified forms (NEs) in sensibility tests against *Bacillus cereus* and a targeted-metabolomic assays to identify putative modifications in molecular level between treatments. The results exhibited morphological changes in structure of *B. cereus* cells treated with nisin and antagonistic effect of nisin-associated treatments in comparison with single and nanoemulsified forms. Sensibility and UHPLC-QTOF-MS tests indicated that nisin may react in conjugation with citral reducing the bactericidal efficiency, while the effect citral was recognized as unaffected by nisin in nanoemulsions. *B. cereus* cells were drastically affected by NEs of CIN and CIT with addition of nisin revealing morphological differences, as it could be seen by Scanning electron Microscopy (SEM). Therefore, this study highlights the importance of prudent administration of natural compounds as antimicrobial agents in order to prevent sublethal tolerance in pathogenic bacteria.

Keywords: sublethal stress; major compounds; bacteriocin; nanotechnology; SEM.

Introduction

Bacteria of the genus *Bacillus* can contaminate and persist in nearly all food industry equipment and work surfaces of common materials, such as stainless steel and polystyrene. In this regard, sanitizing agents based of inorganic acids and alkalis (e.g., peracetic acid and quaternary ammonium compounds) are known to be inefficient against persistent forms, such as spores or biofilms. After continuous and prolonged use, sublethal doses of a sanitizer can lead to increased tolerance in previously susceptible bacteria (KUMAR; MICALLEF, 2017; BUZÓN-DURÁN et al., 2017).

The use of inadequate practices sanitization using antimicrobial agents in the food industry, such as unsupervised alternation of sanitizers, contributed to the emergence of tolerant microorganisms which directly compromises the safety of food products (ONICIUC et al., 2019). Currently, a large number of antimicrobials have become ineffective against previously susceptible microorganisms (MICHAEL; DOMINEY-HOWES; LABBATE, 2014). Thus, the search for alternatives that do not harm the health of the population has led to the use of natural products, especially those obtained from plant extracts (AMUKA et al., 2017).

In this scenario, natural compounds, such as the major compounds of essential oils (e.g., cinnamaldehyde), have become an attractive option to food industry managers. These products act nonspecifically in vital structures of microbial cells causing functional damage to the bacterial intracellular proteins, enzymes, and genetic material (DNA and RNA). In addition, studies have shown that the main mechanism of action of phenylpropanoids and terpenes is the rupture of the cytoplasmic membrane causing an increase in its permeability and subsequent depolarization (BOUARAB CHIBANE et al., 2019). Therefore, it is a literature consensus that essential oils (OEs) exhibit antibacterial activity against pathogenic isolates, although, a deeper knowledge related to the bacterial response to critical concentrations of active compounds related to bacterial inhibition is still unclear (MYSZKA; LEJA; NAJCHER, 2019).

The antimicrobial effect of cinnamaldehyde, citral and linalool, found in cinnamon and lemongrass essential oils, respectively, have been highlighted in the food, pharmaceutical and sanitary industries. However, such natural additives have apolar and hydrophobic characteristics, and therefore difficult to disperse in the formulation of sanitizing solutions, which are generally aqueous. Then, new options of biofilm prevention and elimination of pathogenic bacteria without threatening the quality of the food product can be found in combination of products which possesses recognized antimicrobial potential, such as bacteriocins.

Nisin is a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* and currently used in the food industry as a natural GRAS (generally recognized as safe) preservative compound. Although nisin is used in a wide range of food applications, optimizing its activity during food processing is still critical (SANTOS et al., 2018). Even considering several studies confirming that biofilms of

pathogen bacteria can become susceptible to the action of these natural agents, still remains a technological advance to combine the synergistic action of natural compounds (KALILY et al., 2016; CLEMENTE et al., 2016).

The possibility of amplifying the effect of sanitizers using low concentrations of natural compounds considered safe by legislation is a relevant conception in the food quality field. An innovative and viable alternative is the use of these active ingredients in the form of nanoemulsions, that is, active ingredients are emulsified until they reach nanometric size scale. It directly implies in better dispersion, controlled release, of the active ingredients in antimicrobial solutions. Then, when applied to food processing surfaces or equipment, nanoemulsions extend the maintenance of antimicrobial effects for a period longer than usual (WEISS et al., 2009).

Nanoemulsions are systems that contains droplets ranging the size of 20 to 200 nm, and, due to this characteristic, their aspect can be translucent or even show light turbidity, exhibiting high kinetic stability, which can promote reliable effects for long time of use (SOLANS et al., 2005). Hence, the use of nanoemulsions increases the antimicrobial activity of essential oils and major compounds (DONSI et al., 2011; LIANG et al., 2012). In this context, several methods of nisin encapsulation in food matrices were proposed to eliminate nisin proteolysis during processing, especially oil-in-water nanoemulsions (CHATZIDAKI et al., 2019).

In view of the above, beyond evaluating the antimicrobial potential of combinations of natural compounds and their nanoemulsioned products, it is also necessary to apply the researched knowledge to elucidate the mechanisms involved in the microbial response to stressor agents. Sanification treatments in sublethal concentrations promote tolerance and/or adaptation to doses higher than those previously defined as bactericides. Thus, the fundamentals of sublethal stress response involved in microbial survival, such as super- or underexpression of cellular metabolites, are a major concern since this investigation can result in significative prevention of foodborne outbreaks.

Metabolomic analyses have been widely used in basic and applied research in recent years, and gradually became a technique mutually complementary to genomics, transcriptomics and proteomics (DUMAS, 2012; CASTRO-SANTOS; LABORDE; DIAZ-PENA, 2015). Compared to the other comics, metabolomic studies provide direct information of the integrated cellular response to changes in the internal and external environment using relatively low-cost material for sample preparation (FUHRER; ZAMBONI, 2015).

Furthermore, a semi-quantitative tool for identification and comparison among fundamental and stressed condition of cells can be found in liquid chromatography. Also, a discriminant analysis of OPLS coupled with heatmap and clustering tools of the metabolomic post-analyses is able to establish the correspondence between the relative frequency and abundance of metabolites in bacterial samples (MAREE et al., 2014).

Thus, it is important to verify the metabolomic profile of bacterial pathogens exposed to sublethal doses of natural compounds in metabolomic analyses, as well as their nanoemulsions and its stability parameters. In this context, the present work aimed to evaluate the antimicrobial potential of combinations of cinnamaldehyde, citral, linalool and nisin in *Bacillus cereus* samples and analyze its effects after sublethal exposure by scanning electron microscopy correlating with possible events of cross-adaptation by untargeted metabolomic analyses.

Material and Methods

Microorganisms and natural compounds

Bacillus cereus UC-4044 were obtained from the collection of cultures of the Università Cattolica del Sacro Cuore (Piacenza, Italy). Stock cultures were stored at -20 °C. Subsequently, they were thawed at room temperature and reactivated by inoculation of 100 µL aliquots in tubes containing 10 mL of Tryptone soy broth (TSB) (Hi-Media, India) and incubation at 30 °C for 24 hours. Cinnamaldehyde (93%), citral (95%), linalool (97%) and nisin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Formation and stability of nanoemulsions

Nanoemulsions were produced by the addition of 0.5% cinnamaldehyde, citral or linalool, with or without 1.25% nisin, and 1.5% of Tween 80 in distilled water. The mixtures were stirred in an ultraturrax homogenizer (IKA Werke GmbH & Co, Staufen, Germany) at a speed of 12000 rpm for 5 minutes. Subsequently, the suspensions were ultrasonicated (Bioland, China) for 15 minutes in intermediate potency. Finally, the samples were filtered using filters with pore diameter of 0.22 µm. The distribution of particle size (polydispersity index - PDI), average particle diameter (nm) and zeta potential (ζ) (mV) of nanoemulsions were measured by a Zetasizer nano-ZS laser diffractometer (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Kingdom equipped with a backscatter detector (173°), working at 633 nm and 25 °C (SALVIA-TRUJILLO et al., 2014). The samples were previously diluted in ultrapure water using a dilution factor of 1:99 sample-to-solvent. The analyses occurred after 30 and 90 days of storage at 25 °C, in three technical and biological replications.

