



MARIANA SILVA COELHO

**RESPOSTA ADAPTATIVA DE *Clostridium*
perfringens, *Salmonella* Enteritidis E
Staphylococcus aureus AOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*,
EUGENOL, TIMOL E ÁCIDO PERACÉTICO**

LAVRAS – MG

2014

MARIANA SILVA COELHO

**RESPOSTA ADAPTATIVA DE *Clostridium perfringens*, *Salmonella*
Enteritidis e *Staphylococcus AUREUS* AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Syzygium aromaticum, *Origanum vulgare*, EUGENOL, TIMOL E ÁCIDO
PERACÉTICO**

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

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

**LAVRAS – MG
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Coelho, Mariana Silva.

Resposta adaptativa de *Clostridium perfringens*, *Salmonella*
Enteritidis e *Staphylococcus aureus* aos óleos essenciais de
Syzygium aromaticum, *Origanum vulgare*, eugenol, timol e ácido
peracético / Mariana Silva Coelho. – Lavras: UFLA, 2014.

95 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Cravo-da-índia. 2. Orégano. 3. Bactérias - Resistência. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

MARIANA SILVA COELHO

**RESPOSTA ADAPTATIVA DE *Clostridium perfringens*, *Salmonella*
Enteritidis e *Staphylococcus AUREUS* AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Syzygium aromaticum, *Origanum vulgare*, EUGENOL, TIMOL E ÁCIDO
PERACÉTICO**

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

APROVADA em 28 de fevereiro de 2014

Dr. ^a . Wellingta Cristina Almeida do N. Benevenuto	IFSUDESTEMG
Dr. ^a . Patrícia Gomes Cardoso	UFLA
Dr. Victor Maximiliano Reis Tebaldi	UFLA

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

**LAVRAS – MG
2014**

*A toda minha família,
em especial aos meus pais, Juarez e Roseli,
e ao meu namorado Raphael,
em reconhecimento ao apoio e incentivo
tão profundos a mim concedidos.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força constante, pois sem Ele com certeza não estaria terminando mais esta etapa da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Roberta pela valiosa oportunidade, orientação, dedicação, paciência e incentivo que contribuíram muito ao aprendizado e à concepção deste trabalho.

Aos professores do PPGMA pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus pais, Juarez e Roseli, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e me apoiando.

Aos meus irmãos, Paulo e Pedro e respectivas cunhadas Lauren e Pollyana, pela amizade, carinho e também pelo apoio e incentivo.

Ao meu namorado Raphael pelo apoio, compreensão, paciência e carinho nos momentos mais difíceis.

A toda minha Família que contribuiu para essa vitória e ao meu afilhado Gustavo que me deu força mesmo sem saber.

Aos Professores da banca Patrícia, Victor pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho e especialmente à professora Wellingta que vem fazendo parte de todas as minhas conquistas desde o começo de minha vida acadêmica.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório pela ajuda na condução dos experimentos, em especial à Rafaela e Juliana que foram as estagiárias mais eficientes do mundo.

Aos meus amigos de turma, em especial à Ana Carolina que quando precisei estava presente para me dar apoio, carinho, dedicação e atenção, mesmo nos momentos mais difíceis.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

RESUMO GERAL

A oferta de alimentos seguros e saudáveis é de grande interesse por parte governamental e indústria de alimentos. Para a garantia da inocuidade dos alimentos, cada vez mais se utilizam de agentes antimicrobianos, tanto como conservantes quanto sanificantes. Assim os microrganismos ficam cada vez mais expostos a essas substâncias as quais muitas vezes não os eliminam, promovendo muitas vezes pressão seletiva levando ao aparecimento de microrganismos resistentes a eles, ou ativando seus mecanismos de resposta adaptativa ao estresse, fazendo com que sobrevivam em condições ambientais inóspitas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta adaptativa e a adaptação cruzada de *Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* à concentrações subletais dos óleos essenciais (OE's) de *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), aos compostos majoritários eugenol e timol e ao desinfetante ácido peracético. As concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos antimicrobianos e a influência da temperatura de cultivo sobre *C. perfringens* foram determinadas empregando-se a técnica de diluição em caldo, utilizando-se caldo Brain Heart Infusion (BHI). As temperaturas empregadas foram: 20 °C, 30 °C e 37°C, o tempo de incubação foi de 24 horas. Os antimicrobianos foram homogeneizados em caldo BHI contendo 0,5% (v/v) de Tween 80. As concentrações testadas foram de 0,00; 0,05; 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25% (v/v). Após incubação, alíquotas das culturas foram retiradas e plaqueadas em ágar BHI adicionado de 0,5% de glicose, as placas foram incubadas à 37°C por 24 horas. A CMB foi determinada baseando-se na ausência de crescimento nas placas. Para avaliação da resposta adaptativa, após ativação da cultura, alíquotas foram transferidas para tubos contendo concentrações subletais (1/4 CMI e 1/8 CMI) dos antimicrobianos e cultivados a 37 °C por 6 horas. Após esse período, as células foram recuperadas e as CMB foram novamente determinadas. O estudo da adaptação cruzada foi realizado cultivando *Clostridium perfringens* em presença de concentrações subletais de eugenol, timol e ácido peracético a 37 °C por 6h. Após adaptação, as células recuperadas foram utilizadas para determinação das CMB dos compostos aos quais elas não foram previamente expostas, em meio contendo diferentes pH (6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0) e a temperatura de cultivo de 20°C. Para *S. aureus* e *S. Enteritidis* a influência da temperatura sobre a concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) dos OEs, eugenol, timol e ácido peracético foi estudada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo. Os antibacterianos foram utilizados nas concentrações de 0,00; 0,05; 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25 (v/v) e as temperaturas estudadas foram 20; 30 e 37°C. Em todos os experimentos, os OEs, o timol e eugenol foram homogeneizados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) adicionado de 0,5% (v/v) de Tween 80. Em todos os estudos envolvendo ácido peracético o Tween 80 não

