



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



**BIOATIVIDADE DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO
TRANS-CINAMALDEÍDO CONTRA *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A
METICILINA (MRSA)**

JULIANA DE OLIVEIRA COSTA

RECIFE
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

JULIANA DE OLIVEIRA COSTA

**BIOATIVIDADE DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO
TRANS-CINAMALDEÍDO CONTRA *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A
METICILINA (MRSA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Erilane de Castro Lima Machado

CO-ORIENTADORAS: Prof^a Dr^a Mariane Cajubá de Brito Lira Nogueira

Dr^a Michele Rose de Oliveira Silva

Recife 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C837b

Costa, Juliana de Oliveira

BIOATIVIDADE DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO TRANS-CINAMALDEÍDO
CONTRA *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA) / Juliana de Oliveira Costa. - 2020.
72 f. : il.

Orientadora: Prof Dr Erilane de Castro Lima Machado.

Coorientadora: Prof Dr Mariane Cajuba de Brito Lira Nogueira e Dr Michele Rose de Oliveira Silva.
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Recife, 2021.

1. Patógenos. 2. Segurança alimentar. 3. Antimicrobianos naturais. 4. Resistência bacteriana. 5. Microencapsulação. I.
Machado, Prof Dr Erilane de Castro Lima, orient. II. Silva, Prof Dr Mariane Cajuba de Brito Lira Nogueira e Dr
Michele Rose de Oliveira, coorient. III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**BIOATIVIDADE DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO
TRANS-CINAMALDEÍDO CONTRA *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A
METICILINA (MRSA)**

Por

Juliana de Oliveira Costa

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 10/12/2020 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

Prof/a/ Dr/a. Andreлина Maria Pinheiro Santos
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof/a/ Dr/a. Gláucia Manoella de Souza Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr.. Francisco Humberto Xavier Júnior
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

À Deus, por ser extremamente paciente e piedoso comigo...

À minha família e amigos, com muito amor e carinho...

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pois sempre estive ao meu lado, e nunca permitiu que desistisse... Sem ele nada disso seria possível.

Á meu esposo Luciano Ferreira, obrigado pelo incentivo, compreensão, companhia e torcida nessa etapa difícil da minha vida. Sou eternamente grato por toda sua ajuda.

Á meu filho de quatro patas, Maylinho, que mesmo sem entender, me fazia companhia nas longas noites de estudos e pesquisas.

Á meu filho Arthur, meu grande estímulo para seguir buscando a realização dos meus objetivos.

Á minha orientadora Prof. Prof^a Dr^a Erilane de Castro Lima Machado, há quem muito admiro e que será sempre uma referência em minha vida profissional, não teria palavras para descrever o quanto sou grata.

Á Michelle Oliveira, técnica do laboratório de Microbiologia de alimentos e minha Co-orientadora e exemplo de profissional por todos os ensinamentos repassados.

Á professora Mariane Cajubá, pelas colaborações dadas ao trabalho, sem dúvidas de fundamental importância.

Aos amigos e colegas do programa de pós Graduação, pois juntos trilhamos uma etapa importante de nossas vidas. Em especial Merielly Santana, Maria Luiza e Nadja Morais.

Á todos os professores do programa, pois sem vocês nada disso seria possível.

Á Silvio Assis, técnico do laboratório de Bromatologia, por todo apoio recebido.

Á Ana, secretária do nosso programa, que sempre nos auxiliou no que precisávamos

À banca examinadora por todas as contribuições e por terem aceitado participar.

Por fim, agradeço a CAPES pelo apoio financeiro e a Universidade Federal Rural de Pernambuco por ter concedido a oportunidade de obter o título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Por que a Deus nenhuma coisa é impossível

São Lucas, 1:37

RESUMO

A ocorrência e disseminação de resistência bacteriana (RAM) vêm sendo colocados como um problema de saúde pública, e uma das principais formas de disseminação dessas bactérias resistentes consistem na falta de práticas higiênico-sanitárias do ambiente de processamento de armazenamento de alimentos. O objetivo do presente trabalho foi produzir micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído com bioatividade na inibição de *Staphylococcus aureus* MRSA. As micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído foram preparadas por meio da técnica de coacervação simples, utilizando como material de parede a quitosana 5% (p/v) e a vanilina como material reticulante. A caracterização foi realizada em termos de eficiência de encapsulação, diâmetro médio das micropartículas, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia através de MEV e microscopia ótica. A análise antibacteriana das partículas contra *Staphylococcus aureus* MRSA foi realizada por meio de técnica de microdiluição em caldo, determinando-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM). As micropartículas apresentaram diâmetro médio de $1,92 \pm 0,005$ μ m, PDI de $0,39 \pm 0,2$, uma carga de superfície de $20,61 \pm 0,8$ mV, eficiência de encapsulação de 93,81% e um formato esférico e enrugado. Os ensaios da atividade antibacteriana mostraram que as micropartículas de quitosana contendo o *trans*-cinamaldeído apresentaram atividade antibacteriana para cepas de *S.aureus* ATCC (6538) como também para cepas *S. aureus* MRSA, obtendo-se valores de CIM menores do que os obtidos para os tratamentos com o óleo livre e com as micropartículas vazias. Assim, micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído podem ser uma alternativa promissora para o controle da multiplicação e disseminação de *S. aureus* sensíveis e resistentes a Meticilina (MSSA e MRSA).

Palavras-chave: Patógenos; segurança alimentar; antimicrobianos naturais; resistência bacteriana

ABSTRACT

The occurrence and spread of bacterial resistance (RAM) has been identified as a public health problem, and one of the main ways of spreading these resistant bacteria is the lack of hygienic-sanitary practices in the food storage processing environment. The aim of the present work was to produce chitosan microparticles containing *trans*-cinnamaldehyde with bioactivity in the inhibition of *Staphylococcus aureus* MRSA. Chitosan microparticles containing *trans*-cinnamaldehyde were prepared using the simple coacervation technique, using 5% (w / v) chitosan as the wall material and vanillin as the crosslinking material. The characterization was performed in terms of encapsulation efficiency, average microparticle diameter, polydispersity index, zeta potential, morphology through MEV and optical microscopy. The antibacterial analysis of the particles against *Staphylococcus aureus* MRSA was performed using a broth microdilution technique, determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The microparticles had an average diameter of 1.92 ± 0.005 μm , a PDI of 0.39 ± 0.2 , a surface load of 20.61 ± 0.8 mV, an encapsulation efficiency of 93.81% and a shape spherical and wrinkled. The antibacterial activity tests showed that the chitosan microparticles containing the *trans*-cinnamaldehyde showed antibacterial activity for strains of *S.aureus* ATCC (6538) as well as for strains *S. aureus* MRSA, obtaining lower MIC values than those obtained for treatments with free oil and empty microparticles. Thus, chitosan microparticles containing *trans*-cinnamaldehyde may be a promising alternative for controlling the multiplication and dissemination of methicillin-sensitive and resistant *S. aureus* (MSSA and MRSA).

Keywords: Pathogens; food security; natural antimicrobials; bacterial resistance

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus spp.* Característica morfotintorial pela técnica de Gram.....19
- Figura 2.** Fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*.....20
- Figura 3.** Três mecanismos principais de transferência de genes de resistência em uma bactéria. (a) transdução (b) conjugação (c) transformação.....23
- Figura 4.** Componentes das classes de complexo mec existentes em *S. aureus*.....26
- Figura 5.** Ação do gene mecA.....27
- Figura 6.** Canela (*Cinnamomum zeylanicum*).....30
- Figura 7.** Estrutura química do *Trans*-cinamaldeído.....32
- Figura 8.** Estágios da coacervação simples: (A) dispersão da fase hidrofóbica na solução polimérica, (B) separação de fases do polímero, (C) formação da parede das microcápsulas e (D) enrijecimento da parede através de reticulação.....35

ARTIGO

- Figura 1.** Fotomicrografia por microscopia ótica (MO) de micropartículas de quitosana contendo trans-cinamaldeído em lente objetiva de 40x ressaltando a e dispersão do óleo essencial em todo o material de parede.....61
- Figura 2** Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varedura (MEV) das micropartículas de quitosana contendo *Trans*-cinamaldeído. (A) Fotomicrografia na escala 500 µm ressaltando a superfície enrugada e o diâmetro médio de uma micropartícula. (B) Fotomicrografia na escala 2 mm de um grupo de micropartículas ressaltando seu formato esférico e diâmetro médio.....62

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Micronutrientes presentes na canela em pó.....31

ARTIGO

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) em (mg.mL^{-1}) do *trans*-cinamaldeído livre (OL), encapsulado (MCA) e encapsulado vazio (MSA).....64

LISTAS DE ABREVIATURAS

- CA-MRSA- *S. aureus* resistentes à meticilina adquiridos na comunidade
- CBM- Concentração bactericida mínima
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CCR- Cassette chromosome recombinase
- CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- DVA's- Doenças veiculadas por alimentos
- EE- Enterotoxinas estafilocócicas
- EOs- Óleos essenciais
- FDA- Food and Drug Administration
- HA-MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina associado a hospital
- MDR- Microrganismos multiresistentes
- MGEs- Elementos genéticos móveis
- MSSA - *Staphylococcus aureus* sensíveis a Meticilina
- MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina
- OEZey- Óleo essencial da canela
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- PCR- Triagem molecular da reação
- PBPs- Proteínas de ligação à penicilina
- PBP2a- Proteínas ligadoras de penicilina
- RAM- Resistência antimicrobiana
- THG- Transferência horizontal de genes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivos geral.....	17
2.1. Objetivos específicos.....	17
3. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE.....	17
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
4.1. Segurança alimentar e surtos de doenças veiculadas por alimentos.....	18
4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> : Patogenicidade e relevância no contexto da segurança alimentar.....	19
4.3. Resistência Bacteriana.....	22
4.4. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina – MRSA.....	24
4.5. Estratégias de controle da disseminação do <i>staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA).....	28
4.6. Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	29
4.7. Cinamaldeído.....	31
4.8. Microencapsulação pó coacervação simples.....	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

ARTIGO

1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1. Local de realização da pesquisa.....	56
2.2. Materias.....	56
2.3. Preparo das micropartículas de quitosana contendo <i>trans</i> -cinamaldeído.....	56
2.4. Caracterização das micropartículas de quitosana contendo <i>trans</i> -cinamaldeído....	57
2.4.1.Índice de polidispersão e potencial zeta.....	57

2.4.2. Avaliação da morfologia das micropartículas de quitosana contendo <i>trans</i> -cinamaldeído.....	57
2.4.2.1. Microscopia optica (MO).....	57
2.4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) diâmetro das micropartículas.....	57
2.4.3. Eficiência de encapsulação.....	57
2.5. Análise da atividade antimicrobiana in vitro.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.1. Obtenção das micropartículas de quitosana contendo <i>trans</i> -cinamaldeído.....	59
3.2. Caracterização das partículas.....	60
3.2.1. Índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ZP).....	58
3.2.2 Microscopia ótica (MO).....	60
3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e diâmetro das micropartículas.....	61
3.2.4 Eficiência de encapsulação.....	62
3.3. Análise da atividade antimicrobiana in vitro.....	63
4. CONCLUSÃO.....	66
5. AGRADECIMENTOS.....	67
6. REFERÊNCIAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência e disseminação de Resistência Antimicrobiana (RAM) em bactérias vem sendo colocada como um problema de saúde pública. Infecções causadas por microrganismos multirresistentes (MDR) estão diretamente associadas com aumento da mortalidade quando comparadas àquelas causadas por bactérias suscetíveis aos antimicrobianos (MUNITA e ARIAS., 2016).

Em relatórios recentes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem definido a RAM como uma das três mais importantes ameaças de saúde pública do século XXI, relatando elevadas taxas de resistência em bactérias, por exemplo, *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes a Meticilina (MSSA e MRSA) (GORWITZ., 2008; HUIJBERS et al., 2015). Esses microrganismos causam infecções associadas à saúde e são adquiridas nas comunidade (WHO, 2014; MUNITA e ARIAS, 2016; MARSTON et al., 2016).

Uma das principais formas de disseminação de bactérias sensíveis e resistentes consiste na falta de práticas higiênico-sanitárias adequadas no ambiente de processamento e armazenamento de alimentos (TEIXEIRA et al., 2008; GUTIÉRRE et al., 2012; HO et al., 2014). De acordo com Fetsch e Johler (2018), estratégias que visem diminuir ou que ajudem a controlar e combater os riscos causados por essas bactérias são essenciais e devem levar em conta fatores como o tipo de processamento de alimentos e a observação das boas práticas de fabricação e manipulação. Associado as Boas Práticas, tem-se observado avanços nas técnicas de conservação a fim de garantir um alimento seguro e, ao mesmo tempo, atender a demanda de conservar atributos nutricionais e de qualidade (MACHADO et al., 2011). Isto têm resultado na crescente busca por novas alternativas, dentre elas o uso de antimicrobianos, sendo os naturais os mais relevantes visando diminuir os riscos à saúde e a compatibilidade química e sensorial (MACHADO et al., 2011).

Agentes antimicrobianos de origem vegetal, como o óleo essencial de plantas, são reconhecidos e utilizados na preservação de alimentos há muitos séculos. Nesta perspectiva, os óleos essenciais são considerados os agentes antimicrobianos mais importantes presentes nas plantas e conseqüentemente os mais utilizados para este fim (MACHADO et al., 2011).

A canela (*Cinnamomum verum*) é uma das especiarias mais antigas e conhecidas do mundo (AMARA et al., 2008). O cinamaldeído (aldeído cinâmico ou 3-fenil-2-propenal) é um álcool terpeno cíclico, sendo o principal componente ativo do óleo essencial da canela (60-75%). Contém compostos terpenóides ou fenólicos, hidrofóbicos, possuindo poderosa atividade antimicrobiana contra uma variedade de patógenos, incluindo fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RIEGER e SCHIFFMAN, 2014). Entretanto a sua aplicação na conservação de alimentos é limitada pelo seu sabor característico, volatilidade e natureza lipofílica (LÓPEZ-MATA et al., 2017).

Visando a aplicabilidade desses componentes em matrizes alimentares, sistemas de modelo alimentares vêm sendo propostos para elucidar a influência de componentes alimentares na ação antimicrobiana de compostos naturais (GUTIERREZ; BARRY-RYAN e BOURKE., 2009; XIAO et al., 2014). Neste contexto, a microencapsulação vem ganhando espaço no cenário científico mundial, pois proporciona a proteção e estabilidade do material encapsulado, criando maior estabilidade, prolongando a vida útil, e permitindo sua liberação em local e quantidade propícia (VASISHT., 2014; HOLKEM et al., 2015).

Entre as diferentes técnicas de encapsulação decidiu-se por estudar a aplicação do processo de coacervação simples, quando envolve um único polímero e é caracterizada pela separação da fase líquida através da adição de um eletrólito (sal ou álcool) que compete pela água à solução coloidal (LEIMANN., 2008). O sucesso na aplicação da técnica depende da determinação das condições apropriadas para deposição do coacervado (VASILIU et al., 2005). Para formação das micropartículas por esta técnica, uma das considerações mais importantes é o material envoltório da micropartícula, dentre as diversas substâncias que podem ser utilizadas, a quitosana (fonte alternativa obtida da casca de crustáceos) vem obtendo destaque dada a sua alta capacidade de formar partículas e seu potencial antimicrobiano (SUAVE et al., 2006; GONSALVES, et al .,2011).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi obter e caracterizar micropartículas de *trans*-cinamaldeído por coacervação simples em matriz encapsulante de quitosana, além de testar a atividade antimicrobiana *in vitro* na inibição de *S. aureus* Resistentes a Meticilina (MRSA).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obter micropartículas de quitosana contendo *Trans*-cinamaldeído com bioatividade na inibição de *Staphylococcus aureus* MRSA.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar o processo de encapsulação do *Trans*-cinamaldeído por coacervação simples utilizando a quitosana como material de parede e vanilina como reticulante;
- Caracterizar as micropartículas quanto à morfologia, diâmetro, índice de polidispersão e carga de superfície (potencial zeta);
- Avaliar a eficiência de encapsulação do *Trans*-cinamaldeído na condição do processo em estudo;
 - Avaliar a atividade antibacteriana das micropartículas com o *Trans*-cinamaldeído na inibição de *Staphylococcus aureus* MRSA.



3. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

Com o crescimento significativo das doenças veiculadas por alimentos a nível mundial, garantir um alimento seguro é essencial para a segurança alimentar. Bactérias resistentes aos antimicrobianos são consideradas uma ameaça em potencial à saúde humana, uma vez que infecções causadas por essas bactérias requerem maior tempo e custo para o tratamento. Elas também apresentam um potencial maior de morbimortalidade, uma vez que conseguem se proliferar de forma mais acelerada, quando comparada com outras bactérias não resistentes. Assim, como pergunta condutora: A elaboração de partículas de quitosana contendo *Trans*-cinamaldeído por coacervação simples seria uma alternativa a fim de se proporcionar uma ação antibacteriana com maior eficácia de antimicrobianos naturais na inibição de *S. aureus* Resistentes a Meticilina (MRSA).

Como hipótese tem-se que a encapsulação de *trans*-cinamaldeído em matriz de quitosana, por coacervação simples irá potencializar a propriedade antimicrobiana do fitoquímico na inibição de *S. aureus* Resistentes a Meticilina (MRSA).

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Segurança alimentar e surtos de doenças veiculadas por alimentos

A adequação da alimentação pode ser compreendida sob diversos aspectos e, entre estes, a qualidade sanitária dos alimentos. A segurança alimentar abrange, entre outros aspectos, a garantia da qualidade biológica, sanitária, nutricional e tecnológica dos alimentos, bem como seu aproveitamento, estimulando práticas alimentares e estilos de vida saudáveis que respeitem a diversidade étnica, racial e cultural da população (BRASIL, 2017). Já a segurança de alimentos refere-se aos alimentos seguros ou a inocuidade dos alimentos (WHO, 2013).

Entre os principais desafios a serem alcançados pela saúde pública, está a garantia da oferta de alimentos seguros à população. Embora haja grande interesse por parte de governos de todo o mundo para a melhora da segurança do abastecimento alimentar, a ocorrência de doenças veiculadas por alimentos (DVA's) continua sendo um significativo problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2006; BRASIL, 2017).

DVA's é um termo genérico relacionado a uma síndrome que resulta em diferentes sintomas como anorexia, vômito, náuseas e/ou diarreia. As DVA's são resultados da ingestão de alimentos e/ou água contaminada por toxinas, agrotóxicos, bactérias, vírus, príons, produtos químicos e metais pesados (BRASIL, 2011).

As DVA's podem ser identificadas quando uma ou mais pessoas apresentam sintomas similares, após a ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos patogênicos, suas toxinas, substâncias químicas tóxicas ou objetos lesivos, configurando uma fonte comum (FOOD SAFETY BRAZIL, 2016). A maioria dos surtos tem sido relacionada à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, sem qualquer alteração organoléptica visível, e isso ocorre porque a dose infectante de patógenos alimentares geralmente é menor que a quantidade de micro-organismos necessária para degradar os alimentos (CDC 2006; FOOD SAFETY BRAZIL, 2016).

No Brasil, no período de 2003 a 2018 foram notificados 10.898 surtos de DVA's, com envolvimento de 208.246 doentes, uma média anual de 681 surtos e 13.015 doentes (BRASIL, 2019). Ainda, de acordo com os dados disponíveis até maio de 2019, apontam como agentes mais frequentes os de origem bacteriana e dentre eles,

S. aureus, micro-organismo frequentemente envolvido em surtos de toxiose alimentar, estando muito associado à manipulação inadequada dos alimentos, uma vez que é comumente encontrado na pele, mucosas do trato respiratório superior e intestino de humanos (BRASIL, 2019). Ainda, *S. aureus* frequentemente abriga determinantes de resistência a antimicrobianos (como por exemplo, os *S. aureus* resistentes à meticilina, conhecidos como MRSA) o que dificulta ainda mais o tratamento dessas toxioses e aumenta significativamente os custos associados (ZELL et al., 2008).

4.2. *Staphylococcus aureus*: Patogenicidade e relevância no contexto da segurança alimentar

Staphylococcus aureus é um patógeno comensal e oportunista que pode causar a contaminação de produtos alimentares durante a preparação e o processamento. É considerada a espécie mais patogênica do gênero *Staphylococcus* sendo classificado como cocos gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados (Figura 1). São considerados anaeróbios facultativos, com multiplicação rápida e sua temperatura de crescimento pode variar de 4 a 46°C (CASSETTARI., 2005; JORGENSEN et al., 2015; GRACE & FETSCH., 2018). São comumente encontrados em diversas superfícies ambientais e principalmente na superfície corporal dos mamíferos, estando presentes na superfície nasal, cabelos, garganta e pele, podendo causar uma gama de doenças diferentes. A maioria frequentemente, causa infecções de pele e infecções do trato respiratório (MUSTAFA et al., 2009; OTTO., 2014).

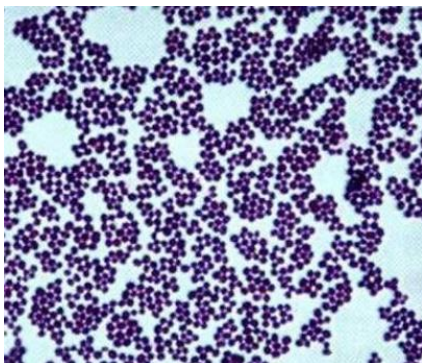


Figura 1. Microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. Característica morfotintorial pela técnica de Gram.

Fonte: Tortora, Funke e Case (2005).

Essa versatilidade de cepas de *S. aureus* como agente patogênico resulta do fato de que as cepas de *S. aureus* possuem um repertório variado fatores de virulência (Figura 2), muitos dos quais são codificados em elementos genéticos (MGEs), tais como plasmídeos ou profagos (bacteriófago) e pode ser transferido entre cepas por gene horizontal transferência (HGT) (MORIKAWA et al., 2013). Esse alto potencial infeccioso do *S. aureus* também está associado à produção de moléculas com grande poder patogênico, que incluem enzimas, como as betalactamases, coagulases, hialuronidases e catalases, e a produção de toxinas como as alfa, beta e gama toxinas, a leucocidina, a esfoliatina, a toxina do choque tóxico e as enterotoxinas, sendo esta última a principal causadora de de intoxicações alimentares de origem bacteriana (NOVICK., 2000; ARGUDÍN et al., 2010).

Grande parte das cepas *S. aureus* são produtoras de enterotoxinas (EE) em alimentos. Cinco enterotoxinas estafilocócicas clássicas são as causas mais comuns de DVA por *S. aureus*, são elas: SEA, SEB, SEC, SED e SEE (KIM et al., 2011). Estas toxinas são proteínas básicas constituídas por 220-240 aminoácidos e têm pesos moleculares semelhantes de 25-30 kDa. A SEA é mais frequentemente envolvida na intoxicação alimentar causada pelo *Staphylococcus* (WU et al., 2016).

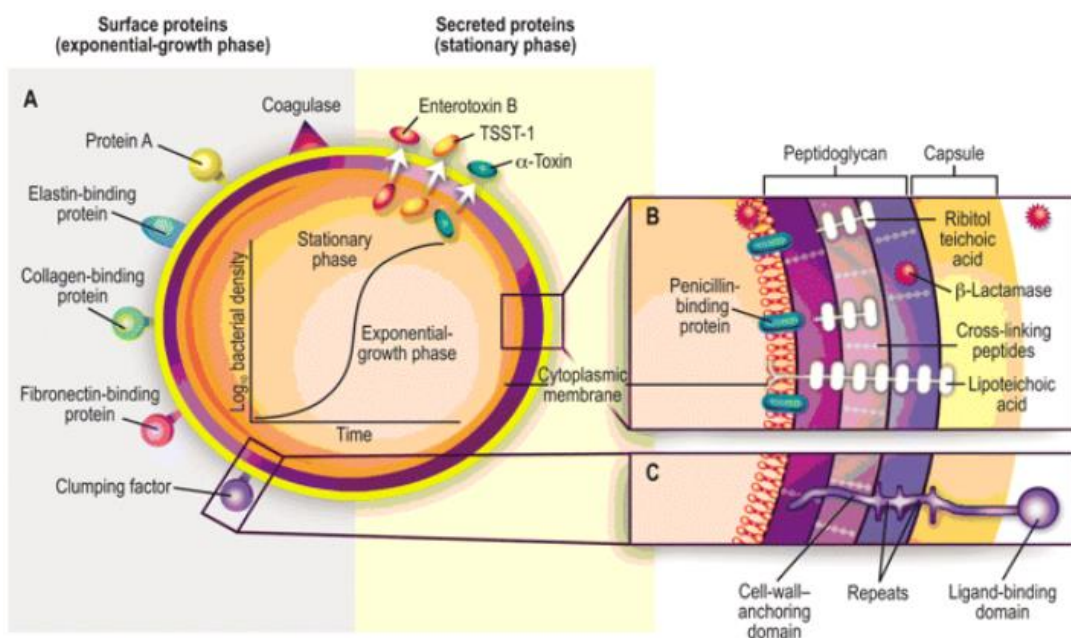


Figura 2. Fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Gordon e Lowy (2008)

Dados do ministério da saúde do Brasil destacam os principais agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DVA's no país entre os anos de 2000 a 2017, onde *S. aureus* ocupa a terceira colocação (BRASIL, 2018). Para que uma intoxicação estafilocócica ocorra é preciso que existam condições favoráveis ao crescimento de *S. aureus* no alimento, situação em que rapidamente podem ser alcançados níveis elevados de contaminação, sendo um perigo para a saúde pública (MOHAMED et al., 2015).

É bem conhecido que o consumo de alimentos contaminados com esta bactéria pode causar de sintomas leves a graves, os principais sintomas de intoxicações estafilocócicas incluem náuseas, vômitos e cólicas abdominais (FORSYTHE., 2013). O início dos sintomas causados por este patógeno costuma ser rápido, ocorrendo no período de poucas horas após a ingestão do alimento. Os sintomas podem ser bastante agudos, dependendo da suscetibilidade individual à toxina, da quantidade de alimento contaminado ingerido, da quantidade de toxina no alimento ingerido e da saúde geral do indivíduo (FORSYTHE., 2013).

Dentre os alimentos que são frequentemente responsáveis pela intoxicação estafilocócica incluem carne e produtos à base de carne, assim como produtos de aves e ovos ; leite e produtos lácteos; saladas; produtos de panificação, em especial doces e bolos recheados de creme e recheios de sanduíche (US FOOD and DRUG ADMINISTRATION, 1998; RAJKOVIC.A, 2016). Embora esta doença seja auto limitante, ocasionalmente pode se tornar mais ameaçadora provocando uma hospitalização ou até mesmo a morte, sobretudo se envolver indivíduos do grupo de risco como crianças, idosos e imunodeprimidos (TAREKGNE et al., 2016). *S. aureus* também possui a capacidade de formar biofilmes, compostos por multicamadas de células e resistir à dessecação, ao calor e são mais tolerantes aos desinfetantes comuns do que a maioria das bactérias podendo permanecer em superfícies, utensílios e equipamentos utilizados no preparo de alimentos, o que constitui outra importante fonte de contaminação (TAREKGNE et al., 2016).

É importante salientar que a falta de práticas higiênico-sanitárias adequadas no ambiente de processamento e armazenamento de alimentos pode resultar na contaminação de produtos alimentícios com *S. aureus* pelos produtos de cepas enterotoxigênicas nos alimentos. Essa contaminação normalmente ocorre durante a manipulação direta dos alimentos pelos manipuladores de alimentos, que podem ser

indivíduos portadores assintomáticos ou indivíduos que possuem algum tipo de infecção (TEIXEIRA et al., 2008; GUTIÉRRE et al., 2012; HO et al., 2014). De acordo com FETSCH & JOHLER (2018), estratégias que visem diminuir ou que ajudem a controlar os riscos são essenciais e devem levar em conta fatores como o tipo de processamento dos alimentos, a observação das boas práticas e a variabilidade da produção de enterotoxinas nos diversos alimentos.

Em paralelo, outra característica relacionada a *S. aureus* está a sua capacidade de abrigar determinantes de resistência a antimicrobianos, como por exemplo, os *S. aureus* resistentes à meticilina, conhecidos como MRSA. Existe uma prevalência relativamente alta de cepas multirresistentes para esta espécie, além disso, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) tem sido uma das principais preocupações de saúde pública, ficando atrás apenas do *C. difficile* como causa de infecções associadas aos cuidados de saúde (MARSTON et al., 2016; BENKERROUM., 2018).

4.3. Resistência Bacteriana

A resistência bacteriana está intimamente associada ao uso de agentes antimicrobianos na prática clínica. A terapia prolongada com antibióticos pode levar ao desenvolvimento de resistência em um microrganismo que inicialmente é sensível a antibióticos, mas depois pode adaptar-se gradualmente e desenvolver resistência aos antibióticos. Quando um antibiótico ataca bactérias, as células bacterianas suscetíveis a ele morrerão, mas aqueles que têm alguma resistência sobreviverão (DŽIDIC., 2008; GIEDRAITIENĖ., 2011).

Observando-se de uma perspectiva evolutiva, as bactérias usam estratégias genéticas principais para se adaptarem o "ataque" antibiótico: (1) mutações no (s) gene (s) frequentemente associado ao mecanismo de ação do composto e (2) aquisição de DNA estranho que codifica para determinantes de resistência através da transferência horizontal de genes (THG), que ocorre de uma bactéria para outra e que pode ocorrer através de três mecanismos principais: transferência de plasmídeo, transferência por entrega viral e transferência de DNA livre (Figura 3). Os genes de resistência podem ser transferidos de três maneiras principais: (a) transdução (via bacteriófagos e integrons), (b) conjugação (via plasmídeos e transposons conjugativos) e (c) transformação (via incorporação de DNA cromossômico). Então os genes são incorporados no cromossomo

receptor por recombinação ou transposição e pode ter uma ou várias alterações na sequência gênica (DŽIDIC., 2008; HAWKEY., 2008; GIEDRAITIENĖ., 2011; MUNITA e ARIAS., 2012).

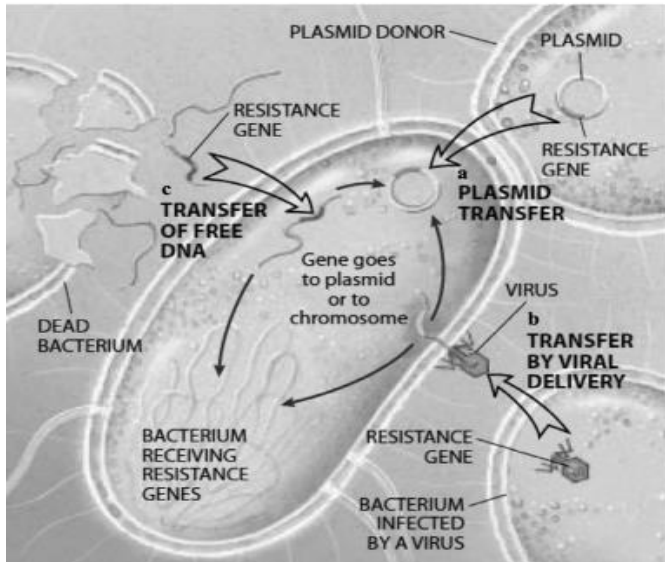


Figura 3. Três mecanismos principais de transferência de genes de resistência em uma bactéria. (a) transdução (b) conjugação (c) transformação
Fonte: Giedraitienė, 2011.

