

Atividade antibacteriana e antibiofilme de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* microencapsulado e não microencapsulado

Antibacterial and antibiofilm activity of microencapsulated and non-microencapsulated *Syzygium aromaticum* essential oil

Actividad antibacteriana y antibiopelícula del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* microencapsulado y no microencapsulado

Recebido: 11/04/2022 | Revisado: 20/04/2022 | Aceito: 29/04/2022 | Publicado: 02/05/2022

Daniele Pereira de Souza Borborema

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7376-586X>
Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
E-mail: danielemoc@hotmail.com

Cintya Neves de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3640-8636>
Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
E-mail: cintyamicro@hotmail.com

Carolina Magalhães Caires Carvalho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3145-0253>
Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
E-mail: carollcaires@yahoo.com.br

Charles Martins Aguiar

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7180-049X>
Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
E-mail: cma2006@ufmg.br

Fernando Eustáquio de Matos Júnior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0894-5194>
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil
E-mail: fernando.eustaquio@ufjf.edu.br

Ulisses Alves Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9010-8442>
Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
E-mail: ulisses_ap@yahoo.com.br

Ester Dias Xavier

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8289-3540>
Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
E-mail: exavier63@gmail.com

Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8558-4196>
Universidade Estadual de Montes Claros, Brasil
E-mail: alessandra.ericsson@unimontes.com

Janáina Teles de Faria

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8387-3610>
Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
E-mail: janainafaria@ufmg.br

Anna Christina de Almeida

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9836-4117>
Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
E-mail: aca2006@ica.ufmg.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) microencapsulado e não microencapsulado sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. A atividade antibacteriana foi realizada pelas técnicas de difusão de disco e de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial. Para a atividade antibiofilme, utilizaram-se as linhagens de *S. aureus* que foram sensíveis a ação do óleo essencial. Cinco isolados foram sensíveis a ação do óleo essencial pelo teste de difusão em disco cuja CIM foi de 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e a CBM de 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Destas cinco, quatro foram capazes de formar biofilme com adesão superior a 10⁷ UFC cm⁻². O óleo microencapsulado apresentou melhor efeito antibiofilme com redução de cerca de 2 log UFC.cm⁻² nos *S. aureus* multirresistentes analisadas, e o não microencapsulado reduziu aproximadamente 1,1 log

UFC.cm², demonstrado a maior eficiência do óleo com microencapsulação. O uso de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* microencapsulado poderia servir com uma alternativa promissora no controle de bactérias multirresistentes e formadoras de biofilmes em superfícies de aço inoxidável apresentando algumas vantagens em comparação com o utilizado em sua forma original, principalmente no que diz respeito ao transporte, preservação do conteúdo, manipulação e utilização em matrizes alimentares.

Palavras-chave: Cravo-da-índia; Biofilme; *Staphylococcus aureus*; Microencapsulação.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of microencapsulated and non-microencapsulated clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil on multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antibacterial activity was performed by disk diffusion and broth microdilution techniques to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the essential oil. For the antibiofilm activity, strains of *S. aureus* that were sensitive to the action of the essential oil were used. Five isolates were sensitive to the action of the essential oil by the disk diffusion test whose MIC was 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ and the CBM was 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Of these five, four were able to form biofilms with adhesion greater than 10⁷ CFU.cm⁻². The microencapsulated oil showed a better antibiofilm effect with a reduction of about 2 log CFU.cm⁻² in the multiresistant *S. aureus* analyzed, and the non-microencapsulated oil reduced approximately 1.1 log CFU.cm⁻² showing the high efficiency of the oil with microencapsulation. The use of microencapsulated *Syzygium aromaticum* essential oil could serve as a promising alternative in the control of multiresistant and biofilm forming bacteria on stainless steel surfaces, presenting some advantages compared to the one used in its original form, mainly with regard to transport, content preservation, handling and use in food matrices.

Keywords: Clove; Biofilm; *Staphylococcus aureus*; Microencapsulation.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana y antibiofilm del aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) microencapsulado y no microencapsulado sobre cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. La actividad antibacteriana se realizó mediante técnicas de difusión en disco y microdilución en caldo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida (MBC) del aceite esencial. Para la actividad antibiopelícula se utilizaron cepas de *S. aureus* sensibles a la acción del aceite esencial. Cinco aislados fueron sensibles a la acción del aceite esencial por la prueba de difusión en disco cuya CIM fue de 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ y la CBM de 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. De estos cinco, cuatro fueron capaces de formar biopelículas con adherencia superior a 10⁷ CFU.cm². El aceite microencapsulado mostró el mejor efecto antibiofilm con una reducción de alrededor de 2 log CFU.cm⁻² en los *S. aureus* multirresistentes analizados, y el aceite no microencapsulado redujo aproximadamente 1,1 log CFU.cm⁻², demostrando la mayor eficiencia del aceite con microencapsulación. El uso del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* microencapsulado podría servir como una alternativa promissoria en el control de bacterias multirresistentes y formadoras de biopelículas en superficies de acero inoxidable, presentando algunas ventajas frente al utilizado en su forma original, principalmente en lo que se refiere al transporte, conservación del contenido, manipulación y uso en matrices alimentarias.