foi utilizado. O crescimento bacteriano foi verificado pela leitura da absorbância (DO_{620nm}) após incubação das culturas nas diferentes temperaturas por 24h. Para avaliação da resposta adaptativa, os microrganismos foram expostos às concentrações subletais de 1/4 CMI e 1/8 CMI dos antibacterianos por 6 horas e posteriormente incubados a 37 °C por 24 horas em concentrações acima das CMI. A capacidade de adaptação cruzada de *S. aureus* e *S. Enteritidis* foi estudada cultivando previamente as células por 6h em presença de timol, carvacrol e, ou, ácido peracético em concentrações subletais (1/4 e 1/8 do CMI). Após cultivo, as células foram recuperadas e expostas a agentes antimicrobianos diferentes daqueles expostos a concentrações subletais, a temperatura de 20°C e a diferentes pH (6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0). Para *C. perfringens* não houve influência da temperatura de cultivo sobre a CMB dos óleos essenciais de cravo e orégano e do composto timol, cujas CMB foram de 6,25; 1,56 e 0,78%. Entretanto a 30°C as CMB do eugenol e ácido peracético foram o dobro (6,25%) e a metade (0,06%), respectivamente, daquelas obtidas nas outras temperaturas. Após exposição às concentrações subletais dos antimicrobianos a 37°C, *C. perfringens* se mostrou mais sensível ao timol e ao eugenol, não crescendo em meio contendo metade da CMB desses antimicrobianos. Entretanto, observou-se adaptação ao OE de cravo e ao ácido peracético, uma vez que, nas concentrações de 11,25% e 0,24%, respectivamente, *C. perfringens* cresceu. Na temperatura de cultivo de 20°C houve adaptação cruzada de *C. perfringens* a todos os antimicrobianos testados. Apenas as células expostas a 1/8 da CMB de eugenol foram capazes de se adaptarem ao pH maior que o mínimo de crescimento. *C. perfringens* apresentou capacidade de adaptação e adaptação cruzada a alguns fatores de estresse estudados, fato que mostra o risco de ocorrência de toxinfecções alimentares. As CMI dos OEs de orégano e cravo da Índia, timol, eugenol e ácido peracético foram para *S. Enteritidis*, respectivamente de 0,39; 0,39; 0,09; 0,39 e 0,03%. Já para *S. aureus* foram, respectivamente, 0,78; 0,78; 0,39; 1,56 e 0,06%. As CMI dos OE e do eugenol foram maiores a 37°C para *S. aureus* do que a 20 e 30°C. Já para *S. Enteritidis*, as CMI tanto do OE de cravo da Índia (0,39%) quanto para o eugenol (0,39%) foram maiores a 37°C, nesta temperatura a CMI do ácido peracético, 0,03%, foi menor. A CMI do timol foi influenciada apenas pela temperatura de 30°C, onde foi maior que as outras (0,19%). Tanto *S. aureus* quanto *S. Enteritidis*, adaptadas, se mostraram mais sensíveis às CMIs anteriormente determinadas, entretanto foi observada alta variabilidade no crescimento das células expostas quando cultivadas em concentrações mais elevadas que a CMI. Da mesma forma, a variabilidade na resposta fisiológica das células tanto de *S. aureus* quanto de *S. Enteritidis*, foram observadas na adaptação cruzada. *S. aureus* se mostrou capaz de tolerar pH mais baixos após exposição a concentrações subletais de eugenol, timol e ácido peracético, fato não observado com *Salmonella*. As bactérias estudadas mostraram-se capazes de se adaptarem a condições antes inadequadas ao seu

crescimento quando expostas a condições subletais indicando risco na obtenção de alimentos seguros.

Palavras-chave: Cravo-da-índia. Orégano. Bactérias - Resistência.

GENERAL ABSTRACT

The provision of safe and healthy food is of great interest to government and to food industry. To guarantee food safety, antimicrobial agents, sanitizers as well as preservatives are increasingly being used. This way, microorganisms are increasingly exposed to these substances, which often do not eliminate them, but often promotes selective pressure leading to the emergence of resistant microorganisms to them, or by activating the mechanisms of adaptive response to stress, causing them to survive in inhospitable environments. This study aimed to evaluate the adaptive response and cross-adaptation of *Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* to sublethal concentrations of *Origanum vulgare* (oregano) essential oils (EO's) and of *Syzygium aromaticum* (clove), to the majority compounds eugenol and thymol and to peracetic acid disinfectant. The minimum bactericidal concentrations (MBC) and the antimicrobial effect of the temperature cultivation on them were determined employing the broth dilution technique, using Brain Heart Infusion broth (BHI). The temperatures used were 20 °C, 30 °C and 37 °C, the incubation time was 24 hours. The antimicrobial agents were homogenized in BHI broth containing 0.5% (v/v) Tween 80. The tested concentrations were 0.00; 0.05; 0.09; 0.19; 0.39; 0.78; 1.56, 3.12 and 6.25% (v/v). After incubation, aliquots of the cultures were taken and plated on BHI agar, supplemented with 0.5% glucose, plates were incubated at 37 °C for 24 hours. The MBC was determined based on the lack of growth on the plates. To evaluate the adaptive response after activation of culture, aliquots were transferred to tubes containing sublethal concentrations (1/4 MIC and 1/8 MIC) of antimicrobial agents and cultured at 37 °C for 6 hours. After this period, the cells were recovered and MBC was again determined again. The study of cross-adaptation was conducted by cultivating *Clostridium perfringens* in the presence of sublethal concentrations of eugenol, thymol and peracetic acid at 37 °C for 6h. After adjustment, the recovered cells were used to determine the MBC of the compounds to which they have not previously been exposed to in media containing different pH (6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0) and cultivation temperature of 20 °C. For *S. aureus* e *S. Enteritidis* the influence of temperature on the minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal (MBC) of EOs, eugenol, thymol and peracetic acid was studied using the technique of broth microdilution. Antibacterial agents were used in concentrations of 0.00; 0.05; 0.09; 0.19; 0.39; 0.78; 1.56, 3.12 and 6.25 (v/v) and temperatures were studied 20; 30 and 37 °C. In all experiments, the EOs, thymol and eugenol were homogenized in brain heart infusion broth (BHI), supplemented with 0.5% (v/v) of Tween 80. In all studies involving peracetic acid the tween 80 was not used. Bacterial growth was checked by reading the absorbance (DO_{620nm}) after incubation of the cultures at different temperatures for 24 hours. To evaluate the

adaptive response, microorganisms were exposed to sublethal concentrations of 1/4 MIC and 1/8 MIC of antibacterial for 6 hours and then incubated at 37 ° C for 24 hours in concentrations above the MIC. The ability to cross adaptation of *S. aureus* and *S. enteritidis* has been previously studied by culturing the cells for 6h in the presence of thymol and carvacrol or peracetic acid in sub-lethal concentrations (1/4 and 1/8 MIC). After cultivation, cells were recovered and exposed to different antimicrobials of those exposed to sublethal concentrations, temperature of 20 ° C and different pH (6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0) adjusted with lactic acid. For *C. perfringens* there was no influence of cultivation temperature on the MBC of the essential oils of clove and oregano and thymol compound whose MBC were 6.25; 1.56 and 0.78%. However at 30 °C, the MBC of eugenol and peracetic acid were double (6.25%) and half (0.06%), respectively, than those obtained in the other temperatures. After exposure to sublethal concentrations of the antimicrobial at 37 °C, *C. perfringens* was more sensitive to the thymol and eugenol, not growing in media containing these antibiotics half of the MBC. However, there was adaptation to EO and to peracetic acid, once at concentrations of 0.24% and 11.25%, respectively, *C. perfringens* grew. In cultivation temperature of 20 °C there was cross adaptation of *C. perfringens* to all antibiotics tested. Only exposed to 1/8 cells of eugenol MBC were able to adapt to greater pH than the minimal growth one. *C. perfringens* showed capacity of adaptation and cross-adaptation to some stress factors studied, a fact that shows the risk of food poisoning. MICs of EOs of oregano and clove, thymol, eugenol and peracetic acid were to *S. Enteritidis*, respectively 0.39; 0.39; 0.09; 0.39 and 0.03%. For *S. aureus* they were, respectively, 0.78, 0.78; 0.39; 1.56 and 0.06%. The MIC of eugenol and EO were higher at 37 °C for *S. aureus* than at 20 °C and 30 °C. As for *S. Enteritidis*, the MIC of both OE clove (0.39%) and for eugenol (0.39%) were higher at 37 °C, at this temperature the MIC of peracetic acid, 0.03%, was lower. Thymol MIC was only influenced by the temperature of 30 °C, which was higher than the others (0.19%). Both *S. aureus* as *S. Enteritidis*, adapted, were more sensitive to the previously determined MICs, however, high variability was observed in the growth of treated cells when grown in higher concentrations than the MIC. Similarly, variability in the physiological response of the cells of both *S. aureus* and *S. enteritidis* was observed in the cross adaptation. *S. aureus* has been shown to tolerate lower pH after exposure to sublethal concentrations of eugenol, thymol and peracetic acid, fact that was not observed with *Salmonella*. The bacteria studied were capable of adapting to conditions prior to the inadequate growth when exposed to sublethal conditions indicating risk in getting safe food.