O surgimento de um fenótipo resistente a agentes antimicrobianos depende de vários fatores de um hospedeiro: grau de expressão da resistência, capacidade de um microrganismo para tolerar o mecanismo de resistência, local de colonização inicial e outros fatores (DŽIDIC., 2008; MUNITA e ARIAS., 2012). Quando os determinantes da resistência estão nos plasmídeos, eles se espalham rapidamente dentro do gênero e até gêneros bacterianos não relacionados. Quando a resistência é associada aos genes nos cromossomos, os microrganismos resistentes se espalharão mais lentamente (GIEDRAITIENĖ., 2011; MUNITA e ARIAS., 2012).

Com isso, a resistência bacteriana vem sendo classificada como um problema global complexo, multifacetado e urgente. Infecções causadas por bactérias RAM estão associadas com excesso de mortalidade, internações prolongadas, aumento de custos. Em seu relatório global sobre vigilância de resistência a antimicrobianos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou taxas muito altas de resistência em bactérias, por exemplo, *Staphylococcus aureus* que causam infecções associadas à saúde e é

caracterizado por sua alta capacidade de adaptação aos antimicrobianos pela aquisição de mecanismos de resistência particularmente contra a meticilina, complicando ainda mais o tratamento de infecções (DE KRAKER et al., 2011; WHO, 2014).

4.4 *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA –MRSA

Em 1928, Alexandre Fleming descobriu a penicilina quando constatou que as colônias de *S. Aureus* se encontravam lisadas na presença do fungo *Penicillium notatum*. A partir de então, foi possível o tratamento de infecções causadas por *S.aureus* (MOELLERING, 2011). Contudo, pouco tempo depois da introdução da penicilina na prática clínica, em 1942, foram descritas cepas de *S. aureus* com resistência a esse antibiótico através da aquisição de genes que codificam as β -lactamases, enzimas que hidrolisam hidrolisa o anel beta-lactâmico que é central para o antimicrobiano, designadas por penicilinases (KIRBY., 1944; MOELLERING., 2011; BOSWIHI & UDO., 2018).

Com a disseminação da resistência à penicilina entre as cepas de *S. aureus*, em 1960, é lançada no comércio, a meticilina, uma penicilina semi-sintética resistente às beta-lactamases. A meticilina é um derivado semi-sintético da penicilina desenvolvido, no final da década de 1950, por uma modificação da estrutura da penicilina que conferiu resistência à penicilinase. Porém, já em de 1961 surgiu a descrição de cepas resistentes à meticilina as quais foram denominadas de “Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*” – MRSA, e desde então, houve uma epidemia global de doenças resistentes à meticilina. *Staphylococcus aureus* (MRSA) tanto na área da saúde quanto na comunidade. O termo MRSA é utilizado para designar linhagens de *S. aureus* que não respondem ao tratamento com antibióticos β -lactâmicos, antibióticos bactericidas, que atuam inibindo a síntese de mucopeptídeo ou peptidoglicano, na fase parietal (JEVONS., 1961; CAMPBELL., 2012; DAVID e DAUM., 2010; BOSWIHI & UDO., 2018).

As células estafilocócicas são rodeadas por uma estrutura em malha, com 20 a 40nm de espessura, chamada parede celular de peptidoglicano, que é composta por uma série de pequenas cadeias alternadas de ácido N-acetilmurâmico e resíduos N-acetilglicosamina. As cadeias ácido N-acetilmurâmico e resíduos N-acetilglicosamina são geralmente unidas entre si por uma pentaglicina, através de uma ligação cruzada. Essa ligação cruzada ou transpeptidação ocorre na superfície externa da parede celular

em uma reação catalisada por proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Os β -lactâmicos agem a partir de sua ligação a estas proteínas, inibindo a formação do peptidoglicano e, conseqüentemente causando desestruturação da parede e a morte da bactéria (STAPLETON., 2007; BOSWIHI & UDO., 2018).

A resistência à meticilina foi adquirida através da transferência horizontal do gene *mecA* de uma fonte desconhecida para *S. aureus* suscetível à meticilina (MSSA). (STROMMINGER et al, 2014). O MRSA é distribuído em todo o mundo e constitui uma grande preocupação em saúde humana devido à sua epidemiologia complexa e sua capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência a antibióticos. Devido ao seu potencial patogênico e à complexidade de seu tratamento, o MRSA tem recebido mais atenção do que os sensíveis à meticilina - MSSA (JEVONS MP., 1963; DYKE., 1966; DAVID., 2011; RODRÍGUEZ et al., 2015).

Staphylococcus aureus resistentes à meticilina é globalmente prevalente em contextos hospitalares como MRSA associado a hospital (HA-MRSA), que se deve principalmente à disseminação intra e inter-hospitalar de linhagens clonais epidêmicas, porém também houve o surgimento de MRSA na comunidade sem nenhuma relação com os serviços de saúde (CA-MRSA), essas cepas são geralmente suscetíveis a antibióticos não beta-lactâmicos, geralmente expressam níveis mais baixos de resistência à oxacilina e multiplicam-se mais rapidamente do que as cepas HA-MRSA (DEURENBERG et al., 2007; UDO., 2013; MEDIAVILLA et al., 2015).

Seu mecanismo mais importante de resistência a antibióticos nos *Staphylococcus* está associado ao gene *mecA*, que confere resistência à grande classe de antibióticos β -lactâmicos (ROLO et al., 2017). Essa resistência dar-se através de um sistema de transdução de sinal que desencadeia a síntese de uma proteína de ligação à penicilina, denominada proteínas ligadoras de penicilina (PBP2a), que mostra baixa afinidade por antibióticos beta-lactâmicos, como penicilina e meticilina, e assim promove a sobrevivência bacteriana por prevenção do antibiótico de inibição da síntese da parede celular (BOTELHO et al., 2011, LOVERING et al., 2012, MARSTON et al., 2016). Como resultado, mesmo na presença de antibiótico beta-lactâmico, a biossíntese da camada peptidoglicana não é interrompida e a bactéria pode sobreviver. São descritas 5 classes de complexo *mec* (Figura 4), de acordo com a organização genética da unidade regulatória do gene *mecA* (região *mecR1-mecI*). Em *S. aureus* existem apenas 3 delas:

as classes A, B e C, que possui duas variantes, C1 e C2 (MILHEIRIÇO., 2007; DEURENBERG & STOBBERINGHT., 2008).

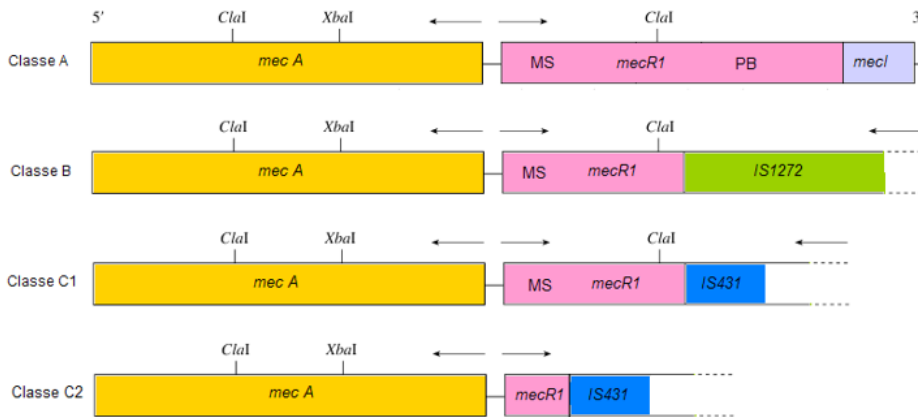


Figura 4. Componentes das classes de complexo *mec* existentes em *S. aureus*.

Fonte: Adaptado de LIM, 2002.

A resistência em função do gene *mecA* (Figura 5) se deve principalmente à aquisição de um elemento genético móvel, que é conhecido como Cromossomo Cassete Staphylococcal SCCmec, que sempre insere no mesmo local no cromossomo, na extremidade 3' do *orfX*, que codifica uma RNA metiltransferase. O SCCmec é portador do *mecA*, com tamanho entre 21 e 61kb, que está inserido no cromossomo (DEURENBERG & STOBBERINGHT., 2008). Há onze tipos de SCCmec (I a XI), descritos e classificados de acordo com seu tamanho e conteúdo, pelo tipo de “cassete chromosome recombinase” (*ccr*) e a classe do complexo *mec* que eles possuem (SHORE., 2011).

O gene *mecA* está localizado dentro de um operon *mec*, juntamente com seus genes reguladores: *mecl* e *mecR1*, que codificam as proteínas repressoras *mecl* e indutora *mecR1*, respectivamente. A primeira, reprime a transcrição do gene *mecA*, e *mecl/mecR1* na ausência de beta-lactâmicos.

Assim, não há produção de proteína PBP2a, de modo a não haver gasto energético celular desnecessário. Na presença de antibióticos beta-lactâmicos, a proteína

mecRI é clivada, o que leva à clivagem da proteína *mecI* pela metaloprotease liberada na primeira clivagem.

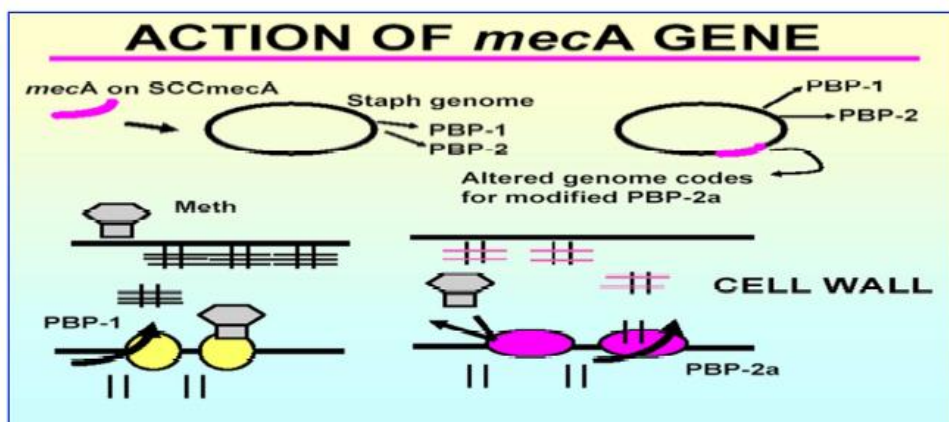


Figura 5. Ação do gene *mecA*

Fonte: Sousa, 2006

Com a degradação da *mecI*, a região operadora do *mecA* fica livre, permitindo a transcrição do gene e produção da proteína alterada PBP2a (DEURENBERG & STOBBERINGHT., 2008; BOUNDY et al., 2013; ROLO et al., 2017).

A Introdução do determinante *mecA* no genoma do *S. aureus* em múltiplas ocasiões, levou ao surgimento e disseminação mundial, com isso *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) apresenta sérios problemas de saúde pública, principalmente devido à sua capacidade de colonizar e infectar seres humanos e animais de vários *S. aureus* resistentes à meticilina. (MRSA) (FUDA et al., 2004; LAURENT et al., 2012; PETINAKI E SPILIOPOULOU., 2012; PAPADOPOULOS et al., 2019). Cepas de MRSA têm sido relatadas de várias fontes de alimentos, como aves, suínos, bovinos, leite e vegetais, sugerindo que os alimentos podem servir como reservatórios. É importante identificar a origem do MRSA relacionado a alimentos e avaliar a patogenicidade potencial desses isolados de MRSA (WU et al., 2018).

Eventos de intoxicação alimentar são frequentemente subnotificados e, portanto, *S. aureus* e MRSA em alimentos podem estar subestimados. A vigilância contínua de patógenos transmitidos por alimentos e o monitoramento do surgimento de MRSA e diagnóstico rápido e adequado são essenciais para a saúde pública (CRAGO et al., 2010). O tratamento de infecções estafilocócicas tornou-se extremamente desafiador

devido à propensão do organismo a evoluir rapidamente em cepas resistentes a antibióticos. O tratamento bem sucedido dessas infecções deve ser precoce e com diagnóstico preciso. Em contextos clínicos, o diagnóstico é baseado em combinação de informação epidemiológica, clínicasintomas e caracterização da infecção por Cepas MRSA (WU et al., 2018).

Métodos convencionais de detecção para essas cepas consiste no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco de antibiograma, no qual as cepas são classificadas como resistente, intermediário ou sensível de acordo com o tamanho do alo formado, tendo como base a tabela de referência estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* para cada antimicrobiano. Há ainda técnicas mais novas de identificação como ágar seletivos para MRSA (*MRSASelect*, *CHROM Agar MRSA*, *MRSA ID*), técnica de aglutinação em látex para detecção de proteína A e fator de coagulação, detecção de PBP2a, que apresentam boa sensibilidade e especificidade e tempos de resposta intermediários entre as metodologias tradicional e molecular (QUINTELAS et al., 2015; CLSI., 2018).

Um grande avanço no controle da infecção por *S. aureus* e MRSA tem sido a disponibilidade de testes rápidos de triagem molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR), onde se identifica a bactéria por amplificação de seu material genético e detecção de genes característicos, para identificação de portadores de *S. aureus*, com tempos de espera para diagnóstico reduzido para o mesmo dia, comparado com vários dias usando cultura de laboratório em ágar (COATES, COATES., 2009). Em contrapartida, o custo das técnicas moleculares maior que as metodologias clássicas, que por sua vez necessitam de pelo menos 48 horas para liberar os seus primeiros resultados (VAN HAL., 2007). Assim, o principal argumento para a utilização dos métodos de detecção rápida de MRSA é a redução dos casos de infecção e a conseqüente redução dos gastos com cuidados ao paciente, que superaria os investimentos com a metodologia (FRENCH., 2009; QUINTELAS et al., 2015).

4.5. Estratégias de controle da Disseminação do *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA)

Staphylococcus aureus resistente à Meticilina (MRSA) é o principal microrganismo responsável pelas infecções em ambiente hospitalar e nas unidades de saúde. Além disso, durante os anos mais recentes, o MRSA comunitário (MRSA-CO) também aumentou. Embora a dimensão exata da doença relacionada ao MRSA permaneça desconhecida, existe consenso entre a maioria dos infectologistas que as infecções por MRSA são um problema importante clínico e de saúde pública (PETINAKI E SPILIOPOULOU., 2012; WU et al., 2018; PAPADOPOULOS et al., 2019).

A emergência de isolados de MRSA é considerada preocupante, visto que o tratamento empírico de uma variedade de infecções comunitárias de pele e tecidos moles e até mesmo pneumonias é realizado com antimicrobianos beta-lactâmicos. Medidas de controle da Disseminação do *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) são necessárias para diminuir o número de infecções causadas por este patógeno. Tratando-se de segurança e qualidade há requisitos a serem preenchidos. É de fundamental importância respeitar corretamente todas as etapas de produção, desde a matéria prima até o produto final, além das condições higiênico-sanitárias que ocupa um lugar preponderante (QUINTELAS et al., 2015).

A escassez de tratamento efetivo contra esse patógeno é um fator limitante para diminuição do número de surtos associados a *S. aureus* MRSA. Assim, o desenvolvimento de novos métodos de controle é de fundamental importância para a diminuição da disseminação desses patógenos.

4.6. Canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) é uma planta nativa da Ásia, pertencente a família das lauráceas, sendo uma árvore de ciclo perene que pode atingir até 8 a 9 metros de altura (figura 6). Descoberta desde 2.500 anos a.C. pelos chineses possuía mais valor do que o ouro. Na Arábia, era considerada uma mercadoria preciosa; os egípcios utilizavam-na para embalsamar seus mortos, junto com outros condimentos. No século XVIII, por volta de 1776, o cultivo da canela começou a se espalhar pelo mundo. A canela era utilizada para aromatizar molhos e vinhos brancos, sendo também utilizada para perfumes. No Brasil é comumente encontrada e conhecida como canela-da-india e canela-do-ceilão (SCHIPER., 1999; NEGRAES., 2003; LIMA., 2005).



Figura 6. Canela (*Cinnamomum zeylanicum*). (A) Arvore da canela, (B), Canela em pó.