Bacterial sensitivity tests

The minimum bactericidal concentrations (MBC) of cinnamaldehyde, citral and linalool (separately), with and without the addition of nisin, as well as the nanoemulsions of combinations against *B. cereus*, were determined using microdilution technique in polystyrene plates of 96 wells, according to NCCLS (M7-A10) (CLSI, 2018) with adaptations. Solutions of Brain-heart infusion broth (BHI) (Oxoid, Hampshire, UK) with addition of 0.5% Tween 80 and each

antimicrobial agent were prepared at concentrations of: 0.001; 0.002; 0.004; 0.007; 0.015; 0.030; 0.060; 0.120; 0.250 and 0.500 % (v/v). The concentrations used of nisin ranged from 1.25 to 0.0024 % (m/v). For cultivation of bacterial samples, aliquots (150 μ L) of the solutions plus 10 μ L of standardized culture (1×10^6 CFU mL) of *B. cereus* have been added to the wells. Spectrophotometric measurements were performed in automatic reader/ incubator for microplates (Synergy HTX, BioTek Instruments, USA) and the results were obtained using Gen5 software (BioTek). A cutoff point was applied in the analyzed optical densities for the definition of inhibition (lower than 0.200) and bacterial growth (higher than 0.200).

Metabolomic profiling by UHPLC-QTOF and mass spectrometry

For ultra-high-performance liquid chromatography analyses (UHPLC-ESI-QTOF-MS), the following protocol was used: aliquots of 200 μ L of standard *B. cereus* (1.0×10^6 CFU mL⁻¹) were added followed by the addition of 200 μ L of acetonitrile in order to disrupt the cell wall and membrane, as well as immediate interruption of cellular metabolic processes (metabolic quenching). Subsequently, the samples were submitted to ultrasonication pulses of 5 seconds in amplitude of 50% (Bioland, China), for the dissolution of cellular components. The samples were packed in freezer -20 °C for 3 hours for protein precipitation. Then, the samples were centrifugated for 10 minutes, at 11,000 rpm and 4 °C (Eppendorf 5804R, Germany). The supernatant was separated into microtubes and kept under refrigeration (4 °C) until the time of analysis. For comparison with the basal metabolism of the tested samples, standard inoculations of unexposed cells were adopted as negative control.

The samples were transferred to amber vials of 1.5 mL for the determination of metabolomic profiles in liquid chromatograph (1290 series) coupled with mass spectrometer detector (G6550 series) through a current jet ionization system double-electrospray (all from Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The instrumental conditions of UHPLC-QTOF equipment for the analysis of metabolomic profiles of *B. cereus* were adapted from Rocchetti et al. (2019). Briefly, a reverse phase chromatographic separation was adopted using a binary gradient of acetonitrile-water (5% to 90% acetonitrile in 34 minutes). In addition, 0.1% (v/v) formic acid was added to both phases. The mass spectrometer worked in FULL SCAN mode with a nominal resolution of 30,000 FWHM in positive polarity and for mass acquisition, a scale of 100-1100 m/z was adjusted. The injection volume was 6 μ L per sample considering three replications for each sample.

The raw data from the metabolomic profiles were aligned and decoded using Agilent Profinder B.06 software and then annotated according to the find-by-formula algorithm, using the combination of exact monoisotopic mass and isotopic pattern (i.e., isotopic spacing and isotopic interface) against MetaCyc, the comprehensive database on metabolic compounds available online (<http://MetaCyc.org>). A mass precision tolerance below 5 ppm was used for annotation

purposes, and the characteristics were recursively identified using a retention time tolerance of ± 0.1 min for the alignment of chromatograms (ROCCHETTI et al., 2018, 2019). This approach allowed greater confidence in the annotation step and in accordance with level 2 identification (i.e., putatively annotated compounds), as previously reported by the COSMOS Metabolomics standards initiative (<http://cosmos-fp7.eu/msi>). Agilent Profinder B.06 software was also used for post-acquisition data filtering and only compound scans were held within 100% of repetitions in at least one condition.

Statistical analysis

Mass Profiler Professional B.12.06 (Agilent) software was used for statistical analysis of untargeted metabolomic UHPLC-QTOF data by hierarchical clusters analysis (HCA), based on heatmap (ROCCHETTI et al., 2019). Subsequently, the raw data set was exported and analyzed in the SIMCA 13 software (Umetrics, Malmo, Sweden) by supervised orthogonal projections to latent structures discriminating analysis (OPLS-DA) multivariate statistics. For the OPLS model, the raw data were accordingly Log₂ transformed, UV scaled and analyzed discriminately. The variation between the groups was separated into predictive and orthogonal components (related to technical and biological variation). The presence of discrepant results in the OPLS model was verified according to Hotelling T² (i.e. the distance from origin in the model), using 95% and 99% confidence limits for suspects and strong atypical values, respectively.

A cross-validation of the model was performed using CV-ANOVA ($p < .01$), while the permutation test ($N = 100$) was performed to exclude overadjustment. The parameters of the model, that is, R²_Y (adjustment) and Q²_Y (prediction) were also recorded. Subsequently, the variables selection methods namely VIP (variable importance in projection) were used to evaluate the importance of each metabolic model and select those with the highest potential for discrimination (VIP score > 1). Finally, a fold-change analysis was performed considering the UHPLC-QTOF data in order to evaluate in detail the impact of each metabolite on the treatments analyzed.

Scanning electron microscopy (SEM)

Samples of *B. cereus* were prepared for SEM using 10 μ L of inoculum of the standardized culture (1×10^6 CFU mL⁻¹) fixed on a positively charged nylon membrane (Roche Diagnostics GmbH Germany). Three treatments were prepared: (1) control sample without sublethal stress exposition; (2) cells exposed to sublethal stress of $\frac{1}{4}$ MBC of nanoemulsion of citral with nisin and (3) cinnamaldehyde with nisin. Samples were dehydrated stepwise in ethanol 75%, 85%, 95% and 100% for 2 h each at room temperature. Critical point drying was performed in a Baltec CPD030 dryer. Specimens were mounted on SEM disks, coated with gold for electrical conductivity (PALUMBO et al., 2004), and observed with a Philips XL30 ESEM scanning

electron microscope. Specimens were analysed under high vacuum conditions: high vacuum 3×10^{-4} Pa, 7000 count rate by dead time 33% and dwell time 60 ms.

Results and Discussion

Stability of nanoemulsions

The stability parameters: particle diameter (Z-average) (nm); polydispersion index and zeta potential (mV) of cinnamaldehyde, citral and linalool nanoemulsions (NEs), with or without the addition of nisin are shown in Table 1. It is verified that the average particle diameter in emulsions of CIN is increasing over time (50% increase in 60 days) while linalool and citral NEs remain virtually unchanged between the 60-day interval. In exception, citral nanoemulsions with nisin demonstrate remarkable growth (increase of 12 times in mean diameter). Visually, linalool and citral nanoemulsions with nisin presented lower turbidity (more transparent) compared to cinnamaldehyde nanoemulsions (milky aspect). These results are corroborated by Chuesiang et al. (2018) we observed the NEs of CIN are more turbid and particle diameter measurements are increasing over the storage time.