Palabras clave: Clavo; Biopelícula; *Staphylococcus aureus*; Microencapsulación.

1. Introdução

Os biofilmes são definidos como uma assembléia de microrganismos aderidos a uma superfície e envolvidos por uma matrix extracelular (Weerasekera et al., 2016). Sua formação em equipamentos e utensílios utilizados na indústria de alimentos podem causar diversos problemas como entupimento, corrosão, ou mesmo a contaminação cruzada de produtos alimentares, aumentando assim o seu risco de intoxicações e degradação do alimento (Menon, 2016; Dias, Borges, Saavedra & Simões, 2018; Cunha et al., 2019). Além disso, bactérias formadoras de biofilmes demonstram maior resistência a fagocitose, a agentes antimicrobianos e a desinfetantes em relação às células microbianas planctônicas, tornado mais difícil a sua eliminação (Donlan & Costerton, 2002).

Assim, torna-se necessário a busca por novos métodos que apresentem potencial para serem agentes antimicrobianos e anti-biofilmes sem causar efeitos nocivos ao meio ambiente e a saúde humana e animal. Nesse contexto se encaixa os óleos essenciais de plantas aromáticas, compostos voláteis oriundos do seu metabolismo secundário. As atividades antimicrobianas de diversas espécies de plantas produtoras de óleos essenciais são bem documentadas na literatura (Radaelli et al., 2016; Milezzi et al., 2019; Santos et al., 2020) e podem agir em diferentes mecanismos nos microrganismos, como inibição da síntese

de peptidoglicano em bactérias, modificação na hidrofobicidade da membrana celular, inativação de enzimas extracelulares, entre outros (Burt, 2004; Radaelli et al., 2016).

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) pertencente à família Myrtaceae, é conhecido pelo seu uso como tempero na preparação de diversos alimentos (Cortés-Rojas, Souza & Oliveira, 2014). Assim como diversas plantas condimentares, o óleo essencial de *S. aromaticum* é utilizado na medicina tradicional devido a sua ação antiinflamatória, citotóxica, anestésica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, além de sua ação como inseticida (Chaieb et al., 2007; Kacaniova et al., 2021). Seu óleo essencial é extraído do botão floral seco que apresenta o eugenol como composto majoritário além de outros compostos fenólicos (Farias et al., 2019; Radunz et al., 2019).

No entanto, apesar dos seus diversos benefícios, sua utilização na indústria torna-se limitada, devido a seu odor intenso, sua instabilidade e risco de deterioração oxidativa quando expostos a fatores como o oxigênio, luz, umidade e calor (Budri et al., 2015; Leyva et al., 2016). Desse modo, uma das formas de se minimizar esses efeitos é a encapsulação, técnica capaz de aumentar a estabilidade do material encapsulado e prolongar seu tempo de vida útil, através da inibição de reações químicas entre o material e o ambiente externo (Bakryet al., 2015; Baranauskaite et al., 2019); Radunz et al., 2019).

A ação bactericida do óleo essencial do cravo-da-índia atua em um dos mais conhecidos patógenos de origem alimentar, a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus*, que é hábil a formar biofilmes, tornando-se um risco para contaminação de alimentos na indústria. Se forem resistentes, elas ainda podem transferir esses genes de resistência para outras bactérias. Assim, diante disso, avaliou-se a ação antibacteriana do óleo essencial de cravo-da-índia não microencapsulado e a ação anti-biofilme do óleo essencial de cravo-da-índia com e sem microencapsulação.

2. Metodologia

Óleo essencial

O óleo de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) (OESA) utilizado neste estudo foi adquirido da empresa Ferquima (Vargem Paulista, SP, Brazil) e caracterizado por cromatografia gasosa, conforme metodologia realizada por Farias *et al.* (2019) revelando 79,4 % de eugenol.

Bactérias testadas

Foram utilizadas 6 linhagens de *Staphylococcus aureus* multirresistentes provenientes da bacterioteca do laboratório de Sanidade Animal, do Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, do ICA-UFMG, previamente identificados (Souza et al., 2019) e a bactéria *S. aureus* ATCC 25923. Para a atividade anti-biofilme foram utilizadas como controle positivo a bactéria *S. aureus* ATCC 25923 formadora de biofilme, e como controle negativo a bactéria *S. epidermidis* ATCC 12228, não formadora de biofilme.