Keywords: Clove. Oregano. Bacterial - Resistance.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	25
Figura 2	Constituintes químicos dos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Syzygium aromaticum</i>	26
Figura 3	Mecanismo de ação dos óleos essenciais.....	27
Figura 4	Estrutura Molecular do Timol.....	30
Figura 5	Estrutura Molecular do Eugenol	31
Figura 6	Célula bacteriana vegetativa gram-negativa e gram-positiva, mostrando os três principais alvos de agentes biocidas: (A) parede celular, (B) membrana citoplasmática e (C) citoplasma. (Figura adaptada de Denyer e Stewart, 1998).....	32

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Influência da temperatura de cultivo de <i>Clostridium perfringens</i> sobre as concentrações mínimas bactericidas (%) dos óleos essenciais, timol, eugenol e ácido peracético.....	57
Tabela 2	Determinação do pH mínimo inibitório (pH _{MI}) e o mínimo de crescimento (pH _{MC}) de <i>Clostridium perfringens</i> exposto a diferentes ácidos.....	59
Tabela 3	Adaptação de <i>Clostridium perfringens</i> aos óleos essenciais, eugenol, timol e ácido peracético.....	60
Tabela 4	Adaptação cruzada de <i>Clostridium perfringens</i> ao timol, eugenol, ácido peracético e temperatura (20°C).....	62
Tabela 5	Resposta da indução à adaptação cruzada de <i>C. perfringens</i> ao timol, eugenol e ácido peracético a diferentes pH ajustados com ácido láctico.....	63

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) dos antimicrobianos sobre <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis e <i>Staphylococcus aureus</i> a 37°C.....	81
Tabela 2	Influência da temperatura de crescimento sobre as concentrações mínimas inibitórias (%) de óleos essenciais, timol, eugenol e ácido peracético sobre <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis.....	83

Tabela 3	Determinação pH mínimo inibitório (pH_{MI}) e o mínimo de crescimento (pH_{MC}) de <i>S. aureus</i> e <i>S. enterica</i> Enteritidis expostos a diferentes ácidos.....	84
Tabela 4	Resposta da indução da adaptação de <i>S. enterica</i> Enteritidis aos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético.....	86
Tabela 5	Resposta da indução da adaptação de <i>S. aureus</i> aos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético	87
Tabela 6	Resposta da indução à adaptação cruzada de <i>S. enterica</i> Enteritidis aos compostos majoritários e ácido peracético	88
Tabela 7	Resposta da indução à adaptação cruzada de <i>S. aureus</i> aos compostos majoritários e ácido peracético	89
Tabela 8	Resposta da indução à adaptação cruzada de <i>S. enterica</i> Enteritidis e <i>S. aureus</i> aos compostos e ácido peracético a diferentes pHs	90

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	19
1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	Adaptação e adaptação cruzada das bactérias a agentes antimicrobianos	22
2.2	Óleos essenciais	23
2.2.1	Mecanismo de ação dos óleos essenciais	26
2.2.2	<i>Origanum vulgare</i> (Orégano).....	28
2.2.3	<i>Syzygium aromaticum</i> (cravo-da-índia).....	29
2.3	Compostos majoritários	30
2.3.1	Timol	30
2.3.2	Eugenol	30
2.4	Ácido peracético	31
2.5	<i>Clostridium perfringens</i>	32
2.6	Características de Salmonella enterica Enteritidis, Staphylococcus aureus	34
2.6.1	Salmonella enterica Enteritidis	34
2.6.2	Staphylococcus aureus	36
	REFERÊNCIAS	38
	CAPÍTULO 2 Adaptação e adaptação cruzada de <i>Clostridium perfringens</i> a diferentes fatores.....	45
1	INTRODUÇÃO	50
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	Local de execução do experimento	52
2.2	Antimicrobianos	52
2.3	Microrganismo	52

2.3.1	Padronização, estocagem e preparo dos inóculos.....	52
2.4	Influência da temperatura de cultivo de <i>Clostridium perfringens</i> sobre as concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia, timol, eugenol e ácido peracético	53
2.5	Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório	54
2.6	Adaptação de <i>Clostridium perfringens</i> às concentrações subletais dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético.....	54
2.7	Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético sobre as células adaptadas	55
2.8	Determinação da capacidade de adaptação cruzada de <i>Clostridium perfringens</i>	56
2.8.1	Compostos majoritários e ácido peracético	56
2.8.2	pH	56
2.8.3	Temperatura.....	56
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1	Influência da temperatura de crescimento sobre as concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético	57
3.2	Determinação do pH mínimo inibitório e do mínimo de crescimento.....	58
3.3	Adaptação de <i>Clostridium perfringens</i> às concentrações subletais dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético.....	60

3.4	Avaliação da adaptação cruzada de <i>Clostridium perfringens</i> aos compostos majoritários, ácido peracético e temperatura	61
4	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
	CAPÍTULO 3 Adaptação e adaptação cruzada de <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis e <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes fatores	68
1	INTRODUÇÃO	73
2	MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1	Local de execução do experimento.....	76
2.2	Antimicrobianos	76
2.3	Microorganismos.....	76
2.3.1	Padronização, estocagem e preparo dos inóculos.....	77
2.4	Influência da temperatura de crescimento sobre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético	77
2.5	Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório	78
2.6	Adaptação das bactérias às concentrações subletais dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético	79
2.7	Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético sobre as células adaptadas	79
2.8	Avaliações da aquisição de resistência cruzada.....	80
2.9.1	Compostos majoritários e Ácido peracético	80
2.9.2	pH	80
2.9.3	Temperatura.....	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81