In the same analysis, the PDI analyses showed that some nanoemulsions (NELIN, NELIN+NIS and NECIT) showed an increase of polydispersion over time, while the other nanoemulsions (NECIT+NIS, NECIN and NECIN+NIS) decreased after the same storage period. Based on such data, it is possible to observe that in NECIN treatments, despite showing less homogeneous distribution of particle size (high PDI value), there is a greater perspective of polydispersion stability compared to NELIN, for which there was a gradual increase in indexes.

Then, the zeta potential analyses showed that NECIT, NECIN and NECIN+NIS presented satisfactory stability in relation to repulsion between particles after 90 days. In addition, NELIN has considerable repulsion between particles (-27.98 ± 2.07), making it the only NE that has such a characteristic with an average diameter close to 15 nm in just 30 days after its formation. However, it was also observed that linalool NEs (with and without nisin) and NECIT showed a decrease in the capacity of electrical repulsion over time.

In a comparative study, Zhang et al. (2017) evaluated nanoemulsions of isolated and blended clove/cinnamon essential oils, using Tween 80 as surfactant (with an average particle size ranging from 8.69 to 28.5 nm) showing antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* Typhimurium, and *Staphylococcus aureus*, suggesting that their compounds have potential to be used in food industry as a natural antimicrobial agent. In our study, cinnamaldehyde-loaded particles exhibited bactericidal effect using significantly low concentrations and satisfactory stability ranging above 120 nm of diameter.

Thus, it is considered that although cinnamaldehyde NEs have higher particle diameter values compared to other treatments, they are more stable in the same storage time period. Finally,

a proportional growth can be observed in relation to the diameter and zeta potential of particles. The first parameter increased over time the second is decreased to more negative values, a fact that results in greater electrical repulsion between particles. Da Silva Gündel et al. (2018) investigated the stability of nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil during 90 days of storage exhibiting adequate results of average particle diameter (less than 200 nm), PDI (less than 0.3), negative zeta potential and acid pH. Mostly of the tested treatments in our study showed similar performance demonstrating satisfactory physicochemical characteristics.

In consonance with the results obtained in bacterial sensitivity tests, NECIN, NECIN+NIS and NECIT+NIS (only after 90 days) demonstrated appreciable characteristics of stability even after long storage periods. On the other hand, although NECIT, NELIN and NELIN+NIS treatments exhibited significantly low particle diameter averages, they exhibited vulnerability in PDI and zeta potential parameters during storage time, a fact that can result in significant loss of antibacterial effect (FANG et al., 2019).

Table 1 - Means of antimicrobial sensibility and nanoemulsion stability tests of treatments.

Treatments	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	Z. average (nm)		PDI (polydispersity index)		Zeta Potential (mV)	
	<i>B. cereus</i>	30 days	90 days	30 days	90 days	30 days	90 days
LIN	1250	-	-	-	-	-	-
LIN + NIS	150 + 390	-	-	-	-	-	-
NE LIN	600	14.48 \pm 0.25	15.21 \pm 0.68	0.28 \pm 0.01	0.33 \pm 0.02	-27.98 \pm 2.07	-6.43 \pm 0.83
NE LIN + NIS	20 + 48	13.68 \pm 0.20	15.98 \pm 0.25	0.18 \pm 0.02	0.38 \pm 0.01	-6.46 \pm 1.50	-1.80 \pm 0.26
CIT	70	-	-	-	-	-	-
CIT + NIS	150 + 390	-	-	-	-	-	-
NE CIT	300	13.60 \pm 0.17	14.87 \pm 0.23	0.27 \pm 0.01	0.32 \pm 0.05	-9.96 \pm 1,27	-2.23 \pm 0.27
NE CIT + NIS	20 + 48	21.75 \pm 0.60	172.05 \pm 24.91	0.60 \pm 0.02	0.35 \pm 0.02	-3.47 \pm 0.85	-36.85 \pm 4.46
CIN	300	-	-	-	-	-	-
CIN + NIS	300 + 780	-	-	-	-	-	-
NE CIN	70	139.47 \pm 13.42	212.92 \pm 3.59	0.34 \pm 0.05	0.18 \pm 0.02	-20.21 \pm 3.04	-40.13 \pm 2.73
NE CIN + NIS	20 + 48	164.15 \pm 9.72	242.42 \pm 14.83	0.45 \pm 0.01	0.42 \pm 0.06	-11.98 \pm 1.28	-32.60 \pm 1.33

LIN – Linalool; CIT – Citral; CIN – Cinnamaldehyde; NIS – Nisin; NE – Nanoemulsion; MBC – Minimum Bactericidal Concentration; *B. cereus* – *Bacillus cereus*; Z. average – Diameter average.

Bacterial sensitivity and cultivation under sublethal stress

The analyses for determining the minimum bactericidal concentrations were performed in order to investigate the combination of natural compounds and nanoemulsions of better efficiency in inhibition of bacterial growth in *in vitro* cultures, and concomitantly determine the sublethal concentration ($1/4$ of CMB) of each treatment for further analysis. The results referring to cinnamaldehyde, citral and linalool compounds, with or without the addition of nisin, as well as its nanoemulsified products, tested against *B. cereus* are in Table 1.

As observed in previous studies (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015), citral emerges as one of the most efficient agents against the *Bacillus cereus* strains, exhibiting inhibitory concentrations lower than other compounds, mainly in nanoemulsion form in association with nisin. This fact reveals differences in relation to the cellular response of *B. cereus* such as activation of different enzymatic and genetic apparatus between treatments, since distinct mechanisms of action can be expressed according to the form that each compound is presented (i.e. encapsulated or in association with other compounds).

Mostly of nanoemulsified products have been shown as a more efficient transport vehicle from antimicrobial agent to target bacterial cell by the protection that encapsulation provided against sudden evaporation (GARCIA-SOTELO et al., 2019). Consequently, it was observed that nanoemulsification of volatile compounds potentiating the effect of CIN and LIN. Similarly, it was observed that nanoemulsions of the compounds associated with nisin presented lower concentrations in sensitivity tests in relation to other treatments. Thus, nisin played a decisive role in the synergistic effect among nanoemulsions of natural compounds (ZHANG et al., 2014).

In contrast to the results observed in the other treatments, the citral compound exhibited antagonistic effect when associated with nisin (twice increased CMB values) negatively impacting its bactericidal capacity compared to the results of other treatments. One hypothesis that justifies this fact is a conjugation reaction between the active site of citral with nisin reducing its efficiency. Olasupo et al. (2003) observed that combination of nisin with the organic compounds failed to enhance the antimicrobial activity and the MIC values of the natural organic compounds remained unchanged in comparison with the values obtained when tested alone against Gram-negative bacteria.

A similar fact occurs with the nanoemulsified forms of citral, in which higher doses (up to four times) were necessary for complete inhibition of bacterial growth of tested strains. In agreement with these results, Ashari et al. (2019) performed antimicrobial tests against five foodborne pathogens using combinations of nisin and *Zingiber officinale* (red ginger) essential oil containing more than 40% of citral in its composition. Nisin combinations exhibited antagonistic effect in two strains (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) and indifferent response in other two strains (*Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas fluorescens*).