As partes de maior interesse comercial correspondem à parte interna da casca do tronco e dos ramos, possuindo vasto uso mundial na perfumaria e na culinária, devido suas propriedades aromáticas e condimentares além de ser também, popularmente, utilizada como estimulante, tônica, carminativa e antiespasmódica (LIMA., 2005). A canela é muito difundida na culinária oriental, nas indústrias de flavorizantes, de perfumaria e também nas indústrias de bebidas e alimentos principalmente pelas suas propriedades organolépticas (sabor e odor) conferidas pelos seus compostos químicos (LIMA., 2005).

A canela possui em sua composição ingredientes de fundamental importância para nosso organismo (Tabela 1). Seus constituintes químicos mais importantes são os óleos essenciais (cinamaldeído, eugenol e ácido cinâmico), mucilagem, diterpenos e proantocianidinas. Os óleos essenciais podem ser obtidos tanto das cascas como das folhas e raízes, mas a composição dos dois é completamente distinta (SCHIPER, 1999; BURT., 2004; LÓPEZ-MATA et al., 2017).

Estudos relatam a predominância de cinamaldeído entre 65 a 80% nas cascas, com 5 a 10% de eugenol. Em contrapartida, nas folhas a relação é inversa, predominando o eugenol, com presença entre 70 a 95% e 1 a 5% de cinamaldeído. Nas raízes existe um predomínio de canfora em torno de 60% (KOKETSU et al., 1997; RAO, GAN., 2014).

Carboidratos: 79,85 g	Vitamina K: 0,031mg	Zinco: 1,97 mg
Proteínas: 3,89 g	Sódio: 26 mg	Fósforo: 61 mg
Gordura total: 3,19 g	Ferro: 38,07 mg	Água: 9,52 g
Calorias: 261 kcal	Cobre: 0,23 mg	Açúcares: 0,5 g
Vitamina A: 0,001 mg	Magnésio: 56 mg	Fibra: 54,3 g
Vitamina B6: 0,31 mg	Selênio: 0,001 mg	Ácidos saturados: 0,65 g
Vitamina C: 0,028 mg	Potássio: 500 mg	Cálcio: 1.228 mg

Tabela 1. Micronutrientes presentes na canela em pó.

Fonte: United State Departamento of Agriculture- USDA (2010)

4.7. Cinamaldeído

Os óleos essenciais da canela têm sido amplamente utilizados nas indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentícias, especialmente por suas propriedades biológicas como ação antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antitumoral, gastroprotetora, hipoglicemiante, entre outras (CHANG et al., 2013; UDAYAPRAKASH et al., 2015).

Entre todos os componentes do óleo essencial da canela (OECZey), o seu potencial terapêutico é atribuído principalmente ao cinamaldeído, composto este que também é o principal responsável pelo odor da canela (LEE E BALICK., 2005).

O cinamaldeído (aldeído cinâmico ou 3-fenil-2-propenal) é um álcool terpeno cíclico, (figura 7), que possui como Características ser um líquido oleoso amarelado, viscoso, forma molecular C_9H_8O , peso molecular de 132,16 g/mol e com um ponto de fusão da ordem dos $-7^{\circ}C$ e um ponto de ebulição da ordem dos $246^{\circ}C$. Seu uso possui aprovação pela Food and Drug Administration (FDA) e com isso vem sendo bastante utilizado principalmente na indústria alimentícia e de cosméticos (AMARA E El-Masry., 2008; RAO E GAN., 2014).

Na indústria de alimentos, o cinamaldeído pode ser incorporado ao material de embalagem ou adicionado diretamente aos alimentos e usado como agente aromatizante. Entretanto sua aplicação visando à conservação de alimentos tem sido limitada por sua volatilidade, sabor característico e natureza lipofílica (AMARA E El-Masry., 2008; RAO E GAN., 2014; ZHU et al., 2017).

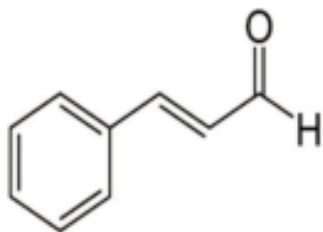


Figura 7. Estrutura química do Cinamaldeído

Fonte: MARTINS, 2010.

Estudos têm demonstrado que o cinamaldeído possui poderosa atividade antimicrobiana contra uma variedade de patógenos, incluindo fungos, bactérias Gram-positivas e Gram negativas. (RIEGER., 2014; CHEN et al., 2016).

Estudos realizados por Wen et al (2016) mostrou que a forte atividade antimicrobiana do filme nanofibroso de PVA / CEO / β -CD foi atribuído principalmente à existência de cinamaldeído. Gill e Holley (2005) concluíram em seus estudos que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cinamaldeído contra *Listeria Monocytogenes* é 40 mM . Estudos também relatam que o cinamaldeído é capaz de inibi o crescimento de *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157: H7 e *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Helander et al., 1998).

Os antimicrobianos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos que, em pequenas concentrações possuem atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas. Agentes antimicrobianos provenientes de fontes naturais, como EOs das plantas, são reconhecidos e utilizados na preservação de alimentos há muitos séculos e começa a crescer no mercado, especialmente em combinação com outras técnicas modernas de controle, como a análise de riscos e o controle de pontos críticos. (SOARES et al., 2009; FALCÓ et al., 2018).

Os OEs são classificados como compostos químicos lipofílicos e voláteis que contêm uma vasta série de metabólitos secundários que podem inibir ou retardar o crescimento de bactérias, leveduras e bolores, cujos componentes têm uma variedade de alvos de ação, particularmente sobre a membrana e o citoplasma microbiano, e em certas situações alteram completamente a morfologia. (SIROLI et al., 2015).

Os EOs podem estar presentes em todos os órgãos de plantas e podem ser extraídos das pétalas, folhas, cascas, raízes, sementes e resina, utilizando-se métodos

como destilação, prensagem e solvente, além disso, pelo fato de serem naturais e biodegradáveis geralmente apresentam baixa toxicidade aos mamíferos e por poderem atuar sobre várias moléculas-alvo ao mesmo tempo, quando comparados a fármacos sintéticos, tornam-se substâncias chaves para a pesquisa de novos medicamentos (PINHO et al., 2012). A pesquisa desses óleos essenciais junto com sua ação biológica e de técnicas que potencializem seus efeitos é de fundamental importância para o campo da saúde, para que haja a descoberta de substâncias menos tóxicas e mais eficazes contra a resistência microbiana e que sejam capazes de combater novos patógenos (FIGUEIREDO et al., 2008; PINHO et al., 2012).

4.8. Microencapsulação por Coacervação simples

A microencapsulação consiste em uma operação unitária que envolve o empacotamento de partículas sólidas ou pequenas gotas de substância como pigmentos, nutrientes, enzimas e outros; O composto encapsulado é chamado de núcleo ou recheio; e o material envoltório, que forma a capsula, é denominado encapsulante, cobertura ou parede (REBELLO, 2009; NEDOVIC et al., 2011; MENEZES et al., 2013). Essas cápsulas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho em três grupos de: macrocápsulas, que são maiores que 5000 μm ; microcápsulas, que possuem tamanho entre 0,2-5000 μm ; e nanocápsulas, que são menores que 0,2 μm (REBELLO., 2009).

A técnica de microencapsulação é considerada uma alternativa de proteção aos compostos que se degradam facilmente devido a condições adversas como altas temperaturas, presença de luz, oxigênio, entre outros (MÜLLER et al., 2011; CELLI et al., 2015). Tendo como principais vantagens a facilidade na manipulação e transporte; permissão de novas possibilidades para suprir necessidades e limitações da indústria de alimentos; redução da volatilidade e a reatividade das substâncias encapsuladas além do aumento a sua estabilidade a condições ambientais adversas como oxigênio, luz e pH extremos (CELLI et al., 2015).

O principal objetivo do processo de encapsulação é o aprisionamento de uma substância dentro de outro material (revestimento, escudo ou material de suporte/parede), formando pequenas partículas, seladas, que podem liberar seu conteúdo a taxas controladas em condições específicas (CELLI et al., 2015).

Para a formação das partículas é necessária a presença de um material de parede, podendo ser utilizadas diversas substâncias, como exemplo, as gomas (carragena, goma arábica, alginato de sódio), carboidratos (açúcar, amido, celuloses, dextrinas, xarope de milho), quitosana (fonte alternativa obtida da casca de crustáceos), lipídios (ácido esteárico, cera, óleos e gorduras hidrogenadas, monoglicerídeos e diglicerídeos, parafina, tristearina), proteínas (albumina, caseína, gelatina, glúten), dentre outras (SUAVE et al., 2006; MORENO et al., 2016).

Dentre esses se destaca a quitosana, um polissacarídeo linear, obtido pela desacetilação parcial da quitina, composta por (1 → 4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucana (N-acetil-D-glucosamina) e (1 → 4)-2-amino-2-desoxi-D-glucana β (D-glucosamina) unidades, um componente presente em cascas de camarão, de caranguejo e de insetos, insolúvel em água e o segundo polímero natural mais abundante depois de celulose (AIDER, 2010). Apresenta como vantagem a não toxicidade, ser biodegradável, e biocompatível, bem como de possuir ação antimicrobiana, inibindo o crescimento de uma grande variedade de bactérias (CORRALES, FERNÁNDEZ e HAN., 2014).

A quitosana possui a capacidade de se reticular física ou quimicamente devido os grupamentos amino que os tornam bastante versátil e reativo, uma vez que influenciam em suas propriedades físico-químicas. Além de muitas possibilidades de modificações, tais como, N-acetilação, N-alkilação, N-carboxilação, N-sulfonação e formação de bases de Schiff com aldeídos e cetonas (GONSALVES, et al., 2011).

Os métodos de microencapsulação são divididos em três grupos: Métodos físicos (Spray drying, spray cooling, pulverização em banho térmico, leite fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização); Métodos químicos (inclusão molecular e polimerização interfacial) e Métodos Físico-químicos (Coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico) (SANTOS et al., 2000).

A escolha da técnica de produção das microcápsulas, bem como a definição do material formador da parede depende da função que as microcápsulas irão desempenhar, do tamanho desejado, do meio de liberação e do material a ser encapsulado (SANTOS et al., 2000; YANG et al., 2016). A técnica de coacervação pode ser dividida em dois

grupos principais: coacervação simples e complexa. No sistema simples emprega-se apenas uma substância como agente encapsulante enquanto na coacervação complexa, dois polímeros de cargas opostas formam um complexo solúvel e as microcápsulas são formadas pela interação interiônica entre os polímeros (YANG et al., 2016).

A coacervação é usada tipicamente para encapsular óleos, óleos essenciais e flavorizantes e consiste na separação das fases de um ou de muitos hidrocolóides da solução inicial e da deposição subsequente da fase recentemente formada em torno do ingrediente ativo suspenso ou emulsionado no meio da reação. Após este processo podem ser adicionados agentes reticulantes, formando o que é chamado de hidrogel (SANTOS et al., 2000; CASTRO-ROSAS et al., 2017).

Normalmente a coacervação ocorre quando toda solução de eletrólito é inicialmente adicionada e então a temperatura é gradualmente elevada atingindo então o ponto de turvamento (“cloud point”), ou mantendo-se a temperatura fixa e adicionando gradualmente a solução de eletrólito. De forma geral processo de coacervação simples consiste basicamente em solubilizar o material de parede em meio ácido e adicionar ânion ou sulfato, resultando na formação de complexo pouco solúvel e, conseqüentemente, na precipitação de partículas (BERTHOLD et al., 1996).

A figura 8 apresenta um esquema dos estágios de como ocorre o processo de coacervação simples.

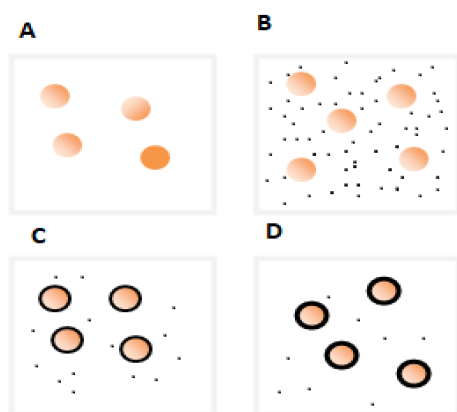


Figura 8. Estágios da coacervação simples: (A) dispersão da fase hidrofóbica na solução polimérica, (B) separação de fases do polímero, (C) formação da parede das microcápsulas e (D) enrijecimento da parede através de reticulação.

Fonte: Autor

A figura 8(A) representa o estágio inicial do processo de coacervação simples, onde existe apenas a dispersão da fase hidrofóbica na solução polimérica. O estágio (B) apresenta a separação de fase do polímero na solução aquosa, onde para determinada concentração de eletrólito, foi atingida a temperatura de separação de fases. A figura 8 (C) mostra a formação da parede ao redor das gotas pela deposição dos agregados poliméricos na superfície do material hidrofóbico e o estágio (D) representa o enrijecimento da parede polimérica com compostos capazes de formar ligações cruzadas com o polímero (BERTHOLD et al., 1996).

A eficiência deste processo está associada principalmente às características dos polímeros envolvidos, do complexo formado e do núcleo a ser encapsulado (Schmitt et al., 1998). A polaridade do núcleo, a tensão superficial do sistema, a viscoelasticidade do complexo e a capacidade de adsorção dos polímeros ao núcleo disperso, são propriedades de grande importância para a correta formação da parede e, conseqüentemente, interferem na eficiência de retenção do material. No entanto, os compostos líquidos ou particulados de caráter hidrofóbico ou partículas sólidas de baixa solubilidade em água, são facilmente encapsulados por esse processo (Kruif et al., 2004).

Os OEs, como o óleo essencial da canela (*trans*-cinamaldeído), são considerados excelentes agentes antimicrobianos e antioxidantes, sendo alternativo na alimentação humana e animal. No entanto, seu uso direto tem várias desvantagens, como volatilização e oxidação. O desenvolvimento de micropartículas de OEs pode ajudar a evitar esses problemas (Benavides, Cortés e Franco, 2016).

A literatura vem demonstrando efetividade da microencapsulação de *trans*-cinamaldeído encapsulado em matrizes poliméricas e a manutenção da atividade antibacteriana. Em estudos visando à caracterização de microencapsulados de beta-ciclodextrina contendo óleos essenciais, incluindo o *trans*-cinamaldeído, Hill, Gomes e Taylor (2013) utilizando como técnica encapsulante a liofilização, verificaram que o *trans*-cinamaldeído inibiu efetivamente o crescimento bacteriano dentro da faixa de concentração testada. Chun e colaboradores (2015) verificaram atividade antibacteriana satisfatória do *trans*-Cinamaldeído encapsulado pelo método de encapsulamento molecular em matriz de β -Ciclodextrina contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. Chimvaree e colaboradores (2020) em estudos visando a encapsulação do

trans-cinamaldeído extraído de óleos essenciais de canela, e através do método de encapsulamento molecular em Ciclodextrina concluíram que o *trans*-cinamaldeído microencapsulado pode inibir bactérias gram-negativas e gram-positivas. Ainda, Barrera-Martínez e colaboradores (2020) em seu estudo sobre micropartículas de quitosana como sistema de aprisionamento para *trans*-cinamaldeído utilizando o método de geleificação iônica, obtiveram efeitos citotóxicos em níveis aceitáveis.

Entre os trabalhos científicos envolvendo a microencapsulação de *trans*-cinamaldeído e influência do sistema na propriedade antibacteriana, são escassos dados sobre o uso da técnica de coacervação simples. No entanto, dentre os métodos de encapsulação, a microencapsulação por coacervação simples vem ganhando destaque, pois apresenta características simples e reprodutíveis, sendo um método rápido de se obter micropartículas na ausência de condições drásticas, minimizando assim as perdas de atividade biológica do composto a ser encapsulado (Chun et al., 2015).