3.1	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) dos Óleos Essenciais, Compostos Majoritários e Ácido Peracético.....	81
3.2	Influência da temperatura de crescimento sobre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético	82
3.3	Determinação do pH mínimo inibitório e do mínimo de crescimento.....	84
3.4	Adaptação das bactérias às concentrações subletais dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético	85
3.5	Avaliação da aquisição de resistência cruzada bacteriana entre os compostos majoritários, ácido peracético e temperatura.....	88
4	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A segurança alimentar tem apresentado enorme relevância no domínio da saúde pública nos últimos anos. Os alimentos, muitas vezes, atuam como fonte de transmissão de doenças bacterianas para os animais e para o ser humano. Para assegurar alimentos inócuos ao consumidor, as indústrias utilizam cada vez mais agentes antimicrobianos. Com o aumento da utilização desses agentes, a resistência a antimicrobianos tem sido objeto de atenção dos pesquisadores. Com a grande utilização de antimicrobianos para garantir a inocuidade alimentar e a saúde do ser humano, as bactérias têm ficado cada vez mais expostas a concentrações subletais de agentes sanificantes durante os procedimentos de higienização e a conservantes, o que aumenta a possibilidade do aparecimento de microrganismos resistentes a eles, devido à ativação dos mecanismos de resposta adaptativa ao estresse, fazendo com que sobrevivam em condições ambientais antes impróprias ao seu crescimento.

Os consumidores cada vez mais procuram alimentos saudáveis, naturais, convenientes e que contenham baixo teor de sal e de conservantes ou, até mesmo, ausência desses. A utilização de óleos essenciais condimentares, como os óleos de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e orégano (*Origanum vulgare*) e seus compostos majoritários, como agentes antibacterianos, surgiu como alternativa natural para substituição dos conservantes normalmente utilizados tornando os alimentos mais saudáveis.

Com a constante utilização de agentes antimicrobianos o número de bactérias que se mostram resistentes aos agentes sanificantes e antimicrobianos utilizados têm aumentado (DAVIDSON; HARRISON, 2002), tanto na área médica quanto na indústria de alimentos, mostrando, assim, a possibilidade de aparecimento de mais microrganismos resistentes. Essa capacidade de

desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos de uso na indústria de alimentos é característica observada entre os microrganismos de forma geral.

As bactérias podem desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos por mutação, aquisição de novas informações genéticas por transferência horizontal de genes, expressão de genes silenciosos e crescimento em biofilme, além das alterações fenotípicas. O mecanismo de adaptação cruzada confere aos microrganismos resistência a fator de estresse diferente daquele ao qual foram submetidos. As células bacterianas apresentam constantes alterações quando expostas a condições extremas que causam estresse. Consequentemente, para que ocorra sobrevivência destas é necessária a evolução da resposta celular para detectar, monitorar e responder a essas alterações. O princípio geral da adaptação ao estresse pode ser simplesmente indicado por uma bactéria que é exposta ao estresse subletal, podendo tornar-se mais resistente a aplicações subsequentes do mesmo fator, ou, em alguns casos, por fatores diferentes (HILL et al., 2002).

Como os óleos essenciais já vêm sendo utilizados na indústria de alimentos e seu efeito antibacteriano foi comprovado, a atual preocupação é a possibilidade de que os mesmos possam induzir mecanismos de adaptação nos microrganismos, se usados em doses subletais como conservantes e sanificantes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta adaptativa e a adaptação cruzada de *Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* a concentrações subletais dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), aos compostos majoritários eugenol e timol e ao desinfetante ácido peracético.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Adaptação e adaptação cruzada das bactérias a agentes antimicrobianos

Pode-se inferir que a resistência antimicrobiana é resultado de complexa interação entre os agentes antimicrobianos, microrganismos e meio ambiente. Assim, a versatilidade microbiana de se adequar às condições impostas representa um mecanismo de defesa (FIOCRUZ, 2005).

A resistência das bactérias aos antimicrobianos tem sido atribuída a mecanismos herdados e não herdados (LEVIN; ROZEN, 2006), que estão diretamente ligados à espécie bacteriana e ao estado fisiológico (LEVIN, 2004).

Vários estudos mostram que o uso de determinados sanificantes promovem pressão seletiva e contribuem para o surgimento de microrganismos resistentes a eles (LANGSRUD et al., 2003). Após a exposição regular aos sanificantes, bactérias Gram-positivas apresentam tolerância a estes compostos químicos. Estudos revelaram que bactérias de mesmo gênero e espécie têm diferentes graus de sensibilidade ao mesmo desinfetante. Além disso, desinfetante com formulações químicas similares, porém não idênticas, têm eficácia diferente contra as mesmas bactérias (SANDER et al., 2002). Assim, é possível que a resistência dos microrganismos em biofilme a sanificantes também possa ser consequência da exposição prolongada a doses subletais destes compostos (DAVIDSON; HARRISON, 2002).

Apesar da base da resistência bacteriana a antibióticos ser bastante conhecida, a resistência a sanificantes e conservantes de alimentos ainda é pouco estudada. Os mecanismos bioquímicos exatos de adaptação e de resistência permanecem largamente desconhecidos (LEVIN, 2004; BRAOUDAKI; HILTON, 2005; RUSSEL, 2003).

A preocupação com a produção de alimentos mais seguros e com o aumento da vida útil dos produtos tem levado ao uso mais frequente da sanificação química (LANGSRUD et al., 2003). Assim, se os agentes antimicrobianos e sanificantes têm como função controlar patógenos de origem alimentar, os fabricantes de alimentos devem saber mais sobre o potencial de desenvolvimento de resistência dos microrganismos alvos (DAVIDSON; HARRISON, 2002).

Resistência cruzada pode ocorrer quando diferentes agentes antimicrobianos têm o mesmo alvo na célula, atingem rota comum de acesso aos respectivos alvos ou iniciam uma via comum para a morte celular, ou seja, o mecanismo de resistência é o mesmo para mais de um agente antibacteriano (CHAPMAN, 2003). De acordo com Landau e Shapira (2012), evidências moleculares e fisiológicas apontam que bactérias patogênicas de origem alimentar podem se adaptar a estresses subletais e, como consequência, tornando-se mais resistentes em níveis letais do estresse ou proteção cruzada contra outros estressores.

2.2 Óleos essenciais

Em razão do aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, existe a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas (LIMA et al., 2006). Os óleos essenciais e seus compostos majoritários estão entre os produtos naturais de grande interesse científico, devido à possibilidade de empregá-los como agentes antimicrobianos, pois constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos (MICHELIN et al., 2005).

Os óleos essenciais são formados a partir de vias metabólicas secundárias e podem ser definidos como misturas complexas de substâncias

voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, que ocorrem em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas. Podem ser estocados nas flores, folhas, casca do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes, podendo variar na sua composição de acordo com a localização em uma mesma espécie (SIMÕES; SPITZER, 2004).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato, originando os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Exemplos de compostos aromáticos originados do metabolismo secundário são os fenilpropanoides, que derivam do ácido cinâmico, originado da fenilalanina a partir da ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) e apresentam uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligados ao anel aromático (Figura 1) (SANTOS, 2004).