Avaliação da atividade antibacteriana do OESA

A ação antibacteriana do OESA foi analisada utilizando a técnica de difusão em disco, conforme metodologia proposta pela CLSI (2015a) com modificações.

As bactérias foram ativadas em Caldo Tripton de Soja (TSB) e tiveram sua densidade ajustada em 0,9% solução salina estéril até obtenção da turbidez compatível com a escala de McFarland no escore 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹), conforme CLSI (2015a). Em seguida, diluições foram preparadas em concentrações de OESA a 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µL.mL⁻¹ em caldo Brain Heart Infusion (BHI), usando 0,1% de Tween-80.

Discos de papel de filtro estéril (6 mm de diâmetro) foram impregnados com 30 µL de cada concentração de óleo essencial avaliada. Após a secagem, os discos foram depositados em placas de Petri contendo as bactérias *S. aureus* utilizadas em meio Ágar Mueller Hinton e incubados a 37°C durante 18-24 horas. O diâmetro da zona de inibição foi expresso em mm, incluindo o diâmetro do disco. Os halos com diâmetro entre 9-14 mm ou superior foram considerados a bactéria sensível a ação do óleo de acordo com os critérios de Puškárová et al., (2017). As análises foram realizadas em triplicata.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Inibitória Mínima foi estabelecida pelo método de microdiluição em caldo utilizando-se placas de microtitulação, com base no CLSI (2015b), com adaptações. As concentrações de óleo usadas foram as mesmas do teste de difusão em disco no teste de triagem. Em seguida, foram adicionadas a suspensão contendo $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ de cada linhagem nos poços de cada concentração.

Controles negativos foram preparados com o óleo apenas, e o controle positivo com a cultura *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os testes foram realizados em triplicata e a placa de microtitulação foi incubada a 37 °C por 24 horas. Após as 24 horas de teste, foi adicionado Cloreto de Trifeniltetrazólico (TTC) para verificação da presença ou ausência de crescimento bacteriano pela alteração da coloração do reagente de amarelo para vermelho (Duarte et al., 2005). A CIM foi determinada pela menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Para expressar a menor concentração capaz de eliminar as bactérias (CBM), retirou-se 10µL com auxílio de uma alça de inoculação estéril dos poços que não apresentaram coloração avermelhada e foram transferidas para placas de Petri contendo o meio PCA. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e avaliadas quanto a presença e ausência de crescimento microbiano. As placas cuja concentração do óleo não apresentou crescimento de colônias foram capazes de exercer ação bactericida sobre a bactéria.

Verificação da formação de biofilme em aço inoxidável

As linhagens de *Staphylococcus aureus* que apresentaram ação antimicrobiana no teste de difusão foram avaliadas quanto a sua capacidade de produção de biofilme. As linhagens foram ativadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e padronizadas em espectrofotômetro a 570 nm para o valor de 0,5 de densidade ótica (DO) para obter a quantificação e determinação das concentrações dos inóculos para padronização.

A metodologia foi utilizada conforme Friedriczewskiet e colaboradores (2018), com modificações. Quatro mililitros de cada inóculo da cultura padronizada foram adicionados em um béquer estéril contendo 200 mL de caldo BHI e dois cupons estéreis com 4 cm² de aço inox. Após, os béqueres foram levados à estufa por 48 horas a 37 °C.

Após o período de incubação, os cupons foram lavados com solução salina tamponada com fosfato PBS 3% NaCl por duas vezes, para eliminar as células não aderidas. Em seguida, os cupons foram transferidos para um novo béquer com caldo BHI estéril e levados para a estufa por mais 48 horas. O processo se repetiu por cinco vezes.

Swabs estéreis foram passados por toda a região do cupom para coleta de células aderidas na superfície de aço inox do cupom, e imersos em tubo contendo 10 mL de solução salina 0,9 %. Após a homogeneização com auxílio de agitador de tubos, 1mL foi transferido para outro tubo com mais 9 mL da mesma solução sendo em seguida feitas diluições seriadas até 10⁻⁵. Um volume de 100 µL da solução das diluições 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram espalhados em placas contendo o meio Agar Sal Manitol, selecionando o crescimento de *Staphylococcus aureus*. As placas foram levadas à estufa por 48 horas a 37 °C e realizada a contagem das colônias presentes, características de *S. aureus*. As análises foram realizadas em triplicata e os valores foram expressos em log UFC.cm⁻².