Adicionalmente, entre as matrizes poliméricas visando a microencapsulação de *trans*-cinamaldeído o uso de quitosana vem atraindo muita atenção devido às suas propriedades antimicrobianas e alta capacidade de formar partículas, no entanto, com base na literatura existente, ainda não está publicado o uso desta matriz polimérica visando a microencapsulação do *trans*-cinamaldeído pela técnica de coacervação simples. Sarjono e colaboradores (2018) ao utilizarem a liofilização como método encapsulante em seus estudos visando a microencapsulação de *trans*-cinamaldeído usando quitosana para avaliar a estabilidade, mucoadesiva e liberação de *trans*-cinamaldeído, obtiveram resultados satisfatórios quanto à formação das micropartículas e também os seus objetivos de estudo. Com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante do *trans*-cinamaldeído microencapsulado em quitosana por liofilização Ariestiani e colaboradores (2018) também obtiveram resultados satisfatórios quanto à formação das micropartículas e atividade antioxidante. Subhaswaraj e colaboradores (2018) utilizando o método de encapsulação por gelificação iônica para avaliar a eficácia de biofilmes de nanopartículas de quitosana encapsulando *trans*-cinamaldeído contra *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 observaram bons resultados quanto eficiência de encapsulação, morfologia, e atenuação da virulência para bactérias em estudo.

Assim sendo, a técnica de coacervação simples, juntamente com a utilização da quitosana como material de parede foi o foco deste estudo com objetivo de se avaliara

influência da encapsulação no efeito antibacteriano do *trans*-cinamaldeído para o controle da disseminação de cepas sensíveis e resistentes a metilicina.

Diante do exposto e ciente de que a disseminação de bactérias multirresistentes, entre as quais *S. aureus*, é um problema mundial e de saúde pública, o desenvolvimento de novas alternativas que visem o controle dessas cepas é de suma importância para a indústria alimentícia, não apenas pelo fato de inibir o crescimento desses patógenos, mas também de favorecer um produto de qualidade para garantir a segurança alimentar.

5. REFERÊNCIAS

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 837-842, 2010.

AMARA, A. A.; EL-MASRY, M. H.; BOGDADY, H. H. Plant crude extracts could be the solution: Extracts showing in vivo antitumorigenic activity. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, 21:159-171, 2008.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1751–1773, 2010.

ARIESTIANI, B.; PURBOWATINGRUM .; NGADIWIYANA.; ISMIYARTO.; FACHRIYAH, E.; KHIKMAH, N. Antioxidant activity from encapsulated Cinnamaldehyde-Chitosan. **Journal of Physics: Conference Series**. 1025, 2018.

BARRERA-MARTÍNEZ, C.L.; PADILLA-VACA, F.; LIAKOS, I .; MELÉNDEZ-ORTIZ, H.; CORTEZ-MAZATAN, G.Y.; PERALTA-RODRÍGUEZ, R.D. Chitosan microparticles as entrapment system for trans- cinnamaldehyde: Synthesis, drug loading, and in vitro cytotoxicity evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária, **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, SISNAN, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico. Ministério da Saúde.** Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2019.

BENAVIDES, S.; CORTÉS, P.; PARADA, J.; FRANCO, W. Development of alginate microspheres containing essential thyme oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, pp. 77, 2016.

BENKERROUM, N. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview. **Critical reviews in Food science and nutrition**, v. 58, n. 12, p. 1943-1970, 2018.

BERTHOLD, A.; CREMER, K.; KREUTER, J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 39, n. 1, p. 17-25, 1996.

BOTELHO, T. O., GUEVARA, T., MARRERO, A., ARÊDE, P., FLUXÀ, V. S., REYMOND, J.-L., GOMIS-RÜTH, F. X. Structural and functional analyses reveal that *Staphylococcus aureus* antibiotic resistance factor HmrA is a zinc-dependent endopeptidase. **Journal of Biological Chemistry**. 2011.

BOUNDY, S., SAFO, M. K., Safo, M. K., Wang, L., Musayev, F.N., O'Farrell, H.C., Rife J.P., Archer, G.L. Characterization of the *Staphylococcus aureus* rRNA methyltransferase encoded by orfX, the gene containing the staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) insertion site. **Journal of Biological Chemistry**. 2013.

BOSWIHI, S. S., UDO, E. E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. **Current Medicine Research and Practice**, p.18–24, 2018.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food a review. **International Journal of Food Microbiology**, p. 223–253, 2004.

CAMPBELL, M. L.; MARCHAIM, D. Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections with a Minimal Inhibitory Concentration of 2

mug/mL to Vancomycin: Old (Trimethoprim/Sulfamethoxazole) versus New (Daptomycin or Linezolid) Agents). **Ann Pharmacother**. 2012.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v .9, n. 1, p. 70-6, 2005.

CASTRO-ROSAS, J.; FERREIRA-GROSSO, C.R.; GÓMEZ-ALDAPA, C.A.; RANGEL-VARGAS, E.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M.L.; GUZMÁN-ORTIZ, F.A.; FALFAN-CORTES, R.N. Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review. **Food Research International**, v. 102, p. 575–587, 1 dez. 2017.

CELLI, G. B.; GHANEM, A; BROOKS, M. S. Bioactive Encapsulated Powders for Functional Foods — a Review of Methods and Current Limitations. **Food and bioprocess technology**, v. 8, n. 9, p. 1825-1837, 2015.

Centers for Disease Control and Prevention, - CDC - **Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks - United States, 1998-2002**. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 2006.

CHANG, C. T.; CHANG, W.L.; HUS, J.C.; SHIH, E CHOU, S.T. Chemical composition and tyrosinase inhibitory activity of *Cinnamomum cassia* essential oil. **Botanical Studies**, v. 54, n. 10, 2013.

CHEN, H.; HU, X.; CHEN, E.; WU, S.; MCCLEMENTS, D.J.; LIU, S.; LI, B.; LI, Y. Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. **Food Hydrocoll**. 61, 662–671, 2016.

CHIMVAREE, C.; TEPSORN, R.; SUPAPVANICH, S.; WONGS-AREE, C.; SRILAONG, V.; BOONYARITTHONGCHAI, P. Encapsulation of Cinnamaldehyde from Cinnamon Essential Oils in Cyclodextrin. **Earth and Environmental Science**, V515, 2020.

CHUN, J-Y.; JO, Y.J.; BJRAPHA, P.; MIN, S.G.; Antimicrobial Effect of α - or β -Cyclodextrin Complexes with Trans -Cinnamaldehyde Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Drying Technology**. Vol. 33, p377-383, 2015.

CORRALES, M.; FERNÁNDEZ, A.; HAN, J. H. Chapter 7 - Antimicrobial Packaging Systems. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging**, v. 2, p. 133-170, 2014.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. CSLI supplement M100 (ISBN 1-56238- 838-X [Print]; ISBN 1-56238-839-8 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950, West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, 28th ed. USA, 2018.

COATES, T.; BAX, R. ; COATES, A .Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: strengths, weaknesses and future prospects .**Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2009.

COSTA, J. M. G.; BORGES, S. V.; HIJO, A. A. C. T.; SILVA, E. K.; MARQUES, G. R.; CIRILLO, M. A.; AZEVEDO, V. M. Matrix structure selection in the microencapsulation of essential oil oregano produced bay spray dryer. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 8, p. 717-727, 2013.

CRAGO, B.; FERRATO, C.; DREWS, S. J.; SVENSON, L. W.; TYRRELL, G.; LOUIE, M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. **Food Microbiology**, Station Main, Edmonton, Alberta, Canada, n. 32, p. 202-205, dez. 2018.

DAVID, M. Z.; DAUM, R.S. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina associado à comunidade : epidemiologia e consequências clínicas de uma epidemia emergente. **Clin Microbiol. Rev** , 23, pp. 616 – 687, 2010.

DAVID, M.Z.; BOYLE-VAVRA, S.; ZYCHOWSKI, D.L.; DAUM, R.S. Methicillinsusceptible *Staphylococcus aureus* as a predominantly healthcare-associated pathogen: a possible reversal of roles? **PLoS One**. 2011.

DEURENBERG , R.H., VINK,C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A.W.; BRUGGEMAN, C.A., STOBBERINGH, E.E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, **Clin. Microbiol. Infect.** 13,222–235, 2007.

DE KRAKER, M. E. A.; DAVEY, P. G.; GRUNDMANN, H. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteraemia: Estimating the burden of antimicrobial resistance in Europe. **PLoS Med**. 2011.

- DYKE, K.G.; JEVONS, M.P.; PARKER, M.T. Penicillinase production and intrinsic resistance to penicillins in *Staphylococcus aureus*. **Lancet**. 1966.
- DŽIDIC, S.; ŠUŠKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technol Biotechnol**;46:11-21,2008.
- FALCÓ, M. VERDEGUER, R. AZNAR, G. SÁNCHEZ, W. RANDAZZO. Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2018.
- FETSCH, A.; JOHLER, S. *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 5, p. 88-96, 2018.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 243-246, 2013.
- FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.23, n.4, p. 213-26, 2008.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual, eighth ed. **Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA**. 1998.
- FOOD SAFETY BRAZIL, **Surtos Alimentares no Brasil – Dados Atualizados em Janeiro de 2016**.
- FUDA, C.; SUVOROV, M.; VAKULENKO, S.B.; MOBASHERY, S. The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**. 2004.
- GIEDRAITIENĖ, A.; VITKAUSKIENĖ, A.; NAGINIENĖ, R.; PAVILONIS, A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina (Kaunas)**;47(3):137-46. 2011.
- 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 and Environmental Microbiology**, p. 5750–5755, 2004.

GORWITZ, R.J. Understanding the success of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing epidemic disease in the community. **The Journal of Infectious Diseases**, Atlanta, v. 197 n.2 p.179-182, 2008.

GRACE, D.; FETSCH, A. *Staphylococcus aureus* - um patógeno transmitido por alimentos: Epidemiologia, detecção, caracterização, prevenção e controle: uma visão geral. **Academic Press**, pp. 3 – 10. 2018.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para reticulação da quitosana. **Química Nova**, v. 34, p.1215-1223, 2011.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interaction with food components. **Dublin Institute of Technology**, 2009.

HAWKEY P. Molecular epidemiology of clinical significant antibiotic resistance genes. **British Journal of Pharmacology**, 153:406- 13, 2008.

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

HILL, L.E.; GOMES, C.; TAYLOR, T.M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **Food science e technology**, Vol.51 (1), p.86-93, 2013.

HO, P. L.; CHIU, S. S.; CHAN, M. Y.; Gan, Y.; Chow, K.H.; Lai, E.L; Lau, Y.L. Molecular epidemiology and nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* among young children attending day care centers and kindergartens in Hong Kong. **Journal of Infection**. 64, 500–506, 2018.

HOLKEM, A.T.; CODEVILLA, C.; MENEZES, C. Emulsificação/gelificação iônica interna: alternativa para microencapsulação de compostos bioativos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 116-124, 2015.

- HUIJBERS, P. M. C.; HETTY BLAAK, H.; DE JONG, M.; GRAAT, E.; CHRISTINA, M.J.E.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E.; HUSMAN HUSMAN, A.N.R. Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. **Environmental Science & Technology**, The Netherlands, n. 49, /set. 2015
- JEVONS, M. P. “Celbenin” - resistant *Staphylococci*. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5219, p. 124–125, 1961.
- JORGENSEN, M.; LOVSETH, A., OMOE, K.; QVALE, K. S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 267-272, 2015.
- KIM, N.H.; YUN, A.R.; RHEE, M.S. Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. **Journal of Applied Microbiology**. v.111, n.6, p.1456-1464, 2011.
- KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R. L. O. The bark and leaf essential oils of cinnamom (*Cinnamomum verum* Presl) grown at Paraná, Brazil. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p.281-285, set./dez. 1997.
- KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; VRIES R. Complex Coacervation of Proteins and Anionic Polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, p. 340–349, 2004.
- LAURENT, F.; CHARDON, H.; HAENNI, M.; BES, M.; REVERDY, M.-E.; MADEC, J.-Y.; TRISTAN, A. MRSA harboring mecA variant gene mecC, France. **Emerging Infectious Diseases**; 18:1465– 7. 2012.
- LEE, R.; BALICK, M. J. Sweet wood-cinnamon and its importance as a spice and medicine. **The Journal of Science and Healing**. p.61-64, 2005.
- LEIMANN, F.V. **Microencapsulação de óleo essencial de capim limão utilizando o processo de coacervação simples**. Dissertação de Mestrado, curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- LIM, T.T.; COOMBS, G.W.; GRUBB, W.B. Genetic organization of mecA and mecAregulatory genes in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from

Australia and England. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.50, p.819–24. 2002.

LIMA, M.P.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M.D.; FERNANDES, C. S., Volatile constituents from leaves and branches of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta Amazônica**, v.35 no. 3, 2005.

LÓPEZ-MATA, M.A.; RUIZ-CRUZ, S.; DE JESÚS ORNELAS-PAZ, J.; DEL TORO-SÁNCHEZ, C.L.; MÁRQUEZ-RÍOS, E.; SILVA-BELTRÁN, N.P.; CIRACHÁVEZ, L.A.; BURRUEL-IBARRA, S.E. Mechanical, barrier and antioxidant properties of chitosan films incorporating cinnamaldehyde. **Journal of Polymers and the Environment**. p.1–10, 2017.

LOVERING, A. L.; GRETES, M. C.; SAFADI, S. S.; DANIEL, F., DE CASTRO, L.; PAGE, M. G. P., STRYNADKA, N. C. J. Structural Insights into the Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Activity of Ceftobiprole. **Journal of biological Chemistry**, U.S.A, n. 287, p. 1-7, /set. 2012.

MACHADO, T.F.; BORGES, M.F.; BRUNO, L.M. Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. **Embrapa Agroindustrial Tropical** – Fortaleza, 2011.

MARTINS, A. P. C. **Preparação e caracterização de filmes biodegradáveis para aplicação em embalagens de alimentos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química). Departamento de Química, UFSC, 2010. 32p..

MARSTON, H. D. Antimicrobial Resistance. **Clinical Review & Education**, Bethesda, v. 316, n. 11, p. 1-12, set. 2016.

MEDIAVILLA, J.R.; CHEN, L.; MATHEMA, B.; KREISWIRTH, B.N. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CAMRSA), **Current Opinion Microbiology** 15 588–595, 2012.

MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; CHICOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/cr/2013nahead/a18613cr2012-0763.pdf> . Acessado em 05 de agosto de 2014.

MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D.C.; DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: ‘SCCmec IV multiplex’. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.60, p.42–8. 2007.

MOELLERING, R. C. MRSA: the first half century. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 67(1), 4–11. 2012.

MOHAMED, M.A.; ZEINHOM, G.; JORDAN, K. The use of multiplex PCR to determine the prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*, isolated from raw milk, fet cheese and hand Swabs. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, 2015.

MORENO, T.; DE PAZ, E.; NAVARRO, I.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; MATÍAS, A.; DUARTE, C.; SANZ-BUENHOMBRE, M.; COCERO, M. J. Spray Drying Formulation of Polyphenols-Rich Grape Marc Extract: Evaluation of Operating Conditions and Different Natural Carriers. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 12, p. 2046–2058, 2016.

MORIKAWA, K.; TAKEMURA, A.J.; INOSE, Y.; TSAI, M.; NGUYEN, T.H.I. ; LE, T.; OHTA,T.; MSADEK,T. Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*. **PLoS Pathogens**, 8:e1003003, 2012.

MÜLLER, J.M.; SANTOS, R.L.; BRIGIDO, R.V. Produção de Alginato por Microrganismos. **Polímeros**, v. 21, n.4, p. 305-310, 2011.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A.; Unit, A. R.; Santiago, A. De. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectroscopy**. v.4, p.,-1-37.2016.

MUSTAFA, M.M.S.; JAIN, L.C.S.; AGRAWAL, C.V.K. Food Poisoning Outbreak in a Military Establishment. **MJAFI [online]**, v. 65, n. 3, p. 240-243, 2009.

NEGRAES, P. **Guia A-Z de plantas: condimentos**. São Paulo: Bei Comunicação, 2003.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B.An Overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v.1, p. 1806 – 1815, 2011.