In its composition, nisin presents a chain of amino acids permeated by sulfur bridges (FERNANDEZ-PEREZ et al., 2018). Natural compounds, such as oils of garlic species (*Allium sativum*), present a remarkable antimicrobial effect mostly by the release of sulfonated compounds that act directly in the bacterial cell (MOHSENIPOUR; HASSANSHAHIAN, 2015). The molecular association of citral with nisin possibly inhibited the release of sulfide radicals impairing bactericidal action in *B. cereus*. However, the phenomena of high energy encapsulation provided by homogenization and ultrasonication may have contributed to the preservation of unchanged active sites, as observed in other treatments.

Thus, the synergistic effect of citral in association with nisin is observed only in nanoemulsified forms. Maté, Periago and Palop (2016) tested nanoemulsions of d-limonene in combination with nisin against *Listeria monocytogenes* and results showed greater effectiveness when applying d-limonene in form of nanoemulsion than when applying it directly, and when using both compounds together, both directly and in the form of nanoemulsion

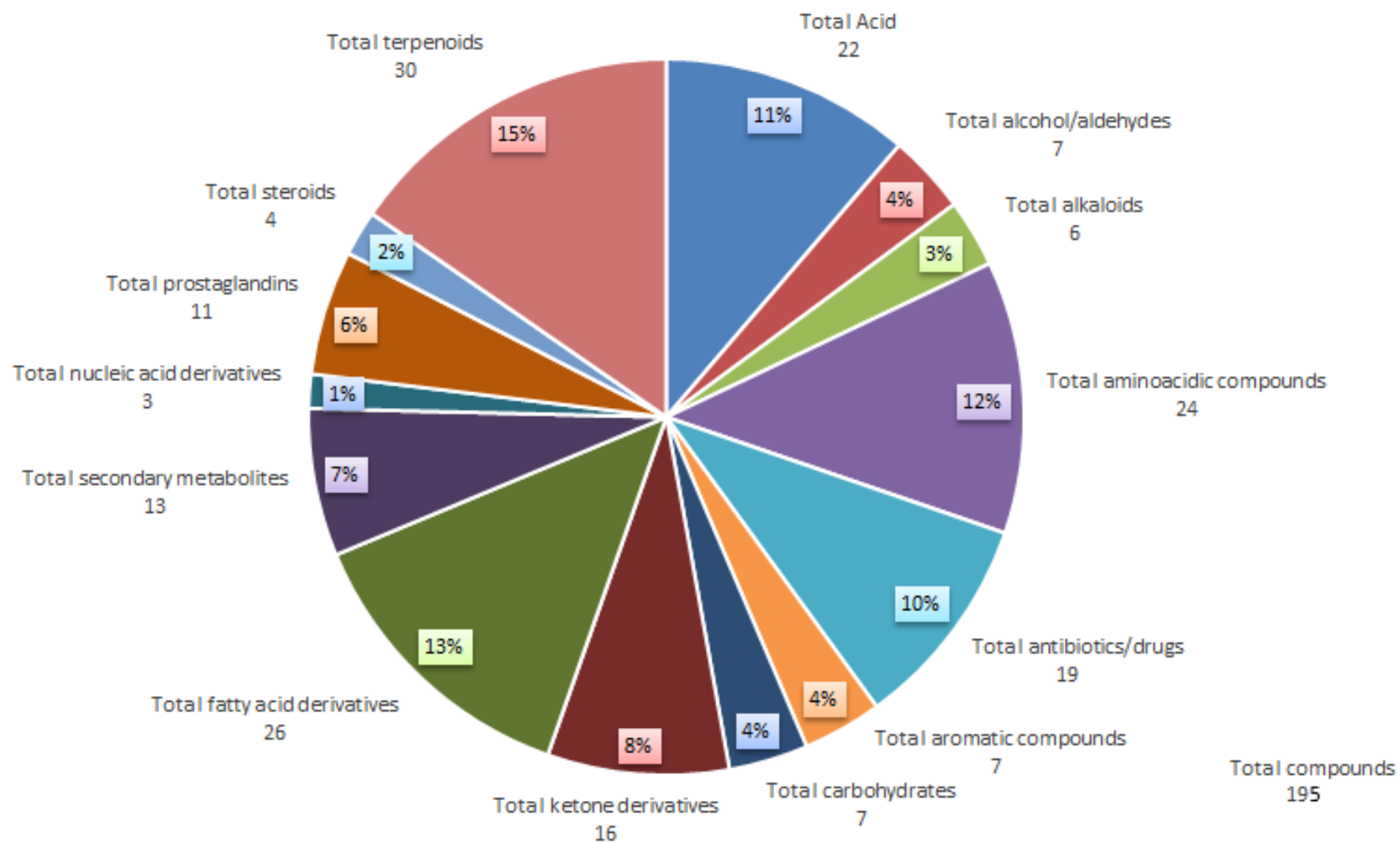
After obtaining the minimum bactericidal concentrations of each treatment, the cultivation under sublethal conditions of growth was carried out ($\frac{1}{4}$ of the concentrations obtained). Thus, physiological states of recovery to a chemical stress caused during the Lag phase of microbial growth were obtained. Adaptations in the use of metabolic pathways, protein synthesis, and activation of genes specific to critical survival situations were triggered in bacterial cells as a response to the presence of the stressor agent in sublethal doses.

Untargeted metabolomic analyses of *B. cereus* treatments

The untargeted metabolomic analyses in *B. cereus* treatments revealed 9252 putatively annotated compounds (according to the level of identification as established by the COSMOS Metabolomics Initiative). In this way, the MetaCyc database (metacyc.org) was used exploring the IDBrowser identification approach provided by the Mass Profiler Professional (Agilent) software. All treatments were submitted to a fold-change analysis compared to negative control treatment without exposure to sublethal stress (named “No stress”). This analysis allowed observing 5505 compounds ranging from at least 1 log in relative abundance (expressed positively or negatively) when compared to negative control.

The selection method of VIP markers (variable importance in projection) was used to separate metabolites that have the highest prediction score (Figure 1). Thus, 195 metabolites were characterized by a VIP score >1.30 . These compounds have proven to be the most discriminating metabolites and, consequently, the most critically involved in cell changes during sublethal stress. It is observed a significant increase of terpenoids and acids, fatty acids and aminoacidic compounds. This increase can be directly related to events of repair of the cell wall (production of precursors) and synthesis of derivated compounds from degradation of natural agents, which caused damage to cell.

Figure 1 - Classification of VIP markers identified compounds in *B. cereus* untargeted metabolomic analyses.