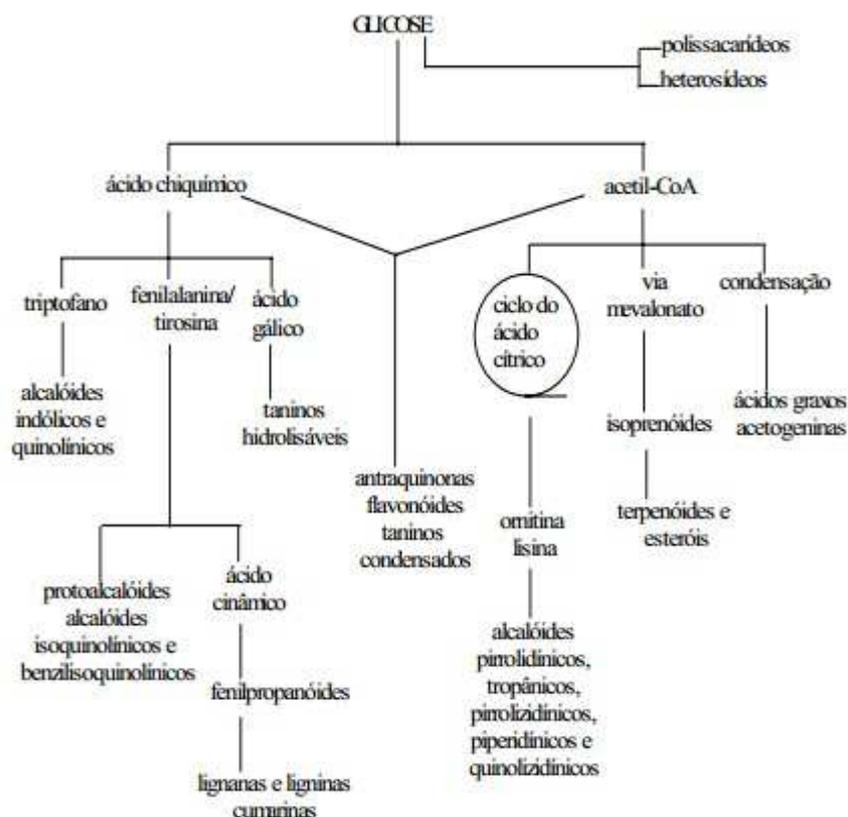
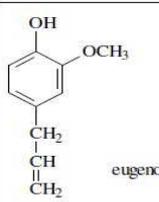
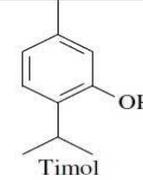
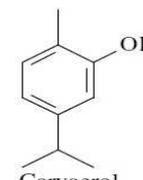


Figura 1 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários
Fonte: SANTOS, 2004

Na natureza, os óleos essenciais exercem importante papel na proteção das plantas tendo ação antibacteriana, antiviral, antifúngica, inseticida e também contra herbívoros. Podem agir, também, atraindo insetos para favorecer a dispersão de pólenes e sementes ou repelir aqueles indesejáveis. Pelas propriedades apresentadas na natureza têm sido amplamente aplicados. Aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes, especialmente nas indústrias farmacêutica, agrônômica, alimentícia, sanitária, de cosméticos e de perfumaria (BAKKALI et al., 2008).

Os principais constituintes químicos dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* estão relacionados no Quadro 1.

Figura 2 Constituintes químicos dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum*

Condimento	Nome científico	Principal constituinte do óleo essencial	Estruturas
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i>	2-metoxi-4-(2-propenil) fenol (eugenol)	 eugenol
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	5-metil-2-(1-metiletil) fenol(timol); 2-metil-5-(1-metiletil) fenol (carvacrol)	 Timol  Carvacrol

Fonte: Adaptado de Parry (1962)

2.2.1 Mecanismo de ação dos óleos essenciais

O mecanismo de ação dos óleos essenciais nas células bacterianas (Figura 2) são danos estruturais e funcionais à membrana citoplasmática (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994). Como são tipicamente lipofílicos, os óleos essenciais se acumulam na bicamada lipídica da membrana citoplasmática,

conferindo característica de permeabilidade (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994; BAKKALI et al., 2008). A permeabilidade das membranas celulares é dependente da sua composição e da hidrofobicidade dos solutos que a atravessam (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995), de maneira que a resistência bacteriana a óleos essenciais parece estar relacionada à habilidade de partição dos componentes dos mesmos na fase lipídica da membrana (LAMBERT et al., 2001).

Em bactérias, a permeabilização da membrana citoplasmática está associada à dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do *pool* de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, à perda de metabólitos e íons, como potássio e fosfato (LAMBERT et al., 2001; BAKKALI et al., 2008). Desta forma, danos estruturais à membrana citoplasmática levam ao comprometimento de suas funções como barreira seletiva e de ação enzimática e geração de energia (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994).

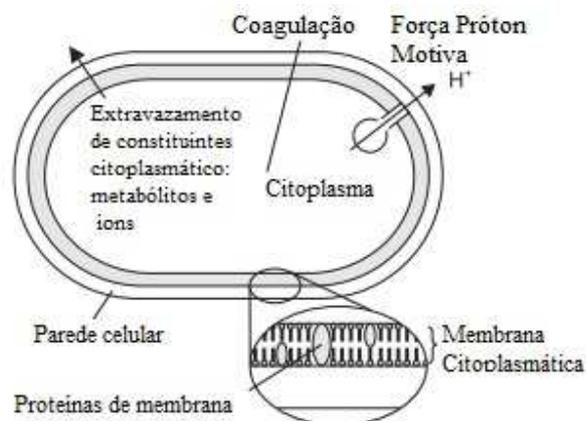


Figura 3 Mecanismo de ação dos óleos essenciais
Fonte: BURT, 2004

2.2.2 *Origanum vulgare* (Orégano)

A espécie *Origanum vulgare* é uma planta perene, aromática e condimentar pertencente à família Lamiaceae e conhecida como orégano, manjerona-silvestre ou manjerona-rasteira. É uma planta herbácea, rasteira ou decumbente (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997). Sua altura pode oscilar entre 25 e 80 cm; o caule é ereto, às vezes com uma coloração pardo-avermelhada; forma touceiras e possui rizoma rasteiro, escuro e dele partem raízes fibrosas. As folhas são pecioladas, inteiras, opostas em ângulo reto, ovais e pontiagudas (TESKE; TRENTINI, 1997). O comprimento das folhas é de 1 a 5 cm; suas flores possuem cores diversas e um comprimento de 5 a 8 mm; o fruto é tetraquênio, sendo cada uma das partes ovoide e lisa. É originária da Europa e Ásia, vegeta espontaneamente em solos pedregosos e prados da Europa e do sul da Rússia. É nativo, no México e certas regiões da América do Sul. Preferem regiões de clima temperado e solos bem férteis de natureza calcária, permeáveis, secos, que recebam bastante luz solar (VON HERTWING, 1991). O orégano emana um perfume fresco, intenso, herbáceo, sendo utilizado para fins aromáticos e condimentares. Seu óleo essencial é considerado como potente bactericida e fungicida reconhecido cientificamente.