NOVICK, R. P. Pathogenicity factors and their regulation. (eds.). Washington DC: **ASM Press**,. p. 392-407, 2000.

OTTO, MICHAEL. Staphylococcus aureus toxins. **Curr Opin Microbiol.** Feb;17:32-7, 2014.

PAPADOPOULOS, P.; ANGELIDIS, A. S.; PAPADOPOULOS, T.; KOTZAMANIDIS, C.; ZDRAGAS, A.; PAPA, A.; SERGELIDIS, D. *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in bulk tank milk, livestock and dairy-farm personnel in northcentral and north-eastern Greece: Prevalence, characterization and genetic relatedness. **Food Microbiology.** 2019.

PETINAKI, E.; SPILIOPOULOU, I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts. **Clinical Microbiology and Infection.** 18:626–34, 2012.

PINHO, L.; SOUZA, P.N.S.; SOBRINHO, E.M.; ALMEIDA, A.C. E MARTINS, E.R. Actividade antimicrobiana de extractos hidroalcoólicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, 42 (2): 326 – 33,. 2012.

RAO,P.V; GAN,S. H. Cinnamon: A Multifaceted medicinal plant. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v.2014, abr.2014.

RAJKOVIC, A. *Staphylococcus*: Food Poisoning: subtítulo do artigo. **Encyclopedia of Food and Health.** Ghent University, Ghent, Belgium Belgrade University, ZemunBelgrade, Serbia, p. 133-139, 2016.

REBELLO, F. F. P. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Revista Agrogeoambiental**, p. 134-144, 2009.

RIEGER, K.A.; SCHIFFMAN, J.D. Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly (ethylene oxide) nanofibers. **Carbohydr. Polym.** 113, 561– 568, 2014.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, M.; MEJÍA, C.; ALVAREZ, C.; BAVESTRELLO, L.; GOTUZZO, E. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases.** 2015.

- ROLO, J.; WORNING, P.; BOYE NIELSEN, J.; SOBRAL, R.; BOWDEN, R., BOUCHAMI, O. Evidence for the evolutionary steps leading to mecA mediated β -lactam resistance in staphylococci. **PLoS Genetics**, 2017.
- SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v.3 (16) p.26-30, 2000.
- SARJONO, P.R.; NGADIWIYANA, N.; FACHRIYAH, E.; ISMIYARTO, I.; PRASETYA, N.B.A.; KHIKMAH, K. Encapsulation of Cinnamaldehyde using Chitosan: Stability, Mucoadhesive and Cinnamaldehyde Release. **Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi**, p. 175-181, 2018.
- SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and Technofunctional Properties of Protein-polysaccharide complexes: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 689 – 753, 1998.
- SCHIPER, L.P. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil, 1999.
- SHORE, A. C.; DEASY, E. C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O'CONNELL, B.; MONECKE, S.; COLEMAN, D. C. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type XI Carrying Highly Divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 8, p. 3765–73. 2011.
- SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; GARDINI, F.; LANCIOTTI, R. Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. **Food Chemistry**., 182 pp. 185-192, 2015.
- SOARES, M. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; FIGUEIREDO, A. D. L.; PIMENTA, F.C., FIUZA, T.S.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F. E PAULA, J. R. Análise da atividade antimicrobiana das folhas de Davilla elliptica St.-Hil. (Dilleniaceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, 30 (2): 55 – 58, 2009.

- SOUZA, T. C. R.; PARIZE, A. L.; BRIGHENTE, I. M.M.; FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M. Chitosan microspheres containing the natural urucum pigment. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 5, p.511–520, 2005.
- STAPLETON, P.D.; TAYLOR, P.W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Science Progress**. v.85, p.57-72. 2007.
- SUAVE, J.. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.
- SUAVE, J.; DALL'GNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.
- SUBHASWARAJ, P.; BARIK, S.; MACHA. C.; CHIRANJEEVI, P.V.; SIDDHARDHA, B. Anti quorum sensing and anti biofilm efficacy of cinnamaldehyde encapsulated chitosan nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 752-759, 2018.
- TAREKGNE, E. K.; SKJERDAL, T.; SKEIE, S.; RUDI, K.; PORCELLATO, D.; FÉLIX, B. Enterotoxin gene profile and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine bulk milk and milk products of Tigray region, northern Ethiopia. **Journal of Food Protection**, v. 79, p. 1387–1395, 2016.
- TEIXEIRA, L. M.; SANTOS, K. R. N.; BUERIS, V.; TRABULSI, L. R. *Staphylococcus aureus*. In: trabulsi, l. R.; alterthum, f. **Microbiologia**. 5.ed. Ed.Atheneu, 2008. Cap. 20, p.175-182.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Bactérias. In: **Microbiologia**. 8. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.
- QUINTELAS, C.; MESQUITA, D. P.; LOPES, J. A.; FERREIRA, E. C.; E SOUSA, C. Near-infrared spectroscopy for the detection and quantification of bacterial contaminations in pharmaceutical products. **International Journal of Pharmaceutics**, 492(1-2), 199–206. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.07.005, 2015.
- UDAYAPRAKASH, N. K.; RANJITHKUMAR, M.; DEEPA,S.; SRIPRIYA ,N.; AL-ARFAJ,, A.A.; BHUVANESWARI, S. Antioxidant, free radical scavenging and GC–

MS composition of *Cinnamomum iners* Reinw. ex Blume. **Industrial Crops and Products**, n. 69, p. 175–179, 2015.

UDO, E. E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the new face of an old foe? **Medical Principles and Practice**. 22:20–29. 16, 2013.

USDA- UNITED STATE DEPARTAMENTO OF AGRICULTURE. **Agricultural Research Service. Nutrient Database for Standard Reference**. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/services/docs.htm?docid=8964>. Acesso em: 20 Fev. 2019.

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 5, p. 923-932, 2005.

VASISHT. N. Selection of Materials for microencapsulation. In: GAONKAR, A. *Microencapsulation in the food industry*. **Academic Press**, 2014.

ZELL, C.; RESCH, M.; ROSENSTEIN, R.; ALBRECHT, T.; HERTEL, C.; GÖTZ, F. Characterization of toxin production of coagulase-negative *staphylococci* isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127 p. 246-251, 2008.

WEN, P.; ZHU, D.-H.; WU, H.; ZONG, M.-H.; JING, Y.-R.; HAN, S.-Y. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. **Food Control**. 59, 366– 376, 2016.

WHO. World Health Organization. **The role of food safety in health and development. Expert Committee on Food Safety**. Report of Joint FAO/WHO. Genebra. 1984. 79 p.. Acesso em: 06 out. 2019.

WHO. World Health Organization. **The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action**. Report of Joint FAO/WHO. p. 1–119, 2012. Acesso em: 06 out. 2019.

World Health Organization. **Advancing food safety initiatives: strategic plan for food safety including foodborne zoonoses 2013-2022**. World Health Organization, Report of Joint FAO/WHO. Genebra 2013.

WU, S., HUANG, J.; WU, Q.; ZHANG, F.; ZHANG, J.; LEI, T. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from retail vegetables in China. *Frente. Microbiology*. 9: 1263.. doi: 10.3389 / fmicb.2018.01263, 2018.

XIAO, Z.; LIU,W.; ZHU,G.; ZHOU, R.; NIU, Y. Review of the preparation and application off flavor and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, 0. 1482-1494, 2014.

YANG, J. The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules. **Food Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 524–532, 2016.

ZHU, R.; LIU, H.; LIU, C.; WANG, L .; MA,L .; CHEN, **B** Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. **Pharmacological Research** , 122, pp. 78 – 89, 2017.

ARTIGO

EFEITO DA ENCAPSULAÇÃO COM QUITOSANA NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE TRANS-CINAMALDEÍDO CONTRA *S. aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA)

Costa JO.¹, Nogueira MC20BL³, Silva, MRO², Machado ECL³

RESUMO

A ocorrência e disseminação de resistência bacteriana (RAM) vêm sendo colocados como um problema de saúde pública, e uma das principais formas de disseminação dessas bactérias resistentes consistem na falta de práticas higiênico-sanitárias do ambiente de processamento de armazenamento de alimentos. O objetivo do presente trabalho foi produzir micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído com bioatividade na inibição de *Staphylococcus aureus* MRSA. As micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído foram preparadas por meio da técnica de coacervação simples, utilizando como material de parede a quitosana 5% (p/v) e a vanilina como material reticulante. A caracterização foi realizada em termos de eficiência de encapsulação, diâmetro médio das micropartículas, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia através de MEV e microscopia ótica. A análise antibacteriana das partículas contra *Staphylococcus aureus* MRSA foi realizada por meio de técnica de microdiluição em caldo, determinando-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM). As micropartículas apresentaram diâmetro médio de $1,92 \pm 0,005$ μ m, PDI de $0,39 \pm 0,2$, uma carga de superfície de $20,61 \pm 0,8$ mV, eficiência de encapsulação de 93,81% e um formato esférico e enrugado. Os ensaios da atividade antibacteriana mostraram que as micropartículas de quitosana contendo o *trans*-cinamaldeído apresentaram atividade antibacteriana para cepas de *S.aureus* ATCC (6538) como também para cepas *S. aureus* MRSA, obtendo-se valores de CIM menores do que os obtidos para os tratamentos com o óleo livre e com as micropartículas vazias. Assim, micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído podem ser uma alternativa promissora para o controle da multiplicação e disseminação de *S. aureus* sensíveis e resistentes a Meticilina (MSSA e MRSA).

Palavras-chave: Patógenos; segurança alimentar; antimicrobianos naturais; resistência bacteriana

ABSTRACT

The occurrence and spread of bacterial resistance (RAM) has been identified as a public health problem, and one of the main ways of spreading these resistant bacteria is the lack of hygienic-sanitary practices in the food storage processing environment. The aim of the present work was to produce chitosan microparticles containing *trans*-cinnamaldehyde with bioactivity in the inhibition of *Staphylococcus aureus* MRSA. Chitosan microparticles containing *trans*-cinnamaldehyde were prepared using the simple coacervation technique, using 5% (w / v) chitosan as the wall material and vanillin as the crosslinking material. The characterization was performed in terms of encapsulation efficiency, average microparticle diameter, polydispersity index, zeta potential, morphology through MEV and optical microscopy. The antibacterial analysis of the particles against *Staphylococcus aureus* MRSA was performed using a broth microdilution technique, determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The microparticles had an average diameter of 1.92 ± 0.005 μ m, a PDI of 0.39 ± 0.2 , a surface load of 20.61 ± 0.8 mV, an encapsulation efficiency of 93.81% and a shape spherical and wrinkled. The antibacterial activity tests showed that the chitosan microparticles containing the *trans*-cinnamaldehyde showed antibacterial activity for strains of *S.aureus* ATCC (6538) as well as for strains *S. aureus* MRSA, obtaining lower MIC values than those obtained for treatments with free oil and empty microparticles. Thus, chitosan microparticles containing *trans*-cinnamaldehyde may be a promising alternative for controlling the multiplication and dissemination of methicillin-sensitive and resistant *S. aureus* (MSSA and MRSA).

Keywords: Pathogens; food security; natural antimicrobials; bacterial resistance

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos ocorrem em decorrência da ingestão de alimentos contaminados com microrganismos infecciosos ou toxinas produzidas por determinados microrganismos (TAREKGNE et al., 2016). Diversos patógenos são responsáveis por causarem doenças quando veiculados a alimentos e água, entre os quais as bactérias constituem um grande grupo, com destaque para *Staphylococcus aureus* (FRIEDMAN, 2015).

É relevante destacar que os problemas com *S. aureus* podem estar associados à infecção, principalmente quando envolve bactéria com característica de resistência, como por exemplo, os *S. aureus* resistentes à meticilina, conhecidos como MRSA (BENKERROUM, 2018). Além disso, outra característica relacionada à *S. aureus* está na sua capacidade de produzir toxinas a partir de 10^6 células por grama ou volume do alimento, e diante da toxina preformada, causando problemas de saúde (FORSYTHE, 2013; FETSCH & JOHLER, 2018). A Intoxicação alimentar por *Staphyococcus aureus* é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns, e seus sintomas podem ser bastante agudos, dependendo da suscetibilidade individual à toxina, da quantidade de alimento contaminado ingerido, da quantidade de toxina no alimento ingerido e da saúde geral do indivíduo (FORSYTHE, 2013; FETSCH & JOHLER, 2018).

A resistência bacteriana aos antibióticos é uma grande preocupação, principalmente para a saúde pública. Sua disseminação envolve diversos setores, e está relacionada tanto ao uso adequado como ao inadequado de medicamentos anti-infecciosos. Além disso, também está relacionada na produção de alimentos, especificamente na falta de práticas higiênico-sanitárias adequadas no ambiente de processamento e armazenamento de alimentos e, ainda, com medidas inapropriadas para controlar a disseminação de infecções (WHO., 2012; MUNITA e ARIAS., 2016).

Com a disseminação cada vez maior da resistência bacteriana aos produtos químicos e fármacos convencionais existentes, vem ocorrendo uma crescente busca de novas alternativas nas técnicas de conservação dos alimentos, a fim de garantir um alimento seguro e, ao mesmo tempo, atender a demanda de conservar atributos nutricionais e de qualidade (MACHADO et al., 2011).

Os óleos essenciais, compostos químicos lipofílicos e voláteis, contêm uma vasta série de metabólitos secundários que podem inibir ou retardar o crescimento de bactérias, leveduras e bolores contêm uma vasta série de metabólitos secundários que podem inibir ou retardar o crescimento de bactérias, leveduras e bolores, tornando-se uma alternativa para oferecer produtos saudáveis e seguros quando incluídos na formulação (SIROLI et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que o *Trans*-cinamaldeído possui poderosa atividade antimicrobiana contra uma variedade de patógenos, incluindo fungos, bactérias Grampositivas e Gram negativas. (RIEGER, 2014; CHEN et al., 2016; WANI et al., 2020). Entretanto a sua aplicação na conservação de alimentos é limitada pelo seu sabor particular, volatilidade e natureza lipofílica (AMARA et al., 2008; RIEGER e SCHIFFMAN, 2014; LÓPEZ-MATA et al., 2017).

Ainda visando à aplicabilidade desses componentes em matrizes alimentares, sistema de modelo alimentar vem sendo propostos para elucidar a influência de componentes alimentares na ação antimicrobiana de compostos naturais (GUTIERREZ; BARRYRYAN e BOURKE., 2009; XIAO et al., 2014). Neste contexto, a microencapsulação vem ganhando espaço no cenário científico mundial, pois proporciona a estabilidade do material encapsulado, já que os compostos voláteis são facilmente degradáveis (ZIGONEUANU et al 2008; XIAO et al., 2014).

A técnica de microencapsulação por coacervação simples vem sendo tipicamente usada para encapsular óleos essenciais, pois compostos líquidos ou particulados de caráter hidrofóbico ou partículas sólidas de baixa solubilidade em água, são facilmente encapsulados por esse processo (Kruif et al., 2004). Entre as matrizes poliméricas utilizadas para a microencapsulação de óleos essenciais, a quitosana apresenta varias vantagens, como maior eficiência, simplicidade operacional, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, eficácia de custo, maior capacidade de absorção (ILK et al., 2017). Além disso, estudos mostraram que a adição de quitosana sozinha ou combinada com óleo essencial não influencia negativamente o sabor dos alimentos (KONG, et al., 2010).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a propriedade antibacteriana *in vitro* de micropartículas de quitosana com *trans*-cinamaldeído por coacervação simples na inibição de *S. aureus* Resistentes a Meticilina (MRSA).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de realização da pesquisa

A presente pesquisa foi desenvolvida nos laboratórios de Bromatologia de alimentos e de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória-UFPE-CAV, em colaboração com o laboratório de Biotecnologia do Centro de apoio à pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco-CENAPESQ/UFRPE.