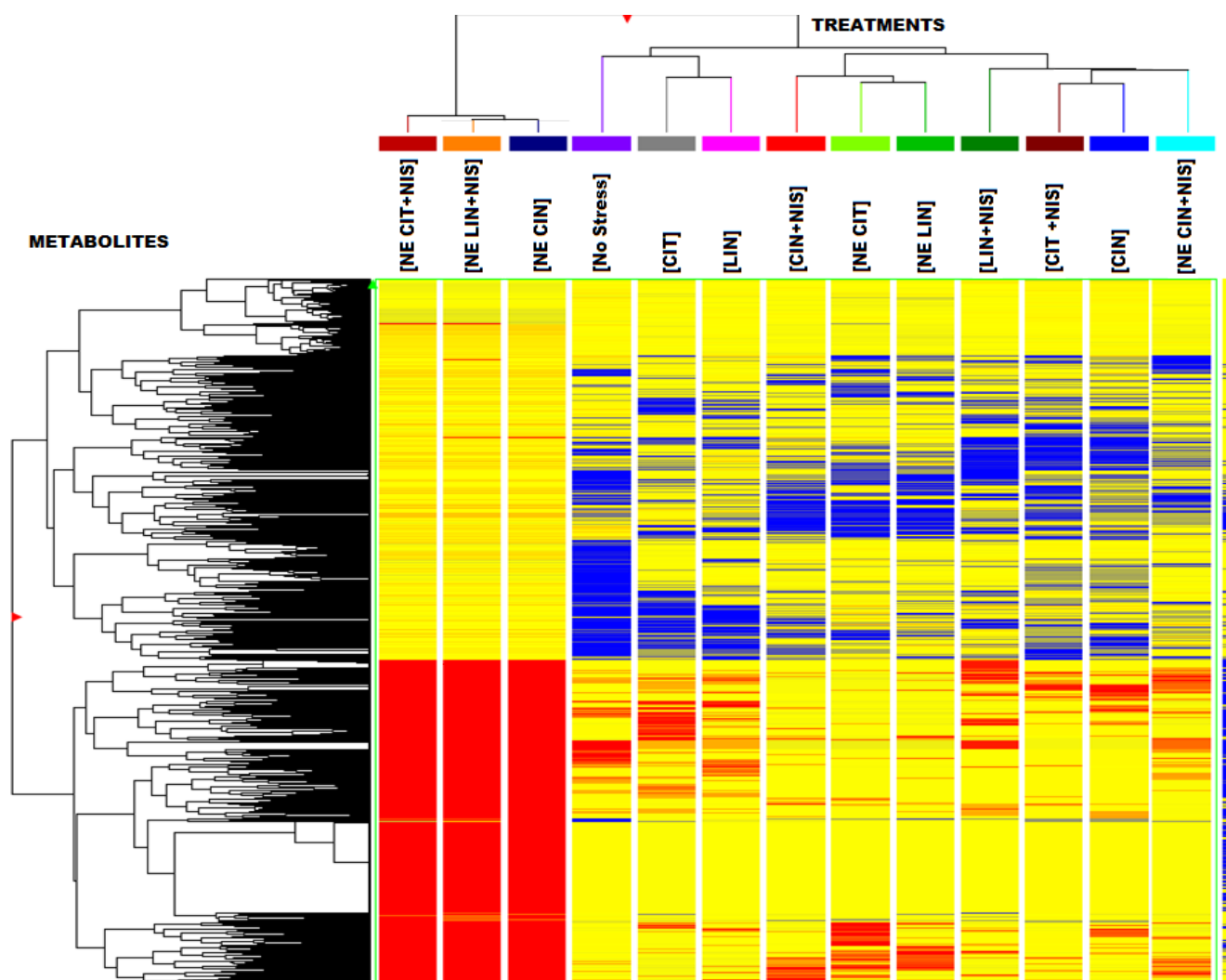


Also, many secondary metabolites, prostaglandins, ketone derivatives and antibiotics were identified. It is also observed that metabolites related to nucleotide degradation have a significant abundance, which leads to hypothesize a situation of damage to the genetic material of exposed cells. Other important information observed was a decrease of metabolites related to carbohydrate degradation, which is common in state of sublethal stress. In this specific case, the energy originated from fermentation is not spent on carbohydrate degradation pathways (down-regulation) but reallocated to other critical roles in order to maintain the cell survival, like degradation of alcohol and aromatic compounds (up-regulation).

In this context, sublethal stress responses in *B. cereus* triggers survival mechanisms aimed primarily at neutralizing harmful exogenous compounds (e.g., terpenoids) and synthesis of membrane and cell wall precursors (fatty acids and lipids). The presence of antibiotics in this section is characterized by the nonspecific response of bacteria, in which the synthesis of such compounds may be related to a stress-mediated condition, a fact that is important for tolerance to a possible subsequent exposure to similar compounds.

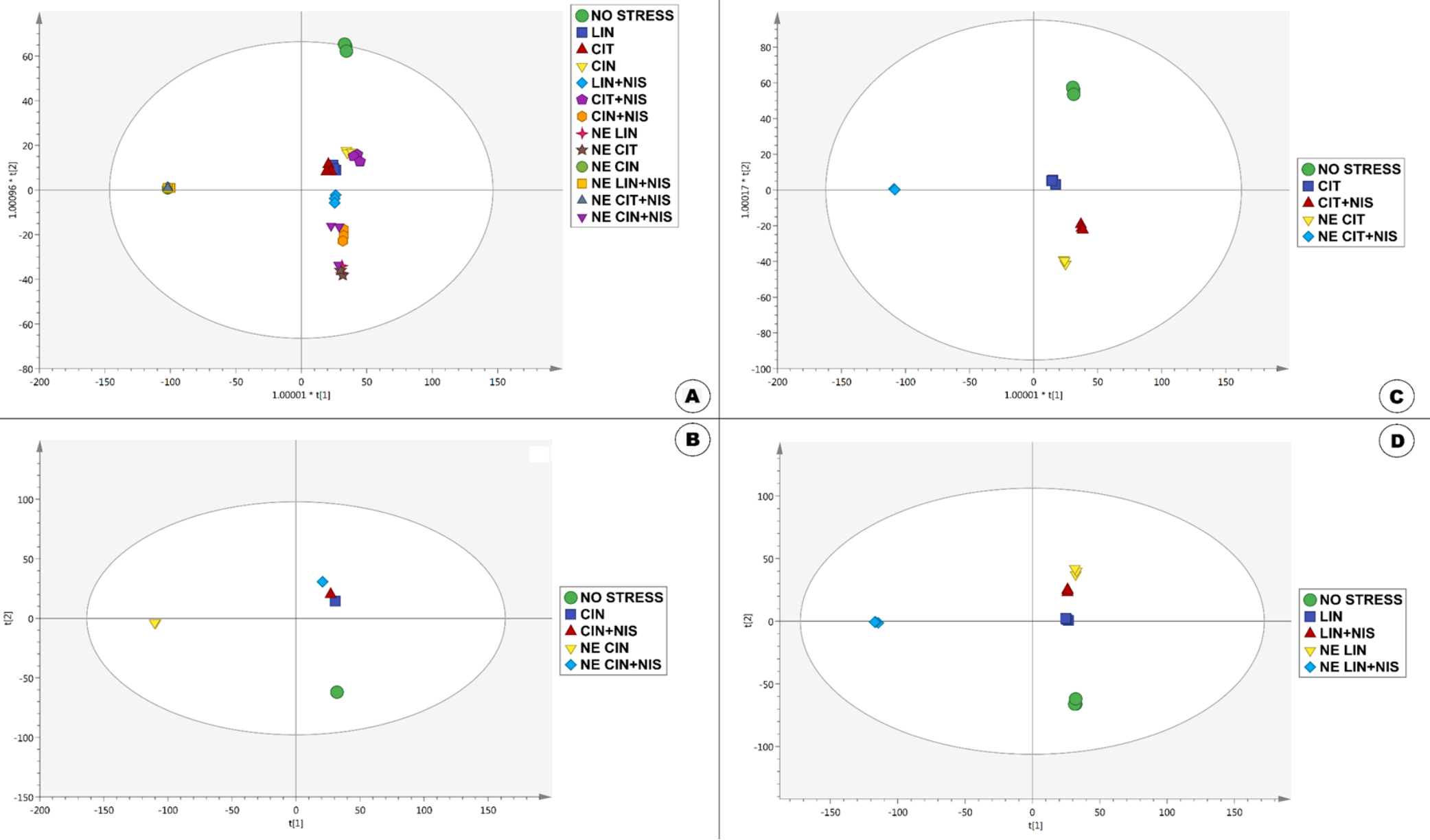
Subsequently, the hierarchical cluster analysis (HCA) of the analyzed treatments exhibits sets of distinct metabolic profiles (Figure 2). In such data, it is possible to observe that NECIT+NIS, NELIN+NIS and NECIN treatments exhibited visually different frequencies and abundances of metabolites compared to other treatments. Accordingly, this information can be directly associated with the similarity among chemical profiles highlighting the predominance of overexpression of majority of compounds in treatments containing NEs of terpenes with addition of nisin.