Silva Júnior e Verona (1997), pesquisando os extratos da planta de orégano, verificaram a presença de sabineno, cis-ocimeno, p-cimeno e cariofileno. Esses foram responsáveis pelas atividades antioxidantes, expectorantes, digestivas e anti-inflamatórias. Lee, Cheng e Chang (2005) encontraram no óleo essencial das folhas a presença dos componentes majoritários timol e carvacrol, que se mostraram eficientes como antioxidantes, tanto que essa propriedade foi comparada à conhecida atividade da vitamina E e BHT.

Vários estudos têm focado sobre as propriedades biológicas do óleo essencial de *Origanum vulgare* e seus principais constituintes (SOUZA et al., 2007; BARROS et al., 2012). *O. vulgare*, vulgarmente conhecido como orégano, possui muitas propriedades terapêuticas (por exemplo diaforética, anti-inflamatório, anti-séptico, carminativo e antiespasmódico) que são utilizados na medicina nativa por muito tempo. O óleo essencial tem apresentado resultados interessantes na inibição do crescimento de bactérias, fungos e síntese de metabólitos microbianos (BAYDAR et al., 2004; NOSTRO et al., 2004)

2.2.3 *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia)

A árvore produtora de *Syzygium aromaticum*, vulgarmente conhecida como cravo-da-índia, da família Myrtaceae, é endêmica nas Molucas do Norte (Arquipélago de Molucas, Indonésia), tendo sido disseminada pelos alemães durante a colonização pelas outras ilhas do arquipélago, assim como para outros países. Atualmente, Zanzibar e Madagascar são os principais produtores desta espécie, seguidos pela Indonésia (MAZZAFERA, 2003).

No Brasil, praticamente apenas na Bahia, na região do Baixo Sul (Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha) esta especiaria é produzida na forma comercial (FRAIFE-FILHO; CÉSAR; RAMOS, 2005).

É muito utilizado também como condimento na culinária, devido ao seu marcante aroma e sabor, conferido por um composto fenólico volátil, o eugenol. Nas folhas, ele chega a representar aproximadamente 95% do óleo extraído (RAINA et al., 2001).

O cravo é conhecido por ser uma planta medicinal, utilizado como expectorante, antiemético, estimulante, antiflatulento e para o tratamento da dispepsia. É também usado como um anódino e antisséptico em odontologia. O óleo extraído do cravo contém propriedades anti-helmínticas, analgésicas,

antibacterianas, antifúngicas e anticarcinogênicas (ZHENG; KENNEY; LAM, 1992).

2.3 Compostos majoritários

2.3.1 Timol

Os principais compostos ativos dos óleos essenciais são bem conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana contra os microrganismos contaminantes de alimentos (DI PASQUA et al., 2006).

Neste sentido, o timol (Figura 1) tem sido amplamente estudado devido ao seu efeito como conservante em alimentos, sendo efetivo contra os agentes patogênicos e microrganismos deterioradores (DI PASQUA et al., 2007). Estudos enfatizam a efetividade antimicrobiana do timol, a qual contribui para aumentar a vida útil de alguns alimentos (MASTROMATTEO et al., 2010).

Este composto antibacteriano causa ruptura da membrana celular, inibindo a atividade da ATPase, liberando o ATP intracelular e outros constituintes dos microrganismos (BURT, 2004).

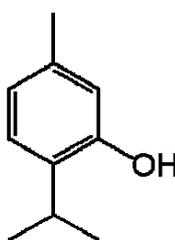


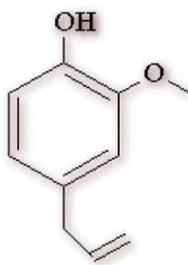
Figura 4 Estrutura Molecular do Timol

2.3.2 Eugenol

Eugenol (Figura 2) é um composto fenólico volátil e é o principal constituinte do óleo extraído do cravo-da-índia (MAZZAFERA, 2003), é um

derivado fenilpropanoide, sendo quimicamente designado como 4-alil-2-metóxi-fenol ou 2-metoxi-4-(2-propenil-fenol), conhecido comumente como essência de cravo (ESCOBAR, 2002). Apresenta baixa solubilidade em água e é completamente solúvel em clorofórmio, álcool etílico, gordura e éter. Por ser lipofílico é rapidamente absorvido (ESCOBAR, 2002) e é capaz de penetrar as membranas biológicas e atingir alvos intracelulares como as mitocôndrias, onde inibe a oxidação do NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida), diminuindo os níveis de ATP (USTA et al, 2002).

Tabela 1



ESTRUTURA PLANA

Figura 5 Estrutura Molecular do Eugenol

2.4 Ácido peracético

O ácido peracético, também chamado de peróxido de ácido acético ou ácido peroxiacético é um agente sanificante que tem sido utilizado com bastante sucesso. É obtido pela reação do ácido acético ou anidrido acético com o peróxido de hidrogênio (BLOCK, 1991).

Trata-se de excelente sanificante por ser capaz de promover oxidação dos radicais livres, tendo como alvo típico nas células microbianas (Figura 3), enzimas e proteínas do grupo tiol, causando, assim, inibição metabólica (DENYER; STEWART, 1998). Embora sua ação biocida seja influenciada pela

concentração, temperatura e microrganismo alvo, aplicações em baixas concentrações têm se mostrado eficazes (NASCIMENTO et al., 2003).

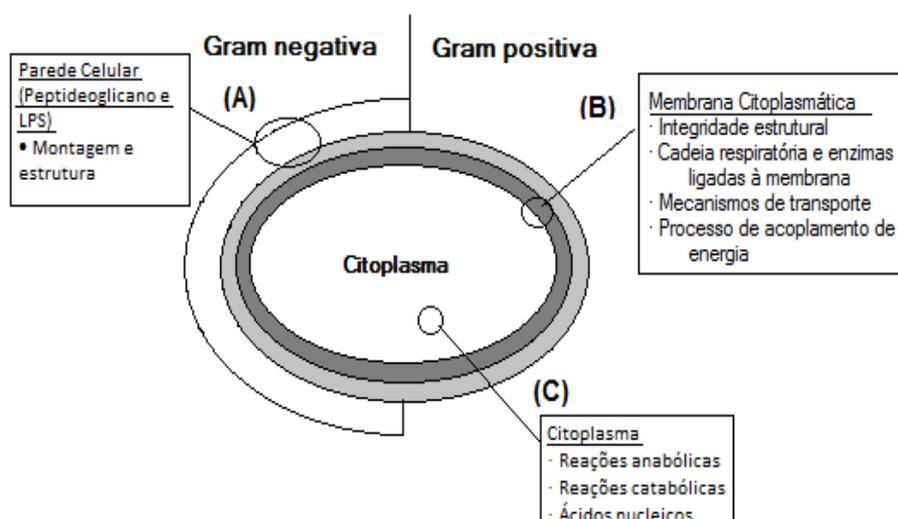


Figura 6 Célula bacteriana vegetativa gram-negativa e gram-positiva, mostrando os três principais alvos de agentes biocidas: (A) parede celular, (B) membrana citoplasmática e (C) citoplasma. (Figura adaptada de Denyer e Stewart, 1998).