Efeito do óleo de *S. aromaticum* na inibição da formação de biofilmes

O procedimento descrito acima foi realizado novamente com as linhagens bacterianas que foram capazes de formar biofilmes, agora com a adição do óleo essencial de cravo-da-índia. Foram realizados três tratamentos, o primeiro apenas a cultura ativa no meio BHI (Controle), segundo com o óleo essencial microencapsulado (OEM) e o terceiro tratamento com o óleo essencial sem microencapsulação (OE).

Na primeira etapa da verificação da formação de biofilmes foram utilizados $1,3 \text{ g.mL}^{-1}$ de OEM e $20 \text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$ de OE. Para definir a quantidade de OEM no teste, utilizou-se o resultado prévio da eficiência de microencapsulação que foi de 99,33% (dados não publicados). Para o volume do OE, utilizou-se o resultado da CBM.

Microencapsulação do óleo essencial de *S. aromaticum*

Para esse estudo utilizou-se o método de cocervação simples descrito por Comunian et al. (2016), com modificações para o óleo essencial de cravo-da-índia e avaliou-se a eficácia da microencapsulação conforme relato de Borborema (2021).

Análises estatísticas

Para avaliar o efeito inibitório do óleo essencial na formação do biofilme foi realizado um esquema fatorial (3x4), onde foi utilizado 3 tipos de tratamentos e quatro linhagens bacterianas que apresentaram atividade antimicrobiana. Os dados de contagem microbiana (UFC) foram expressos em log e avaliados por meio de análise de variância ao nível de 5% de probabilidade. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), analisadas no software Studio R.

3. Resultados e Discussão

A análise inicial da avaliação antimicrobiana do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* demonstrou a sua capacidade em inibir o crescimento da maioria das linhagens de *S. aureus* utilizadas. Os halos obtidos tiveram tamanhos variáveis, porém ficaram acima de 9 mm, demonstrando a sensibilidades dessas bactérias ao óleo pelo teste de difusão em disco (Tabela 1). Apenas os isolados M30 e 110G não apresentaram formação halos de inibição em nenhuma das concentrações utilizadas e por isso não foram avaliados no teste antibiofilme.

Tabela 1. Efeito inibitório do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* em *S. aureus* multirresistentes pelo teste de difusão em disco.

Linhagens Bacterianas	Diâmetro do halo (mm)*
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	13
<i>S. aureus</i> ISO 34	12
<i>S. aureus</i> SM 37	14
<i>S. aureus</i> SM 38	10
<i>S. aureus</i> 6C	16
<i>S. aureus</i> M30	0
<i>S. aureus</i> 110G	0

* Valores referentes às médias dos halos de inibição com concentração do óleo a $20 \text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$. Fonte: Autores.

Guimaraes et al., (2017) ao avaliarem a atividade antimicrobiana do extrato aquoso e do óleo essencial de cravo-da-índia frente a *S. aureus* ATCC 25923, obtiveram halos de inibição médio de 12 mm pelo teste de difusão ao utilizar o óleo essencial, contra 0 mm de halo no extrato aquoso. O valor obtido por esses autores foi próximo ao encontrado neste trabalho para a mesma linhagem ATCC, porém com uma concentração três vezes maior que a obtida. Essa diferença pode estar reacionada a composição química do óleo, pois o óleo utilizado em nosso trabalho apresentou 79% de eugenol, o composto fenólico em que se é atribuído a atividade antimicrobiana do cravo da índia, ao invés de 65% encontrado no trabalho de Guimaraes. As variações na composição química dos óleos essenciais de cravo da índia dependem de vários fatores como local de cultivo, método de extração empregado, horário de extração, entre outros.

O óleo essencial *S. aromaticum* apresentou resultados satisfatórios semelhantes nos testes de CIM e CBM, com valores de 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente, para todas as linhagens utilizadas, ressaltando a sua eficácia mesmo em baixas concentrações. Já Farias e colaboradores (2019), obtiveram CIM e CBM de 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 40 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente, ao utilizarem o óleo de cravo-da-índia da produzido pela mesma empresa.

A linhagem de *S. aureus* 6C sofreu contaminação durante o experimento e não foi possível recuperar e por isso não foi avaliada nos testes de CIM, CBM e ação anti-biofilme.

Quatro isolados bacterianos foram capazes de produzir biofilme pela técnica utilizada neste trabalho, que tiveram valores médios de 7,917 log UFC.cm⁻² (Tabela 3). Para que seja considerado formador de biofilme, a bactéria precisa apresentar no mínimo 10⁷ UFC aderidas cm⁻² de superfície (Andrade et al., 1998), abaixo do valor encontrado neste estudo.