The OPLS discriminant analysis demonstrated statistically the proximity of treatments in regard of chemical profiles obtained in untargeted metabolomic analyses (Figure 3). Generally, the relative frequency and abundance of each metabolite found as VIP marker is taken into account to determine the distance among each treatment into the orthogonal plane. Then, in subsection A, all treatments are compared equally, while in subsections B, C and D, treatments are divided into compound-related groups (cinnamaldehyde, citral and linalool, respectively).

Figure 2 - Heatmap and Clustering of *B. cereus* treatments.

In connection with sensibility tests, the OPLS-DA (Figure 3) revealed several similarities in the treatments of *B. cereus* exposed to sublethal stress of natural compounds. It is noticeable that in section A, the NECIT+NIS, NELIN+NIS and NECIN treatments exhibited a distinct set of metabolites revealing a very particular behavior in comparison with all other treatments. Also, in figure 3, the treatments shown in subsections C and D (CIT and LIN-related groups) exhibit a similar pattern of distance among treatments. This fact means that these two conditions produce an almost identical set of identified compounds and it is possible to infer that a similar set of enzymes and regulatory factors is formed, leading to hypothesize a common activation of pathway of terpene-degradation.

Figure 3 - OPLS-DAs of *B. cereus* treatments.



Subsection A, all treatments are compared equally, while in subsections B, C and D, treatments are divided into compound-related groups (cinnamaldehyde, citral and linalool, respectively).

Interestingly, the treatment NECIN+NIS did not exhibit the same metabolomic profile as NECIT+NIS and NELIN+NIS, as it could be an expectable result. Probably, the interaction of the terpene-loaded NE containing particles with less than 25 nm of diameter induced a behavior in *B. cereus* completely different than the phenylpropanoid-loaded NE containing particles larger than 150 nm of diameter. Afterwards, the nanoemulsioned forms of CIN treatments did not showed differences between them considering both metabolomic profiles of *B. cereus*, proving lesser influence of nisin in these cases rather than as observed in NEs of CIT and LIN.

This fact can be plausibly explained by the differences in sublethal concentrations applied in growth conditions of tests among the treatments. Particularly, the sublethal dose of $\frac{1}{4}$ of NECIN MBC stimulated a type of response in *B. cereus* cells very similar to those observed in NECIT+NIS and NELIN+NIS conditions, while the NECIN+NIS treatment induced cellular physiological events more closely related to CIN+NIS response. Besides the type of bacterial response is not strictly dose-dependent and may change according to various factors.

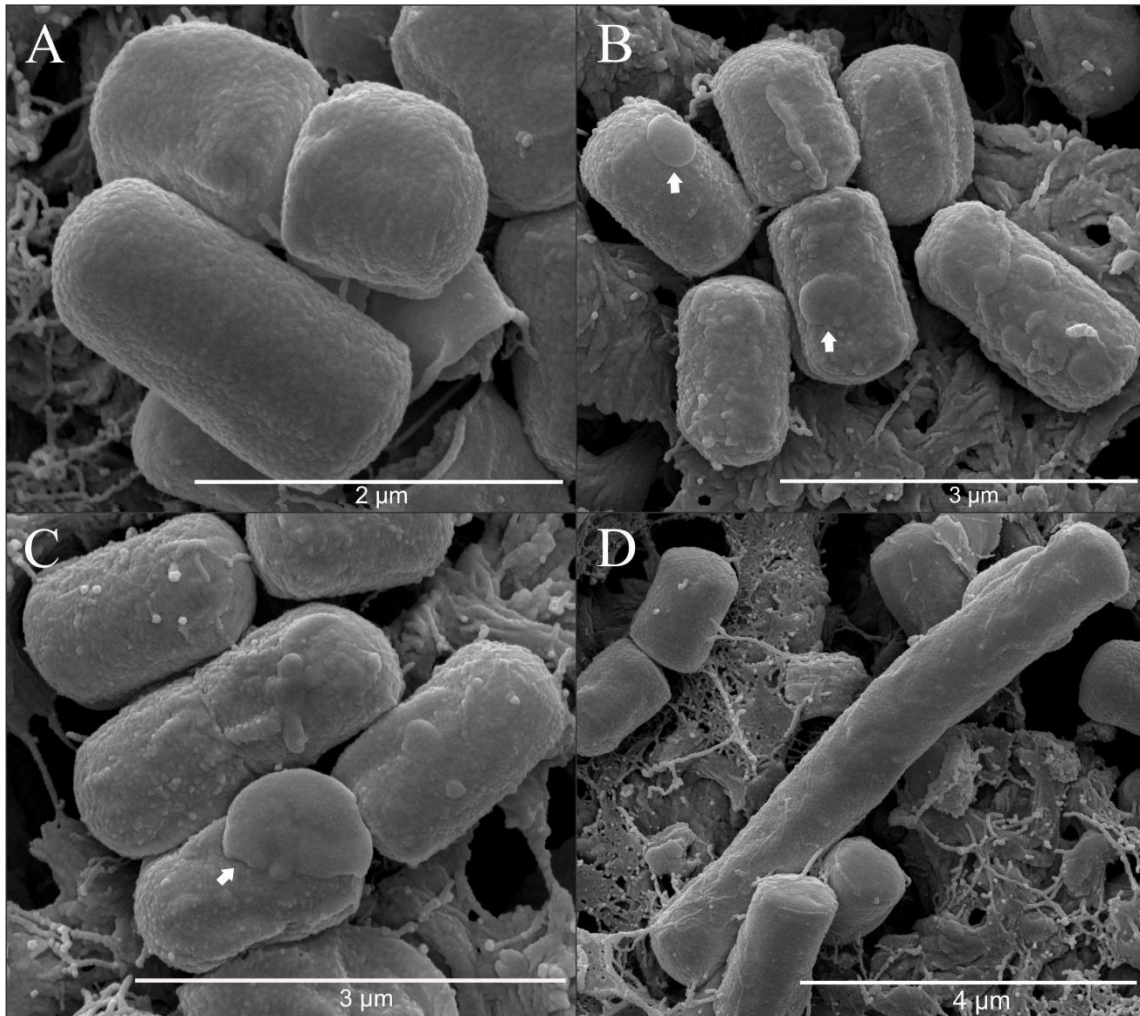
Afterwards, a sublethal dose of a specific compound, or a combination of compounds, may lead to heterogenous outcomes in bacterial adaptation process, once generating subtle reactions or even provoking irreversible changes in bacterial physiology. Thus, is important to emphasize than many mechanisms of action of natural compounds still remain unclear and combinations with different classes of compounds, such as bacteriocins, and the application of new technologies to improve the efficiency of antimicrobial compounds contribute to a better comprehension of cellular responses of pathogenic bacteria.