2.2. Materias

Para o trabalho experimental se usou o *trans*- cinamaldeído óleo essencial da canela (93%) de qualidade alimentar (Sigma Aldrich Co), quitosana de baixo peso molecular (10 a 120 kDa, 90% de desacetilação, PM 50.000) (Sigma Aldrich Co), e outros produtos de grau analítico, incluindo Tween TM 20 (Dinamica química), ácido acético e Hidroxido de sódio (NaOH).

2.3. Preparação das micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído

As micropartículas foram sintetizadas pelo método de coacervação simples descritos na literatura por SOUZA et al. (2005), com modificação devida a uma adaptação na etapa de gotejamento da solução preparada. Deste modo, foi preparada uma solução de quitosana 5% (p/v) em 100 mL de ácido acético 5% (v/v). Após a dissolução completa da quitosana, 1 mL do *trans*-cinamaldeído e 0,1 g do reticulante vanilina foram adicionados e em seguida homogeneizado durante 5 minutos em Homogenizador de alta velocidade ajustável FSH-2A (MXBAOHENG, EUA). Para estabilização do óleo essencial a homogeneização foi realizada com a solução de quitosana adicionada de *trans*-cinamaldeído e reticulante sob temperatura de -5°C. Em seguida a solução preparada anteriormente foi adicionada a um gotejador com diâmetro de 8 mm e gotejada em solução de NaOH 2,0 mol.L⁻¹ permanecendo em agitação utilizando agitador magnético sem aquecimento TE-089 (Tecnal, BR) por 30 minutos a uma rotação de 400 rpm para completa formação das micropartículas. Posteriormente realizou-se a lavagem das partículas com água destilada utilizando volumes de 50 mL até atingir pH 7,0 e em seguida, as partículas foram liofilizadas (SOUZA et al. 2005).

2.4. Caracterização das micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído

2.4.1. Índice de polidispersão e potencial zeta

Com a finalidade de se avaliar a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, as micropartículas foram caracterizadas quanto ao índice de polidispersão (PDI), e quanto à carga superficial (através do potencial zeta) pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando o equipamento Nano Brook Zeta Plus Zeta Potential Analyzer (Brookhaven, EUA). Para cada medição, 10 µL das amostras foram diluídas (v/v) em 2 mL de água destilada em pH neutro (~ 7,0). As análises foram realizadas quatro vezes.

2.4.2. Avaliação da morfologia das micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído

2.4.2.1. Microscopia Óptica (MO)

Para realização da análise, uma gota de micropartículas foi depositada em lâminas. As micrografias ópticas foram realizadas em um microscópio óptico (DI-136B LED, Digilab, Brasil) acoplado em sistema de aquisição de imagens digitais. A morfologia dispersão das micropartículas foi examinada em um microscópio óptico equipado com lentes objetivas de 10x e 40x e uma câmera digital.

2.4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e diâmetro das micropartículas

A partir da técnica de MEV foi realizada a determinação do tamanho das micropartículas por meio da medição do diâmetro médio com régua durante a obtenção das micrografias. Para realizar a análise, as amostras contendo micropartículas foram dispostas em stubs sobre fita de carbono e metalizadas a vácuo (Denton Vacuum, Disk V, EUA). Utilizou-se microscópio eletrônico de varredura (Tescan, MLU, VEGA3 República Tcheca) aplicada a uma tensão de aceleração de 30 kV conforme XIAO et al. (2014). Entre as principais razões para a utilização da MEV estão a alta resolução para observação das amostras e a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo alcançada pela técnica (DEDAVID et al., 2007).

2.4.3. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) do *Trans*-cinamaldeído foi realizada segundo o método proposto por Rutz et al. (2013). A EE foi determinada em função dos compostos fenólicos presentes na superfície e dentro das partículas. Para isto, 0,1 g de partículas liofilizadas foram homogeneizadas em Ultra-Turrax UTTD (IKA Workstation, DE) em 10 mL de metanol durante 5 minutos a temperatura ambiente utilizando uma rotação de 600 rpm e mantida em repouso por 24 h. Após esse período, a solução preparada anteriormente foi centrifugada a 4200 rpm, a 25 °C por 15 min, e 0,5mL do sobrenadante foram coletados para a realização da análise. As frações recolhidas foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos totais pelo método de FolinCiocalteau (Swain & Hills, 1959). A EE foi dada em porcentagem de compostos fenólicos, conforme equação descrita abaixo.

$$EE(\%) = \frac{\text{Compostos fenólicos totais} - \text{Compostos fenólicos da superfície}}{\text{Compostos fenólicos totais}} \times 100$$

2.5. Análise atividade antimicrobiana *In Vitro*

A avaliação do efeito antibacteriano do *Trans*-cinamaldeído foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton (CLSI, 2018), através da determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima). Os testes foram realizados com micropartículas contendo o antimicrobiano (*Trans*-cinamaldeído), com micropartículas com e sem o *trans*-cinamaldeído e com *trans*-cinamaldeído em sua forma livre.

Para a realização destas análises foram utilizadas 5 cepas de *S.aureus*, sendo: 1 cepa de *S. aureus* ATCC (6538); 1 cepa *S. aureus* MRSA (6) com perfil de resistência a cefoxitina, penicilina e metilicina; 1 cepa *S. aureus* MRSA (7) com perfil de resistência a cefoxitina, penicilina, eritromicina, clindamicina e metilicina; 1 cepa *S. aureus* MRSA (13) com perfil de resistência a cefoxitina, penicilina, eritromicina, clindamicina e metilicina e 1 cepa *S. aureus* MRSA (17) com perfil de resistência a cefoxitina, penicilina e metilicina. Estas cepas foram isoladas de alimentos (queijo coalho), mantidas no banco de microrganismos do laboratório de Microbiologia de Alimentos do CAV-UFPE do laboratório e mantidas sob refrigeração. A reativação das cepas foi realizada através da retirada de uma alçada das bactérias mantidas sob refrigeração e transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) e incubadas em estufa durante 24 h a 37

°C. Após uma alçada desse crescimento foi estriada em tubos contendo meio Agar inclinado, e incubadas por 24 h a 37 °C, para o isolamento das colônias. . A partir dessa cultura de isolados foi preparada a suspensão de células em solução salina, comparando-se a turbidez com o padrão 0,5 da escala de MacFarland (10^8 UFC/mL) e considerando a densidade ótica sob 625nm em espectrofotômetro.

No procedimento da análise, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde foram acrescentadas em cada poço 80 µL de caldo Mueller Hinton, 20 µL da suspensão bacteriana e 100µl do antimicrobiano encapsulado ou livre, sob diluições seriadas (1mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,06 mg/mL; 0,03 mg/mL; 0,01 mg/mL) para alcance de concentração final. Para controle da análise, foram preparados um controle positivo (caldo Mueller Hinton, suspensão bacteriana e solução diluente) e um controle negativo (caldo Mueller Hinton, antimicrobiano e solução diluente). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24, e em seguida submetidas à leitura de absorvância a 630 nm, em espectrofotômetro de microplacas (BiochromElx808). Os testes foram realizados em triplicata. Considerou-se a CIM, a menor concentração do antimicrobiano onde não se observou crescimento bacteriano no poço correspondente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção das micropartículas de quitosana contendo *Trans*-cinamaldeído

Uma adaptação ao método de coacervação simples em matriz de quitosana sugerido por SOUZA et al. (2005), foi realizada para o processo de obtenção das micropartículas sempre utilizando uma concentração de quitosana a 5% (v/v). Concentrações mais altas influenciavam na viscosidade interferindo na distribuição, pois aumentavam a viscosidade da solução e conseqüentemente dificultavam a distribuição homogenia do hidróxido de sódio e poderia levar a formação aglomerados.

O processo teve tempo médio de 40 minutos e foi observado que alguns fatores poderiam influenciar, tais como: concentração da solução de NaOH, distância do gotejador à superfície da solução de NaOH. Por esse motivo, essas variáveis foram mantidas constantes: concentração da solução de NaOH igual a 1 M, e distância do gotejador à superfície da solução de NaOH igual a 20 cm. O controle da distância de gotejamento foi realizado a fim de garantir uma maior padronização do processo. A

partir da padronização destes fatores foram obtidas partículas de tamanhos e características satisfatórias.

3.2. Caracterização das partículas

3.2.1. Índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ZP)

O PDI é considerado uma medida adimensional da amplitude da distribuição de tamanho de micropartículas, já o potencial zeta (ZT) é um indicador útil da carga superficial, e é utilizado para avaliar a estabilidade de suspensões coloidais. O Valor encontrado neste estudo para índice de polidispersão foi de $0,39 \pm 0,2$, caracterizando um sistema polidisperso ou multimodal ($PDI > 0,2$), indicando uma heterogeneidade na distribuição dos tamanhos das partículas, associado possivelmente as variações que as microcápsulas podem sofrer durante o gotejamento, sendo este responsável pela formação de gotas de diferentes tamanhos (ZERFA & BROOKS, 1996.; HU; MCCLEMENTS, 2015).

A determinação do potencial Zeta tem como objetivo avaliar a estabilidade das interações entre a partícula e o composto ativo, neste caso, o Trans-cinamaldeído. Ainda, o potencial zeta reflete a carga de superfície das micropartículas, 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 (WEN FAN et al., 2012).

As micropartículas apresentaram um potencial zeta de $20,61 \pm 0,8$ mV, sendo consideradas moderadamente estáveis. Esta carga positiva apresentada reflete os grupos catiônicos NH_3 livres da quitosana (ASTM 1985; MADUREIRA et al., 2015). Com o objetivo de reduzir as limitações associadas a estabilidade, neste estudo, as micropartículas foram liofilizadas, o que diminui as limitações associadas à estabilidade moderada das partículas na sua forma em meio líquido, tendo em vista que a liofilização imediata impede que o composto biotivo mova-se para fora da microcápsula.

3.2.2 Microscopia Ótica (MO)

Com base nas fotomicrografias das partículas pode-se inferir que há uma dispersão do óleo essencial em todo o material de parede (Figura 1). Este fato pode ser

atribuído ao material de parede escolhido, a quitosana, por sua capacidade de controlar a liberação de agentes ativos, grupos amina livres prontamente disponíveis para reticulação e bom eletropotencial, torna-se também eficaz na liberação de compostos solúveis em água e no aumento da biodisponibilidade de compostos pouco solúveis em água, e esta é uma característica de fundamental importância, pois o encapsulante ativo nesta pesquisa, o *Trans*-cinamaldeído é um composto hidrofóbico (Agnihotri tal., 2004).

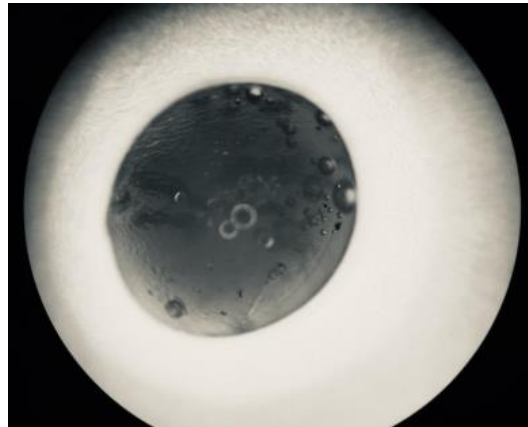


Figura 1. . Fotomicrografia por microscopia ótica (MO) de micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído em lente objetiva de 40x ressaltando a dispersão do óleo essencial em todo o material de parede.

Fonte: Autor

3.2.3. Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV) e diâmetro das micropartículas

Com base nas fotomicrografias realizadas por microscopia eletrônica De varredura (MEV) é possível conferir um formato oval, superfície enrugada, ausência de macroporos nas micropartículas. (Figura 2). Abdelmalek et al (2017) ao estudarem a microencapsulação de *trans*-cinamaldeído obtida por coacervação complexa também observaram formato mais esférico das partículas, com pouco grau de enrugamento, assim como encontrado neste estudo.

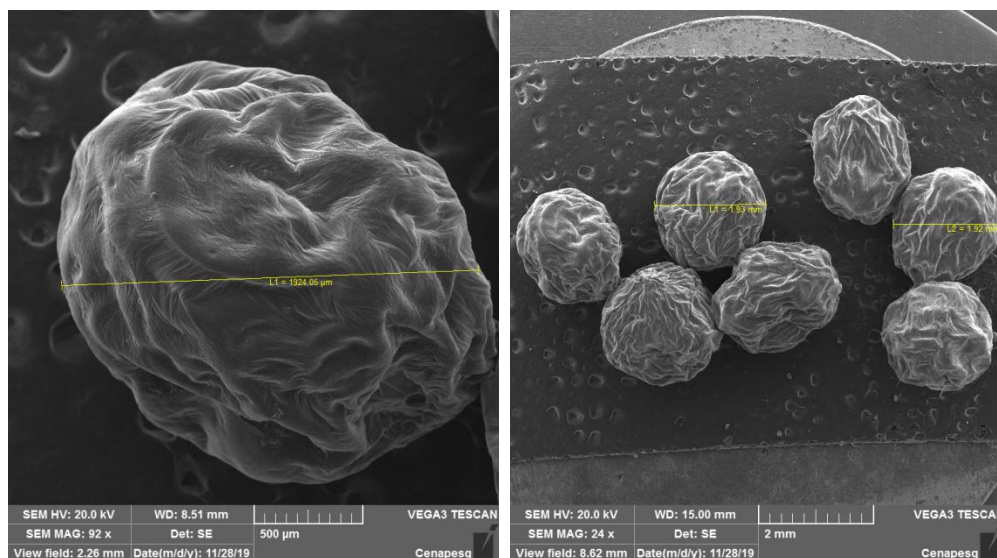


Figura 2. Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varedura (MEV) das micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído. (A) Fotomicrografia na escala 500 μm ressaltando a superfície enrugada e o diâmetro médio de uma micropartícula. (B) Fotomicrografia na escala 2 mm de um grupo de micropartículas ressaltando seu formato esférico e diâmetro médio.

Fonte: Autor

Em relação ao diâmetro médio das micropartículas, o valor obtido pela análise da MEV foi de $1,92 \pm 0,005$ mm (Figura 2). É importante ressaltar que partículas elaboradas por coacervação simples têm seu tamanho influenciado pelo diâmetro do gotejador e o tamanho das micropartículas é determinado pela concentração da quitosana na fase interna da emulsão (BERTHOLD et al., 1996.; LEIMANN et al., 2009). Para um determinado volume da fase interna, o aumento da concentração do polímero aumenta a viscosidade dessa fase, obtendo-se partículas de maiores dimensões, devido à maior dificuldade de dispersão da fase interna na fase externa (LEIMANN et al., 2009.; GIRARDI et al., 2017). Apesar disso, em ambos os materiais o tamanho médio das micropartículas está em uma escala satisfatória, pois de acordo Jyothi e colaboradores (2009) o tamanho aproximado de partículas elaborado pelo método de coacervação pode variar entre 5 -5000μm.

3.2.4 Eficiência da Encapsulação

O processo de encapsulação de *trans*-Cinamaldeído proporcionou uma eficiência de encapsulação (EE) de $93,81 \pm 1\%$, indicando que houve uma incorporação satisfatória do composto dentro da matriz polimérica, e que o mesmo está disponível para a prática de liberação. Isso está de acordo com os dados encontrados por alguns autores em relação à encapsulação de componentes hidrofóbicos cujo aprisionamento é geralmente maior que 90% (BRIGELIUS-FLOHE; TRABER, 1999 ; ZIGONEUANU et al 2008).

Segundo Almeida (2013) a eficiência da encapsulação é definida como a quantidade de substância retida no interior dos sistemas e depende, entre outros fatores, da afinidade entre o material que reveste a substância encapsulada. Para que um processo de microencapsulação seja considerado um processo ótimo, principalmente os processos de encapsulação de óleos, um baixo teor de óleo superficial e uma alta eficiência de encapsulação devem ser alcançados, o que significa que a maior parte do composto ativo está incorporada nas micropartículas (Almeida., 2013).