S. aromaticum foi capaz de reduzir o número de células aderidas das quatro bactérias testadas que foram formadoras de biofilme nos cupons de aço inoxidável, sendo mais eficiente na redução das células quando microencapsulado comparando-se com o óleo sem a microencapsulação. Apesar dos isolados de *S. aureus* utilizados serem oriundos de vacas com mastite subclínica de várias fazendas situadas no norte de Minas Gerais, não houve diferença significativa na relação formação de biofilme/ ação do óleo/ origem do isolado (Tabela 4).

Tabela 3. Efeito inibitório do óleo essencial de cravo-da-índia na produção de biofilmes por *S. aureus*.

Tipos de inclusão do óleo	Crescimento
ÓLEO M*	5.854 ^a
ÓLEO NM**	6.742 ^b
SEM ÓLEO	7.917 ^c
P VALOR	<i>p</i> <0,01
Bactérias	
ISO 34	6.676
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6.755
SM 37	6.779
SM 38	6.760
P VALOR	0,2
Inclusão óleo NM x Bactérias	
CV	0,65

*M- Microencapsulado. **NM- Não microencapsulado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste Tukey 5%). Fonte: Autores.

O desdobramento da interação mostra que o uso do óleo de cravo-da-índia microencapsulado resultou em menor crescimento bacteriano quando comparado ao óleo não microencapsulado e ao tratamento sem óleo. Os resultados demonstram

que a presença do óleo microencapsulado pode ter um efeito inibitório na formação de biofilmes, conforme mostrado na Tabela 4.

Quando comparado as bactérias em cada uma das formas de inclusão do óleo, os resultados mostraram que as cepas ISO 34 e ATCC tiveram menor crescimento comparado as outras cepas nos tratamentos com óleo microencapsulado. No tratamento com óleo não microencapsulado a cepa ATCC teve menor crescimento. No tratamento sem o óleo o crescimento da cepa ISO 34 foi menor comparada as demais cepas (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito inibitório do óleo essencial de cravo-da-índia sobre a produção de biofilmes de *Staphylococcus aureus* multirresistentes em relação à origem das linhagens bacterianas.

Bactérias	Óleo M*	Óleo NM**	Sem óleo
<i>S. aureus</i> ATCC 25922	5.782 ^{aA}	6.755 ^{bAB}	7.833 ^{cA}
<i>S. aureus</i> ISO 34	5.814 ^{aAB}	6.676 ^{bA}	7.933 ^{cB}
<i>S. aureus</i> SM 37	5.906 ^{aBC}	6.779 ^{bB}	7.961 ^{cB}
<i>S. aureus</i> SM 38	5.915 ^{aC}	6.760 ^{bAB}	7.940 ^{cB}

*M- Microencapsulado. **NM- Não microencapsulado. Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste Tukey no nível de 5%. Fonte: Autores.

A presente pesquisa focou no potencial do óleo essencial de cravo-da-índia em agir sobre bactérias multirresistentes. A escolha da espécie se baseou na sua patogenicidade e capacidade de formação de biofilmes. A bactéria *S. aureus* é descrita na literatura como produtora de biofilmes, cuja produção é mediada pelos genes operon *icaABCD* (gene de adesão intercelular) que atuam na expressão de polissacarídeo capsular e por *bap* (biofilme associado a proteína) que promove a adesão celular (Percival et al., 2011; Szweda et al., 2012, Budri et al., 2015).

Bactérias gram positivas como *S. aureus* são descritas na literatura como mais suscetíveis a ação dos óleos essenciais que as bactérias gram negativas devido a ausência de da membrana externa que serviria como barreira adicional na penetração dos componentes dos óleos essenciais. No entanto, alguns estudos têm demonstrado maior resistência de *S. aureus* em relação a *E. coli* ou *Salmonella*, principalmente na formação de biofilmes (Walmiki & Rai, 2017; Millezi et al., 2019). Millezi e colaboradores reforçam assim a importância de conduzir os testes em diferentes situações ou diferentes estágios de formação do biofilme devido as variações de comportamento do microrganismo em contato com o sanitizante.

Budri e colaboradores (2015) observaram forte ação anti-biofilme do OESA contra *S. aureus* oriundos de vacas com mastite subclínica em cupons de aço inoxidável, porém ela não foi significativa ao se aplicar apenas o eugenol. Já Millezi et al. (2019) tiveram redução de 2,2 log UFC.cm⁻² ao aplicar eugenol nos cupons. Segundo estes autores superfícies hidrofílicas como aço inoxidável e vidro tendem a melhor adesão quando comparados com superfícies hifrofóbicas.