SEM of *B. cereus* exposed to sublethal doses of NEs of natural compounds

In order to supplement the findings obtained in previous data, the morphological differences among *B. cereus* treatments submitted to sublethal stress were analyzed in scanning electron microscopy. A non-stressed bacterial population of *B. cereus* was also analyzed to be compared as a parameter of regular morphology of cells.

According to Figure 4, it is possible to observe clear differences between *B. cereus* cells of control treatment (non-stressed cells) (subsection A) and the treatment submitted to sublethal stress of NECIN+NIS (subsections B, C and D). The surfaces of cells exposed to NECIN+NIS present circular and corrugating elevations, as pointed by white arrows in subsections B and C, that may be the result of overexpression of fatty acid derivatives and/or its precursors, as already observed in untargeted metabolomic tests. Such compounds are essential factors in the formation of cellular membrane and, after the recovery of sublethal stress, tend to accumulate disorderly on the surface of the cell wall.

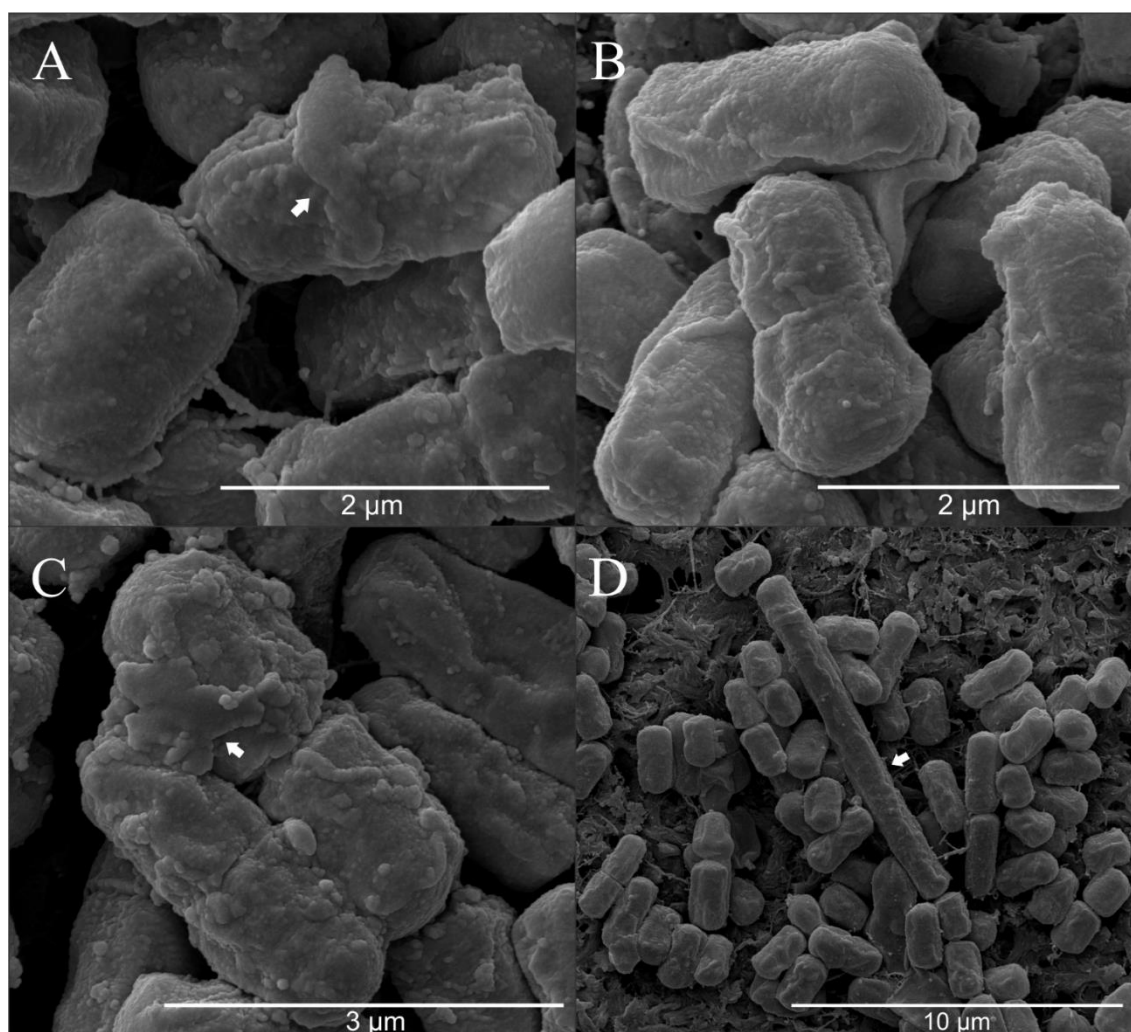
Figure 4 – Scanning electron micrographs of *B. cereus* treatments. (A) No stress, (B, C and D) NECIN+NIS.



Bacillus cereus cells treated with NECIN+NIS. Section A demonstrates a non-stressed cell (control-treatment), white arrows in B and C sections indicates cell deformations, and D section represents an atypical elongated cell of *Bacillus cereus*.

A similar fact happens in NECIT+NIS treatments in Figure 5, where morphological deformations can be observed on cell surfaces (white arrows in subsections A, B and C). In the D subsections of figures 4 and 5, it is possible to observe the occurrence of atypically elongated cells of *B. cereus* and may exceed the in diameter of 10 micrometers. The phenomenon of uncontrolled stretching of such cells can be explained by the action of natural compounds such as cinnamaldehyde and citral directly in the inhibition of the formation of the FtsZ ring, responsible for cell division in bacilli (LI et al., 2015). Thus, these cells of *B. cereus* have their multiplication impaired as a result of the exposition of sublethal doses of natural compounds.

Figure 5 - Scanning electron micrographs of *B. cereus* NECIT+NIS treatment.



Bacillus cereus cells treated with NECIT+NIS. A, B and C sections indicates cell deformations (white arrows). D section shows the occurrence of atypical elongated cell of *Bacillus cereus*.

Conclusion

New technologies of controlling populations of bacterial pathogens, such as nanoemulsions and combinations with bacteriocins, represent a remarkable effort in preventing foodborne outbreaks. Nevertheless, a metabolomic approach among exposed cells to sublethal doses of natural compounds led to new insights of physiological similarities in adaptation process of *Bacillus cereus*. Stability tests of NEs, UHPLC-QTOF-MS and SEM analyses allowed us to associate the metabolomic and morphological aspects of *B. cereus* tolerance against NEs and nisin combined with major compounds of essential oils. Therefore, this study highlights the prudent use of natural compounds as antimicrobial agents in order to prevent sublethal tolerance in pathogenic bacteria.