Neste sentido, o ácido peracético é utilizado na indústria de alimentos por ser eficaz contra uma gama de microrganismos, não alterar o sabor e odor dos alimentos e não oferecer risco de toxicidade, por se decompor em resíduo seguro (ácido acético e peróxido de hidrogênio), o que lhe permite ser utilizado em aplicações que não tenham enxague (BLOCK, 1991).

2.5 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens é caracterizado como bastonete anaeróbio, Gram-positivo, formador de esporo oval-subterminal, encapsulado e imóvel. Para o cultivo, a bactéria requer pH ótimo de crescimento de 7,2 com mínimo entre 5,5 e 5,8 e máximo entre 8,8 e 9,0. São necessários 13 aminoácidos

essenciais para seu crescimento; a atividade de água está compreendida na faixa entre 0,93 a 0,97. Em concentrações de cloreto de sódio a 6% não há multiplicação (CATO; GEORGE; FINEGOLD, 1986).

Clostridium perfringens é uma bactéria sulfito redutora, fermentadora de lactose, reduz o nitrato e hidroliza a gelatina. Seu crescimento é estimulado pela presença de carboidrato fermentável e inibido por 20% de bile (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

Apesar de ser classificado como microrganismo anaeróbio, *Clostridium perfringens* pode sobreviver e crescer em presença de oxigênio, sendo, portanto, anaeróbio aerotolerante, formando esporos resistentes por diferenciação da célula bacteriana vegetativa que exigem maior resistência e baixo metabolismo da bactéria. Em geral, na forma esporulada, os clostrídios podem sobreviver às condições extremas como variações de temperaturas, dessecação, acidez do meio, radiação e agentes químicos (CATO; GEORGE; FINEGOLD, 1986).

O aumento de alimentos prontos refrigerados fornece ambiente adequado para o agente patogênico oportunista *Clostridium perfringens*. O microrganismo tem capacidade de crescer entre 12-50°C, com crescimento lento na temperatura de 20°C e faixa ótima de crescimento de 43 - 45°C, podendo ser encontrado viável em alimentos, água e ar. Sobrevivência em condições extremas é fator de diferenciação das células vegetativas desse microrganismo (NOVAK; JUNEJA, 2002).

A toxinfecção alimentar causada por *C. perfringens* tipo A é uma das mais comuns no segmento industrializado (restaurantes, hospitais e asilos). A dose infecciosa para a ocorrência da doença é cerca de 10^7 - 10^9 células. O lento resfriamento após cocção permite que os endósporos germinem desde que haja condições anaeróbicas. Uma vez germinados em temperatura ambiente as células vegetativas aumentam em número (BANERJEE; BHUNIA, 2010). A produção de enterotoxina do *C. perfringens* (CPE) é associada com a formação

de endósporos *in vivo* estimulada pelas condições ácidas do estômago e pelos sais biliares do intestino. Durante o processo de esporulação, as células produzem enterotoxina CPE, que é acumulada no citoplasma da célula e liberada no organismo, juntamente com o endósporo maduro (BRYNESTAD; GRANUM, 2002).

2.6 Características de Salmonella enterica Enteritidis, Staphylococcus aureus

A contaminação de superfícies e alimentos por microrganismos deterioradores e patogênicos é preocupação na indústria de alimentos. As características fisiológicas dos microrganismos podem conferir resistência aos agentes antimicrobianos, como, por exemplo, aos sanificantes usados no procedimento de higienização ou nos antimicrobianos utilizados na conservação dos alimentos.

2.6.1 Salmonella enterica Enteritidis

Salmonella é uma bactéria em forma de bastonete curto da família Enterobacteriaceae, aeróbia facultativa, Gram-negativa, não produtora de esporos. A maioria é móvel, com flagelos peritríquios, à exceção da *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Esse gênero fermenta a glicose, produzindo ácido e gás, porém é incapaz de fermentar a lactose e a sacarose (FORSYTHE, 2002), além de ser capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono (FRANCO; LANDGRAF, 1996). A temperatura ótima de crescimento é de aproximadamente 38°C e a mínima de 5°C. Como não formam esporos são relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60°C, por 15 a 20 minutos (FORSYTHE, 2002).

Salmonella enterica é o agente etiológico de doenças transmitidas por alimentos em aves e produtos avícolas, sendo essas as principais fontes de infecção no ser humano, sendo os sorovares *S. Typhimurium* e *Enteritidis* os mais comuns associados com a infecção humana (GONZÁLEZ-GIL et al., 2012), ambos classificados atualmente como re-emergentes.

O pH ótimo para a multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. Dependendo da natureza do ácido utilizado para acidificação, o pH mínimo pode subir para 5,5 e concentrações de sal superiores a 9% não são toleradas por essa bactéria (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Em relação à umidade disponível, a inibição do crescimento foi observada em valores de atividade de água (a_w) abaixo de 0,94 em meios com pH neutro. Com a_w maiores, os valores de pH podem ser menores (JAY, 2005).

Salmonella, assim como outros microrganismos enteropatogênicos, possui surpreendente capacidade de sobreviver em condições rigorosas encontradas no ambiente natural e no organismo hospedeiro. A capacidade de adaptação e sobrevivência a estes estresses está diretamente relacionada à habilidade de alguns microrganismos em causar doenças (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001).

As bactérias do gênero *Salmonella* caracterizam-se por provocar contaminações devido às deficiências de saneamento básico e às más condições higiênico-sanitárias da maioria da população, aliadas ao precário controle de qualidade de algumas indústrias alimentícias e de abatedouros de aves (TUNON et al., 2008).

As infecções por *Salmonella* podem ser graves, especialmente em crianças, idosos ou pessoas imunodeprimidas, com dose infectante possível para as pessoas saudáveis de 10^5 a 10^7 UFC (SANTOS et al., 2001).

Pesquisas realizadas visando detectar *Salmonella* spp. em alimentos no Brasil indicam sua presença em alimentos com alto teor de umidade e proteínas como molhos de salada, maionese, linguiças, ovos (CHAO et al., 2007) e frangos (SANTOS et al., 2001).

Apesar das melhorias nas condições higiênico-sanitárias no processamento de alimentos, surtos de salmoneloses originados pelo consumo de alimentos contaminados, ainda ocorrem e constituem sério problema de saúde pública (JAY, 2005).