Walmiki e Rai (2017), ao avaliar a ação antibiofilme de *S. aromaticum*, *C. cuminum* e *Piper nigrum*, observou que o óleo de cravo-da-índia demonstrou ser o mais efetivo dos três, e a bactéria *S. aureus* a mais resistente aos óleos testados.

Os resultados obtidos por esse estudo e de outros autores podem ser considerados de elevada importância visto que as bactérias formadoras de biofilme geram diversas enzimas prejudiciais, induzindo a colonização de outras áreas da indústria, consequentemente, apresentando maior risco de contaminação do espaço (Benincá, 2018).

Cada vez mais os óleos essenciais vêm sendo utilizados no desenvolvimento de produtos, como, sanitizantes naturais. No entanto, esses compostos quando utilizados em alimentos podem apresentar odor e sabores acentuados ao interagirem com outros compostos envolvidos na matriz. Desse modo, a fim de minimizar esses efeitos, o uso da microencapsulação vem sendo recomendado, adotando menores concentrações, protegendo os compostos ativos e diminuindo o número de cepas existentes (Sousa, 2018).

Radunz e colaboradores (2019) ao verificar a ação antimicrobiana de antioxidante de óleo de cravo-da-índia com o sem microencapsulação concluiu que partículas do óleo microencapsulado com alginato de sódio e emulsificantes apresentaram baixa atividade antioxidante e forte inibição antimicrobiana contra *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*. Apesar de utilizarmos goma arábica ao invés de alginato de sódio ou outros emulsificantes (dados não publicados). Cui, Zhao e Lin (2015) também observação ação bactericida do óleo de cravo-da-índia encapsulado com lipossomos sobre *S. aureus*. Os resultados obtidos por esses autores demonstram que independente do método de encapsulamento, o óleo apresenta efeito bacteriostático e bactericida sobre diversas bactérias patogênicas. E como ficou demonstrado no presente trabalho, a ação se estende a bactérias produtoras de biofilme.

No presente estudo, levando em consideração o custo da utilização do processo de microencapsulamento, foi testado o uso do óleo livre, afim de investigar se o óleo sem processamento seria capaz de promover efeito semelhante. Porém, foi possível observar melhor homogeneização do óleo microencapsulado no sistema avaliado, sendo este efeito, provável responsável pela melhor ação do óleo microencapsulado na inibição da formação de biofilmes (dados não publicados).

O resultado encontrado demonstra que o uso do óleo microencapsulado é uma boa opção para as indústrias de alimentos, farmacêutica, têxtil, dentre outras. Esse resultado vai ao encontro dos achados de outros autores que avaliaram seu uso em aplicações diferentes das aqui estudadas. Kopp (2020), ao realizar um estudo com óleo essencial de cravo, verificou a eficiência do seu encapsulamento pelos métodos de extrusão e sol-gel no controle das bactérias *S. aureus* e *E. coli* e do fungo *Aspergillus niger*. Favaro-Trindade e Pinho (2008), em seu estudo de revisão sobre a técnica de microencapsulação, apontaram a efetividade da utilização da técnica de microencapsulação, diante da necessidade da relação entre bioacessibilidade, alimentação, genética e saúde, principalmente no desenvolvimento de novos produtos.

O processo de microencapsulação poderia ser utilizado como instrumento alternativo para a proteção e estabilidade dos compostos bioativos presentes, além de prolongar o tempo de vida útil dos alimentos adicionados de conservantes microencapsulados, principalmente através dos óleos essenciais (Gottardo, 2021). Além disso, essa técnica pode propiciar certa estabilidade térmica ao óleo essencial, acarretando na possibilidade de utilização desse procedimento em processamento de alimentos, correspondendo a uma alternativa viável de aditivo natural no controle antimicrobiano nas indústrias de alimentos e na redução das contagens de placas de microrganismos (Almeida et al., 2013; Benincá, 2018).

A respeito da preservação das características no uso como antimicrobiano, Araújo (2019) explica que no processo de microencapsulação, o núcleo da substância ativa é envolvido com o material da parede, o que acarreta em uma proteção do composto bioativo, impedindo a dispersão do material no meio e, conseqüentemente, a perda da eficácia da utilização do material no controle de microrganismos.

4. Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que o óleo essencial de cravo da índia apresentou atividade antibacteriana *in vitro* e antibiofilme em superfície de aço inoxidável sobre linhagens de *S. aureus* mutirresistentes, mesmo em baixas concentrações do óleo, demonstrando o seu potencial.