References

- AMUKA, O.; TARUS, P. K.; RUTTOH, E. K.; MACHOCHO, A. K.; OKEMO, P. O. Natural extractives and the role they play in human health. **Gastroenterology and Liver Clinical and Medicals**, v. 1, p. 1-13, 2017.
- ASHARI, D. A.; NISSA, A.; NURSIWI, A.; SARI, A. M.; UTAMI, R. Antimicrobial effect of Zingiber officinale var. officinale essential oil and nisin against pathogenic and spoilage microorganisms. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, v. 633, n. 1, p. 012005, 2019.
- BOUARAB CHIBANE, L.; DEGRAEVE, P.; FERHOUT, H.; BOUAJILA, J.; OULAHAL, N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 4, p. 1457-1474, 2019.
- BUZÓN-DURÁN, L.; ALONSO-CALLEJA, C.; RIESCO-PELÁEZ, F.; CAPITA, R. Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. **Food Microbiology**, v. 65, p. 294-301, 2017.
- CASTRO-SANTOS, P.; LABORDE, C. M.; DIAZ-PENA, R. Genomics, proteomics and metabolomics: their emerging roles in the discovery and validation of rheumatoid arthritis biomarkers. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 33, n. 2, p. 279-286, 2015.
- CHATZIDAKI, M. D.; BALKIZA, F.; GAD, E.; ALEXANDRAKI, V.; AVRAMIOTIS, S.; GEORGALAKI, M.; PAPADIMITRIOU, V.; TSAKALIDOU, E.; PAPADIMITRIOU, K.; XENAKIS, A. Reverse micelles as nano-carriers of nisin against foodborne pathogens. Part II: The case of essential oils. **Food chemistry**, v. 278, p. 415-423, 2019.
- CHUESIANG, P.; SIRIPATRAWAN, U.; SANGUANDEEKUL, R.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Optimization of cinnamon oil nanoemulsions using phase inversion temperature method: Impact of oil phase composition and surfactant concentration. **Journal of colloid and interface science**, v. 514, p. 208-216, 2018.
- CLEMENTE, I.; AZNAR, M.; SILVA, F.; NERÍN, C. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 26-33, 2016.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, CLSI Standard Document M7-A10, NCCLS, Wayne, Pa, USA, 2018.
- DA SILVA GÜNDEL, S.; DE SOUZA, M. E.; QUATRIN, P. M.; KLEIN, B.; WAGNER, R.; GÜNDEL, A.; VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C. V.; OURIQUE, A. F. Nanoemulsions containing Cymbopogon flexuosus essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial pathogenesis**, v. 118, p. 268-276, 2018.
- DONSÍ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1908-1914, 2011.
- DUMAS, M. E. Metabolome 2.0: quantitative genetics and network biology of metabolic phenotypes. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 10, p. 2494-2502, 2012.

FANG, J. Y.; LIN, Y. K.; WANG, P. W.; ALALAIWE, A.; YANG, Y. C.; YANG, S. C. The droplet-size effect of squalene@cetylpyridinium chloride nanoemulsions on antimicrobial potency against planktonic and biofilm MRSA. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 8133, 2019.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, R.; SÁENZ, Y.; ROJO-BEZARES, B.; ZARAZAGA, M.; RODRÍGUEZ, J. M.; TORRES, C.; TENORIO, C.; RUIZ-LARREA, F. Production and antimicrobial activity of nisin under enological conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1918, 2018.

FUHRER, T.; ZAMBONI, N. High-throughput discovery metabolomics. **Current opinion in biotechnology**, v. 31, p. 73-78, 2015.

GARCIA-SOTELO, D.; SILVA-ESPINOZA, B.; PEREZ-TELLO, M.; OLIVAS, I.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; AYALA-ZAVALA, J. F. Antimicrobial activity and thermal stability of rosemary essential oil:β-cyclodextrin capsules applied in tomato juice. **LWT**, v. 111, p. 837-845, 2019.

KALILY, E.; HOLLANDER, A.; KORIN, B.; CYMERMAN, I.; YARON, S. Mechanisms of resistance to linalool in *Salmonella* Senftenberg and their role in survival on basil. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 3673-3688, 2016.

KUMAR, G. D.; MICALLEF, S. A. Biofilms: a community-based strategy for bacterial persistence and relevance to food safety, In: **Trends in Food Safety and Protection**, p. 107-130, 2017.

LI, X.; SHENG, J.; HUANG, G.; MA, R.; YIN, F.; SONG, D.; ZHAO, C.; MA, S. Design, synthesis and antibacterial activity of cinnamaldehyde derivatives as inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 32-41, 2015.

LIANG, R.; XU, S.; SHOEMAKER, C. F.; LI, Y.; ZHONG, F.; HUANG, Q. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.60, p.7548-7555, 2012.

MAREE, J.; KAMATOU, G.; GIBBONS, S.; VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S. The application of GC-MS combined with chemometrics for the identification of antimicrobial compounds from selected commercial essential oils. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 130, n. 15, p. 172-181, 2014.

MATÉ, J.; PERIAGO, P. M.; PALOP, A. Combined effect of a nanoemulsion of D-limonene and nisin on *Listeria monocytogenes* growth and viability in culture media and foods. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 2, p. 146-152, 2016.

MICHAEL, C. A.; DOMINEY-HOWES, D.; LABBATE, M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. **Frontiers in public health**, v. 2, p. 145, 2014.

MOHSENIPOUR, Z.; HASSANSHAHIAN, M. The effects of *Allium sativum* extracts on biofilm formation and activities of six pathogenic bacteria. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 8, n. 8, 2015.

MYSZKA, K.; LEJA, K.; MAJCHER, M. A current opinion on the antimicrobial importance of popular pepper essential oil and its application in food industry. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 1, p. 1-18, 2019.

- OLASUPO, N. A.; FITZGERALD, D. J.; GASSON, M. J.; NARBAD, A. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 448-451, 2003.
- ONICIUC, E. A.; LIKOTRAFITI, E.; ALVAREZ-MOLINA, A.; PRIETO, M.; LÓPEZ, M.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain. **Current Opinion in Food Science**, v. 30, p. 21-26, 2019.
- PALUMBO, E.; FAVIER, C. F.; DEGHORAIN, M.; COCCONCELLI, P. S.; GRANGETTE, C.; MERCENIER, A.; VAUGHAN, E. E.; HOLS, P. Knockout of the alanine racemase gene in *Lactobacillus plantarum* results in septation defects and cell wall perforation. **FEMS microbiology letters**, v. 233, n. 1, p. 131-138, 2004.
- ROCCHETTI, G.; CHIODELLI, G.; GIUBERTI, G.; LUCINI, L. Bioaccessibility of phenolic compounds following in vitro large intestine fermentation of nuts for human consumption. **Food chemistry**, v. 245, p. 633-640, 2018.
- ROCCHETTI, G.; BLASI, F.; MONTESANO, D.; GHISONI, S.; MARCOTULLIO, M. C.; SABATINI, S.; COSSIGNANI, L.; LUCINI, L. Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves. **Food Research International**, v. 115, p. 319-327, 2019.
- SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. **Food Control**, v. 37, p. 292-297, 2014.
- SANTOS, J. C. P.; SOUSA, R. C. S.; OTONI, C. G.; MORAES, A. R. F.; SOUZA, V. G. L.; MEDEIROS, E. A. A.; ESPITIA, P. J. P.; PIRES, A. C. S.; COIMBRA, J. S. R.; SOARES, N. F. F. Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 48, p. 179-194, 2018.
- SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nanoemulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, p. 102-110, 2005.
- SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. Adaptation and Cross adaptation of *Listeria monocytogenes* to eugenol and carvacrol compounds. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 528-533, 2015.
- WEISS, J.; GAYSINKSY, S.; DAVIDSON, M.; MCCLEMENTS, J.; Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. **IUFoST World Congress Book: Global Issues in Food Science and Technology**. Elsevier Inc., Amsterdam, 2009.
- ZHANG, H.; ZHOU, W.; ZHANG, W.; YANG, A.; LIU, Y.; JIANG, Y.; HUANG, S.; SU, J. Inhibitory effects of citral, cinnamaldehyde, and tea polyphenols on mixed biofilm formation by foodborne *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 6, p. 927-933, Jun. 2014.
- ZHANG, S.; ZHANG, M.; FANG, Z.; LIU, Y. Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 316-322, 2017.