A eficiência de encapsulação neste estudo foi favorecida diante das condições do processo e material para matriz encapsulante de escolha, uma vez que são fatores que influenciam. Em estudo semelhante, realizado por Shahidi e Molaveisi (2019) em que visavam a encapsulação de *trans*-cinamaldeído em matrizes de goma arábica, maltodextrina e inulina por spray-drying a eficiência de encapsulação variou entre 40 a 95%, valor influenciado pelas formulações utilizadas.

Destaca-se que a eficiência de encapsulação é um dos parâmetros mais importantes nos processos de microencapsulação, pois é a partir deste parâmetro que conhecemos a quantidade de material ficou retido no núcleo e o quanto foi perdido no processo (JAFARI et al., 2008).

3.3. Análise da Atividade Antibacteriana *In Vitro*

Os resultados do estudo das micropartículas contendo o *trans*-cinamaldeído, das micropartículas sem o antimicrobiano e do óleo em sua forma livre frente às cepas de *S.aureus* ATCC e *S.aureus* MRSA, estão dispostos na tabela 1, diante dos valores observados para a CIM, interpretada como sendo a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo após um período de incubação de 24 horas (ANDREWS, 2001).

As micropartículas contendo o *trans*-cinamaldeído apresentaram atividade antibacteriana para cepas *S.aureus* ATCC como também para cepas *S. aureus* MRSA, obtendo-se valores de CIM menores do que para o tratamento com o óleo livre e para as micropartículas vazias (Tabela1). Isso demonstra que quando encapsulado o óleo tem sua atividade melhorada.

É importante observar que cepas *S. aureus* MRSA (6) e (17) com perfil de resistência a cefoxitina, penicilina e meticilina e as cepas *S. aureus* MRSA (7) e (13) com perfil de resistência a cefoxitina, penicilina, eritromicina, clindamicina e meticilina apresentaram CIM diferentes para o tratamento com as micropartículas contendo o *trans*-cinamaldeído. Essa variação entre CIM nas cepas da mesma espécie e de mesmo perfil de resistência que receberam o mesmo tratamento evidencia que mesmo se tratando de amostras com perfil fenotípico e genotípico para MRSA, outros fatores devem ser considerados ao se avaliar a ação antimicrobiana de determinada molécula (MOHAMMAD et al., 2014; IBIS et al., 2014), tais como carga de superfície microbiana, mecanismos específicos e inespecíficos de resistência, condições de cultivo, entre outros. Evidentemente, a inter-relação destes fatores pode servir de justificativa para essa variação do perfil inibitório para esta bactéria. Ainda, as diferenças de CIM entre isolados podem refletir diversidade populacional entre os isolados obtidos.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) em mg.mL⁻¹ do *trans*-cinamaldeído das micropartículas com o antimicrobiano (MCA) micropartículas vazia (MPV) e do óleo livre (OL),

CEPAS	CIM		
	MCA	PV	OL
<i>S. aureus</i> ATCC (6538)	0,03	0,2	0,5
<i>S aureus</i> MRSA (6)	0,1	0,2	0,2
<i>S. aureus</i> MRSA (7)	0,03	0,5	0,2
<i>S aureus</i> MRSA (13)	0,06	0,5	0,5
<i>S aureus</i> MRSA (17)	0,2	0,5	0,5

MCA: Partícula com antibacteriano; MPV: Partícula vazia; OL: Óleo livre

As micropartículas vazias também apresentaram atividade antibacteriana para ambas as cepas *S. aureus* MRSA (6) e (17), alcançando valores de CIM iguais ao encontrado para o óleo em sua forma livre, de forma semelhante às demais cepas, exceto para cepas ATCC (6538) que apresentou CIM menor à obtida para o óleo livre, e para cepas *S. aureus* MRSA (7), para as quais o maior potencial de inibição foi para o tratamento com o óleo livre (Tabela 1). Através destes resultados das partículas com o antimicrobiano conclui-se que outros compostos, além do composto bioativo, podem estar associada ação antimicrobiana, sugerindo possível sinergismo, quando uma interação positiva em que dois ou mais agentes em combinação exercem efeito inibitório maior que cada agente isolado. No caso das micropartículas em estudo, o material de parede utilizado, a quitosana, possui também efeito antibacteriano, uma vez que as aminas policatiônicas da quitosana interagem com resíduos carregados negativamente de macromoléculas na superfície celular das bactérias, subsequentemente inibindo o crescimento bacteriano (HELANDER et al, 2001). Esta afirmação permite supor que a alta atividade observada neste estudo seja possivelmente ao sinergismo entre o antimicrobiano estudado (*Trans*-cinamaldeído) e o material de parede utilizado (Quitosana), para o que estudos posteriores podem ser conduzidos visando uma avaliação complementar.

O *trans*-cinamaldeído em sua forma livre apresentou atividade antibacteriana tanto para cepas de *S. aureus* ATCC como para cepas *S. aureus* MRSA. Resultados efetivos do óleo livre frente às cepas de *S. aureus* ATCC e MRSA já eram esperados, tendo em vista que a inibição do crescimento bacteriano pelo *trans*-cinamaldeído já é algo consolidado na literatura, uma vez que estudos têm mostrado que a atividade antimicrobiana do *trans*-cinamaldeído pode ser atribuída às altas propriedades eletrofílicas do grupo carbonila adjacente à ligação dupla, que pode ativar esse composto para reagir com nucleófilos, como a proteína sulfidrilica e os grupos amino do microrganismo (NERI, et al., 2006). Além disso, sabe-se que o *trans*-Cinamaldeído em baixas concentrações inibe enzimas que interagem com importantes citocinas, inibindo assim o crescimento microbiano (NAZZARO et al., 2013).

Ao comparar os resultados de CIM obtidos para os tratamentos realizados, óleo livre e encapsulado, observa-se que ambos os tratamentos foram efetivos, porém os menores valores de CIM (0,03, 0,06 e 0,1), na dependência da cepa em teste, foram obtidos para o tratamento com as micropartículas contendo o *trans*-cinamaldeído.

Segundo Sartoratto e Machado (2004) valores de CIM até 0,50 mg/ml representam uma alta atividade contra os micro-organismos. Chun et al (2015), ao estudarem o efeito antimicrobiano do *trans*-Cinamaldeído encapsulado em matriz de β -Ciclodextrina em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* obtiveram CIM entre 0,5 e 0,8 mg.mL⁻¹, valor próximos ao encontrado no tratamento com o óleo livre. Jia et al. (2011) ao avaliarem o potencial de inibição do *trans*-cinamaldeído entre amostras de *S. aureus* MRSA, obtiveram CIM de 0,65 mg.mL⁻¹, concentração superiores aos obtidos em nosso estudo.

Em trabalho de Albano et al. (2016), o cinamaldeído em sua forma livre apresentou CIM de 0,4mg/mL para *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), valor próximo dos obtidos em nosso estudo. Ressalta-se que as diferenças de CIM entre os resultados sejam em razão das distinções metodológicas, como utilização de material de parede diferente, tamanho das partículas, eficiência de encapsulação e interação entre o óleo essencial e os agentes encapsulantes e estes devem ser considerados ao se correlacionar os distintos resultados obtidos.

Considerando os resultados verificados neste estudo, postula-se que a junção da quitosana com o *trans*-cinamaldeído no sistema de encapsulação é satisfatório, visto que aumenta a capacidade de inibição do crescimento das bactérias em tese, quando comparada aos valores de CIM do tratamento com as micropartículas vazias e do óleo livre (KIM et al., 1995; MOHAMMAD et al., 2014).

5. CONCLUSÃO

O processo de condução da técnica de coacervação simples e uso de quitosana como material de parede para microencapsular o *trans*-cinamaldeído foram viáveis, proporcionando, uma eficiência da encapsulação (EE) de 93,81%, diâmetro médio $1,92 \pm 0,005$ μ m, PDI de $0,39 \pm 0,2$ e uma carga de superfície de $20,61 \pm 0,8$ mV, de forma a se alcançar características compatíveis para uso em alimentos. *Trans*-cinamaldeído encapsulado em matriz de quitosana apresentou eficiência na inibição de cepas de *S. aureus* MRSA, e esse efeito antibacteriano pode ter sido potencializado pela quitosana como material de parede. Em relação ao óleo livre, o efeito antibacteriano das micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído foi mais eficiente, uma vez que foram necessárias menores concentrações do antimicrobiano para a inibição do crescimento bacteriano. Micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído são

viáveis para efeito antibacteriano na inibição de cepas resistentes de *S. aureus* MRSA. Este estudo torna-se útil para avanços em desenvolvimento de micropartículas de quitosana contendo *trans*-cinamaldeído visando a aplicação em alimentos.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

7. REFERÊNCIAS

ABDELMALEK, I.; ABDERREZZAK, M.; SVAHN, I.; SIMONNEAUX, G. Cinnamaldehyde loaded-microparticles obtained by complex coacervation: Influence of the process parameters on the morphology and the release of the core material. **Biointerface Research in Applied Chemistry**. V,7, p. 1934-1944, 2017.

AGNIHOTRI, S.A.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVI, T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**. 100(1): 5– 28, 2004.

ALBANO, M.; ALVES, F. C. B.; ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, L. N.; PEREIRA, A. F. M., DE SOUZA, M. D. L. R.; JÚNIOR, A. F. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 38, 83- 90, 2016.

ALMEIDA, JACQUELINE DE FLORIO. **Atividade antioxidante e Microencapsulação de Extrato Etanólico de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. Trabalho de Conclusão de Curso Bacharelado em Química da UTFPR, Pato Branco, 2013.

AMARA, A. A.; EL-MASRY, M. H.; BOGDADY, H. H. Plant crude extracts could be the solution: Extracts showing in vivo antitumorogenic activity. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. Sci. 21:159-171, 2008.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5–16, 2001.

BENKERROUM, N. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview. **Critical reviews in Food science and nutrition**, v. 58, n. 12, p. 1943-1970, 2018.

BERTHOLD, A.; CREMER, K.; Kreuter, J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs, **Journal of Controlled Release**, p.17-25,1996.

CHEN, H.; HU, X.; CHEN, E.; WU, S.; MCCLEMENTS, D.J.; LIU, S.; LI, B.; LI, Y. Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**. 61, 662–671, 2016

CHUN, J-Y.; JO, Y.J.; BJRAPHA, P.; MIN, S.G.; Antimicrobial Effect of α - or β -Cyclodextrin Complexes with *Trans* -Cinnamaldehyde Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.**Drying Technology**. p.377-33, 2015.

DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. **EdiPUCRS**, 2007.

FETSCH, A.; JOHLER, S. *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 5, p. 88-96, 2018.

FRIEDMAN, M. Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 63, 3805– 3822, 2015.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 243-246.

GIRARDI, S. N.; GARCÍA, D.; PASSONE, M. A.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. Microencapsulation of *Lippia turbinata* essential oil and its impact on peanut seed quality preservation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p.116, 227–233, 2017.

GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interaction with food components. **Dublin Institute of Technology**, 2009.

HELANDER, I.M.; NURMIAHO-LASSILA, E.; AHVENAINEN, L. R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiology* p. 235-244, 2001.

IBIS, C.; TUYUN, A.F.; BAHAR, H.; AYLÄ, S.S.; STASEVYCH, M.V.; MUSYANOVYCH, Y.R.; KAMAROVSKA-POROKHNYAVETS, O.; NOVIKOV, V. Nucleophilic substitution reactions of 1,4-naphthoquinone and biologic properties of novel S-, S, S-N-, and N,S-substituted 1,4- naphthoquinone derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**. Res 23. 2140-2149, 2014.

ILK, S.; SAGLAM, N.; OZGEN, M.; KORKUSUZ, F. Chitosan nanoparticles enhances the anti-quorum sensing activity of kaempferol. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 653-662, 2017.

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, p. 409-416, 2011.

KIM, M. R.; MARSHALL, M.R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2839–2845, 1995.

KONG, M.; CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **Int. J. Food Microbiol.** p. 51 – 63, 2010.

LEIMANN, V. F.; GONÇALVES, H. O.; MACHADO, A. F. R.; BOLZAN, A. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. **Materials Science and Engineering**. p.430–436, 2009.

LÓPEZ-MATA, M.A.; RUIZ-CRUZ, S.; DE JESÚS ORNELAS-PAZ, J.; DEL TOROSÁNCHEZ, C.L.; MÁRQUEZ-RÍOS, E.; SILVA-BELTRÁN, N.P.; CIRACHÁVEZ, L.A.; BURRUEL-IBARRA, S.E. Mechanical, barrier and antioxidant properties of chitosan films incorporating cinnamaldehyde. **Journal of Polymers and the Environment**. 1–10, 2017.

MACHADO, T.F.; BORGES, M.F.; BRUNO, L.M. **Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos**. Embrapa Agroindustrial Tropical – Fortaleza, 2011.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, A.; CASTRO, P. M.; PINTADO, M. Production of antimicrobial chitosan nanoparticles against food pathogens. **Journal of food engineering**, 2015.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 219, n. 1, p. 27-53, 2015.

MOHAMMAD, A.W.; SUHIMI, N. M.; AZIZ, A.G.K.B.; JAHIM, J.MD. Process for production of hydroysed collagen from agriculture resources: Potential for further development. **Journal of applied sciences**, 2014.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectroscopy**. v.4, p.,-1-37.2016.

NAZZARO, F; FRATIANE, F.; MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451-1474, 2013.

NERI, F.; MARI, M.; BRIGATI, S. Control of *Penicillium expansum* by volatile plant compounds. **Plant pathology**, 55, 100-1005, 2006

RIEGER, K.A.; SCHIFFMAN, J.D. Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly (ethylene oxide) nanofibers. **Carbohydrate Polymers**. 113, 561– 568, 2014.

RUTZ, J.K.; ZAMBIAZI, R.C.; BORGES, C.D.; KRUMREICH, F.D.; LUZ, S.R.; HARTWIG, N.; ROSA, C.G. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. **Carbohydrate Polymers**, 98, 1256- 1265, 2013.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 275-280, 2004.

SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; GARDINI, F.; LANCIOTTI, R. Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. **Food Chemistry**. 182 pp. 185-192, 2015.

SWAIN, T., HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 10, 63-68, 1959.

TAREKGNE, E. K.; SKJERDAL, T.; SKEIE, S.; RUDI, K.; PORCELLATO, D.; FÉLIX, B. Enterotoxin gene profile and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine bulk milk and milk products of Tigray region, northern Ethiopia. **Journal of Food Protection**, v. 79, p. 1387–1395, 2016.

SHAHIDI, N. M.; MOLAVEISI, M. Microencapsulation optimization of cinnamon essential oil in the matrices of gum Arabic, maltodextrin, and inulin by spray-drying using mixture design. **Journal of Food Process Engineering**, 2019.

XIAO, Z.; LIU, W.; ZHU, G.; ZHOU, R.; NIU, Y. Review of the preparation and application of flavor and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, 0. 1482-1494, 2014.

Zeta potential of colloids in water and waste water, ASTM standard D4187-82, **American Society for testing and materials**, 1985.

WEN FAN.; WEN FANA.; WEI YAN.; ZUSHUN, X.U.; HONG, N.I. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21-27, 2012.

WHO. World Health Organization. **The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action**. Report of Joint FAO/WHO. p. 1–119, 2012. Acesso em: 06 out. 2019.

ZERFA, M.; BROOKS, B.W. Prediction of vinyl chloride drop sizes in stabilised liquid-liquid agitated dispersion. **Chemical Engineering Science**. p. 3223 – 3233, 1996.

Zeta potential of colloids in water and waste water, ASTM standard D4187-82, **American Society for testing and materials**, 1985.

WEN FAN.; WEN FANA.; WEI YAN.; ZUSHUN, X.U.; HONG, N.I. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21-27, 2012.

WHO. World Health Organization. **The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action**. Report of Joint FAO/WHO. p. 1–119, 2012. Acesso em: 06 out. 2019.

ZERFA, M.; BROOKS, B.W. Prediction of vinyl chloride drop sizes in stabilised liquid-liquid agitated dispersion. **Chemical Engineering Science**. p. 3223 – 3233, 1996.