O uso do óleo essencial de cravo da índia em seu estado microencapsulado apresentou efeitos antibiofilme mais eficazes quando comparado à utilização do óleo essencial em estado livre, tornando-se uma alternativa na utilização em indústrias de alimentos e de produtos sanitizantes, devido a conservação das suas características antimicrobianas e possibilidade de substituição de modo sustentável dos agentes químicos, ao diminuir a adesão do desenvolvimento de biofilmes nas superfícies de aço inox presente em indústrias.

Referências

- Almeida, A. C., Oliveira, L., Paulo, P. D., Martins, E. R., Souza, R. M., Figueiredo, L. S., Santos, C. A. & Fonseca, H. C. (2013). Potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de cravo da índia e alfafação em carne moída de ovinos contaminados experimentalmente com *S. aureus*. *Rev Bras Cien Vet*, 20(4), 248-251.
- Almeida, J. C., Almeida, P. P., Gherardi, S. R. M. (2020). Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. *Rev Elect Nutri Time*, 17(1), 8623-33.
- Alves, P. I. C. (2019). *Potencial antimicrobiano de óleos essenciais de Pimpinella anisum L., Syzygium aromaticum L. e Origanum vulgare L., e desenvolvimento de coberturas comestíveis a base de quitosana incorporadas de óleos essenciais para produtos cárneos* (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. http://repositorio.ufpel.edu.br:8080/bitstream/prefix/7608/1/Dissertacao_Pamela_Inchauspe_Correa_Alves.pdf.
- Andrade, N. J., Bridgman, T. A. & Zottola, E. A. (1998). Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *J Food Prot*, 61(7), 833-838.
- Araújo, J. S. F. (2019). *Micropartículas de óleo essencial de laranja doce (Citrus aurantium var. dulcis) em matriz de gelatina e maltodextrina* (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Universidade Federal de Campina Grande. Pombal, Paraíba, Brasil. <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/6336>.
- Bakry, A., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M., Mousa, A. & Liang, L. (2015). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 143-182. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>
- Baranauskaitė, J., Kopustinskiene, D. M., & Bernatoniene, J. (2019). Impact of Gelatin Supplemented with Gum Arabic, Tween 20, and β -Cyclodextrin on the Microencapsulation of Turkish Oregano Extract. *Molecules*, 24(176), 1-16. <https://doi.org/10.3390/molecules24010176>
- Benincá, M. C. (2018). *Efeito inibitório de óleos essenciais contra Staphylococcus aureus multirresistentes e formadores de biofilmes* (Dissertação). Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Beraldo, C., Daneluzzi, N. S., Scanavacca, J., Doyama, J. T., Fernandes Júnior, A. & Moritz, C. M. F. (2013). Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo da Índia como sanitizantes na indústria de alimentos. *Pesq Agropec Trop*, 43(4), 436-440. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000400006>.
- Borborema, D. P. S. (2021) *Óleo essencial de Syzygium aromaticum microencapsulado na redução da produção de biofilmes produzidos por Staphylococcus aureus multirresistentes à antimicrobianos* (Dissertação). Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.
- Budri, P. E., Silva, N. C., Bonsaglia, E. C., Fernandes Junior, A., Araujo Junior, J. P., Doyama, J. T., Goncalves, J. L., Santos, M. V., Fitzgerald-Hughes, D., & Rall, V. L. (2015). Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *J Dairy Sci*, 98(9), 5899-5904. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9442>
- Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol*, 94, 233-253.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K. & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum*, L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, 21, 501-506.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically (2015b).
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests (2015a).
- Comunian, T., Gómez-Estaca, J., Furtado, R., Conceição, G., Moraes, I., Castro, I., & Favaro-Trindade, C. (2016). Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.044>
- Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), 90-96. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60215-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60215-X)
- Cunha, R. C., Rosa, M. D. H., Silva, C., Santos, D. S. & Leite, F. P. L. (2019). Staphylococcal slime layers and biofilm from different origins. *Ciência Rural*, Santa Maria, 49(05), 1-9. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180783>
- Cui, H.; Zhao, C.; Lin, I. (2015). The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. *Food Control*, 56, 128-134.
- Dias, C., Borges, A., Saavedra, M. J. & Simões, M. (2018). Biofilm formation and multidrug-resistant *Aeromonas* spp. from wild animals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 12, 227-234.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881-890.
- Farias, P. K. S., Silva, J. C. R. L., Souza, C. N. de, Fonseca, F. S. A. da, Brandi, I. V., Martins, E. R., Azevedo, A. M., & Almeida, A. C. de. (2019). Antioxidant activity of essential oils from condiment plants and their effect on lactic cultures and pathogenic bacteria. *Cienc Rural*, 49(2). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180140>
- Favaro-Trindade, C., Pinho, S. (2008). Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Braz. J. Food Technol.*, 11(2), 103-112. https://www.researchgate.net/publication/237521407_Revisao_Microencapsulacao_de_ingredientes_alimenticios.
- Friedriczewski, A.B., Gandram E.A, Conceição, R. C. S., Cereser, N.D., Moreira, L.M. & Timm, C.D. (2018). Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala e seu efeito sobre a sensibilidade a sanitizantes. *Acta Scien Veter*, 46, 1528. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.81813>

- Gotardo, F. M. (2021). *Microencapsulação de óleos essenciais de orégano e canela combinados com ação sobre Listeria monocytogenes em produto cárneo* (Dissertação). Universidade Passo Fundo, Passo Fundo. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Guimaraes, C. C., Ferreira, T. C., Oliveira, R. C. F., Simioni, P. U. & Ugrinovich, L. A. (2017). Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.). *Revista Brasileira de Biociências*, 15(2), 83-89.
- Kopp, V. V. (2020). *Óleo essencial de cravo encapsulado como microbiota natural* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Leyva, J., Bello-Pérez, L., Alvarez-Ramirez, J., & Garcia, H. (2016). Microencapsulation using starch as wall material: A review. *Food Reviews International*, 34. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1261298>
- Marques, E.B.P. (2017). *Nanoencapsulação de óleo essencial de cravo em matrizes lipídicas* (Monografia). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
- Menon, K. V. (2016). Biofilm and food industry. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4, 137-142.
- Millezi, A. F., Costa, K. A. D., Oliveira, J. M., Lopes, S. P., Pereira, M. O. & Picolli, R. H. (2019). Antibacterial and anti-biofilm activity of cinnamon essential oil and eugenol. *Ciência Rural*, 49 (1), 1-7.
- Nascimento, L.D. (2021). *Óleo essencial de Lippia thymoides Mart. Schauer: Obtenção, caracterização química e microencapsulação* (Tese de doutorado). Universidade Federal do Pará. Belém, Pará, Brasil.
- Oliveira, F. S. (2017). *Atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos essenciais aplicados na conservação de linguiça frescal de frango* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.
- Oliveira, T. F., Ferreira, J. S., Boa Sorte, P. M. F., Reis, V. M., Baldani, J. I. & Schwab, S. (2009). Concentração mínima inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/663940/3/bot049092013.pdf>.
- Percival, S. L.; Knottenbelt, D. C.; Cochrane, C. A (2011). *Biofilms and veterinary medicine*, Springer, Berlin.
- Radaelli, M., Silva, B. P., Weidlich, L., Hoehne, L., Flach, A., Costa, L. A. M. A. & Ethur, E. M. (2016). Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 424-430.
- Radunz, M., Trindade, M. L. M., Camargo, T. M., Radunz, A. L., Borges, C. D., Gandra, E. A. & Helbig, E. (2019). Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chemistry*, 276, 180-186.
- Santos, J. R. N., Teles, A. M., Ferreira, C. G. & Mouchrek, A. N. (2020). Avaliação da atividade bactericida e antioxidante do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico de orégano (*Origanum vulgare*). *Research, Society and Development*, 9(10), 1-17.
- Sousa, J.B.G. (2018). *Atividade antioxidante, antimicrobiana e citotoxicidade do óleo essencial do gênero Lippia spp* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Campina Grande. Pombal, Paraíba, Brasil.
- Souza, G. A. A. D., Almeida, A. C., Xavier, M. A. S., Silva, L. M. V., Sousa, C. N., Sanglard, D. A & Xavier, A. R. E. (2019). Characterization and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains resistant to beta-lactams isolated from the milk of cows diagnosed with subclinical mastitis. *Veterinary World*, 12(12), 1931-1939. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1931-1939>
- Szweda, P., Schielmann, M., Milewski, S., Frankowska, A., Jakubczak, A. (2012). Biofilm production and presence of ica and bap genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the Eastern Poland. *Polish Journal of Microbiology*, 61(1), 65-69.
- Xu, J.G., Liu, T., Hu, Q.P., & Cao, X.M. (2016). Composição química, propriedades antibacterianas e mecanismo de ação do óleo essencial de cravo-da-índia contra *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21(9), 1194. <https://doi.org/10.3390/molecules21091194>.
- Weerasekera, M. M., Wijesinghe, G. K., Jayarathna, T. A., Gunasekara, C. P., Fernando, N., Kottegoda, N. & Samaranyake, L. P. (2016). Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 111(11), 697-702.
- Walmiki, M. R., Ravishankar, R. (2017). Cell Attachment and Anti-biofilm activity of *Syzygium aromaticum*, *Cuminum cyminum* and *Piper nigrum* essential oil against pathogenic bacteria. *TEOP*, 20(1), 59-69.