2.6.2 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus é muito comum em alimentos de grande manipulação. Essa espécie do gênero *Staphylococcus* que se apresenta em forma de cocos Gram-positivos não esporulados, catalase e coagulase positivos se dividem em mais de um plano para formar racimos tridimensionais de células denominados como “cachos de uva” (PERREIRA et al., 2000).

Embora sejam mesofílicas, algumas linhagens de *S. aureus* podem crescer a temperaturas de até 6,7°C. Em geral, o crescimento ocorre na faixa de 7°C a 47,8°C, as enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C, contudo a temperatura ótima está entre 40°C e 45°C. Embora cresça em meios de cultura sem NaCl, pode multiplicar-se em concentrações de 7 a 10%, e algumas linhagens podem crescer em até 20% de sal. Considerando o pH, o *S. aureus* pode se multiplicar entre 4,0 e 9,8, mas sua faixa ótima está entre 6,0 e 7,0. Em relação à a_w , os estafilococos são os únicos organismos capazes de crescer em valores menores que outras bactérias não halofílicas. O crescimento foi demonstrado com valores abaixo de 0,83 sob condições ideais, embora 0,86 seja normalmente reconhecido como valor mínimo de a_w para crescimento (JAY, 2005).

O crescimento de *S. aureus* em alimentos representa potencial perigo à saúde pública porque muitas cepas produzem uma ou a maioria das enterotoxinas (SES) que causam toxiose alimentar, se ingerida (AKINEDEN et al., 2008). A toxiose estafilocócica é caracterizada por náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia e dores de cabeça. O início dos sintomas é normalmente rápido, dependendo da suscetibilidade individual à toxina, da quantidade de alimentos contaminados ingeridos e da quantidade de toxina no alimento ingerido (FORSYTHE, 2002).

Desde que a toxiose estafilocócica de origem alimentar foi estabelecida como uma das mais comuns doenças bacterianas transmitidas pelos alimentos, as estratégias de controle de *S. Aureus* têm ganhado importância devido aos problemas causados no setor de alimentos, problemas que vêm sendo causados no setor de alimentos (SOUZA et al., 2009). Carnes e derivados são considerados como um dos veículos para a transmissão de *S. aureus* (BLAIOTTA et al., 2004).

O contato com superfícies inadequadamente higienizadas dos equipamentos de produção ou a exposição do produto alimentício podem promover a contaminação no produto por *S. aureus*. A presença deste microorganismo em linhas de processamento de alimentos tem sido considerada um indicativo de condições precárias de higiene e manipulação inadequada da matéria-prima ou do produto final (NOTERMANS; WERMANS, 1991).

REFERÊNCIAS

- AKINEDEN, Ö.; HASSAN, A. A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **Food Microbiology**, v. 124, p. 211–216, 2008.
- AUDIA, J. P.; WEBB, C. C.; FOSTER, J. W. Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 97-106, 2001.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BANERJEE, P.; BHUNIA, A. K. Cell-based biosensor for rapid screening of pathogens and toxins. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 99-106, 2010.
- BARROS, J. C.; CONCEIÇÃO, M. L.; GOMES NETO, N. J.; COSTA, A. C. V.; SOUZA, E. L. Combination of *Origanum vulgare* L. essential oil and lactic acid to inhibit *Staphylococcus aureus* in meat broth and meat model. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1120-1127, 2012.
- BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2004.
- BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 719–730, 2004.
- BLOCK, S. S. Peroxygen compounds. In: BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 4th ed. Philadelphia: Lea Febiger, p. 167- 181, 1991.

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

BRYNESTAD, S.; GRANUM, P. E. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 195-202, Apr. 2002.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n.3, p. 223–253, 2004.

CATO, E. P.; GEORGE, W. L.; FINEGOLD, S. M. **Genus *Clostridium***. In: Sneath, P. (ed). Bergeys manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams e Wilkins. v.2, p.1179-1182, 1986.

CHAO, M.R.; HSIEN, C.H.; YEH, C.M.; CHOU, S.J.; CHU, C.; SU, Y.C.; YU, C.Y. Assessing the prevalence of *Salmonella enterica* in poultry hatcheries by using hatched eggshell membranes. **Poultry Science**, v. 86, n. 8, p. 1651-1655, 2007.

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

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

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, 2006.

DI PASQUA, R.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, 2007.

DENYER, S. P.; STEWART, G. S. A. B. Mechanisms of action of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, n. 3, p. 261-268, 1998.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: Propriedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y esventajas de su uso. **Revista Cubana Estomatol**, v. 39, n. 2, p. 139-156, 2002.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424 p.

FRAIFE-FILHO, G. A.; CÉSAR, J. O.; RAMOS, J. V. Cravo-da-india. 2005. Radar Técnico. CEPLAC. Disponível em <http://www.ceplac.gov.br/radar.htm>. Acesso em março de 2012.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, 182 p.

FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ (FIOCRUZ/LRNCEB/LAB). Manual de Procedimentos para Determinação da Suscetibilidade Antimicrobiana em Enterobactérias. 2005. (Um CD ROOM).

GONZÁLEZ-GIL, F.; LE BOLLOCH, A.; PENDLETON, S.; ZHANG, N.; WALLIS, A; HANNING, I. Expression of *hilA* in response to mild acid stress in *Salmonella enterica* is serovar and strain dependent. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 5, p. 292-297, 2012.

HILL, C.; COTTER, P. D.; SLEATOR, R. D.; GAHAN, C. G. M. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 273-283, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**, 6ª Edição, Artmed, 2005, 711p.

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

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

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

LEE, H. C.; CHENG, S. S.; CHANG, S. T. Antifungal property of the essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum* leaf against tree pathogenic fungi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 12, p. 2047-2053, 2005.

LEVIN, B. R. Noninherited resistance to antibiotics. **Science**, Washington, v. 305, p.1578–1579, 2004.

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

MASTROMATTEO, M.; DANZA, A.; CONTE, A.; MURATORE, G.; DEL NOBILE, M. A. Shelf life of ready to use peeled shrimps as affected by thymol essential oil and modified atmosphere packaging. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 2, p. 250–256, 2010.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-india e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo: v. 26, n. 2, p. 231-238, jun. 2003.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, João Pessoa: v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M. P. L. M.; SILVA, K. C. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n.1, p. 63-68, jan./jun. 2003.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; SUDANO, A. R.; ALONZO, V. Susceptibility of

methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and

thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

NOTERMANS, S.; WERNARS, K. Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam: v. 12, n. 1, p. 91-102, Jan. 1991.

NOVAK, J. S.; JUNEJA, V. K. *Clostridium perfringens*: hazards in new generation foods. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, p. 127-132, 2002.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

PARRY, J. W. **Spices**: morfology, histology, chemetry. New York: Chemical, v.2, 1962, 183 p.

PERREIRA, M. L.; PERREIRA, J. L.; SERRANO, A. M.; BERGDOLL, M. S. Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, São Paulo: v. 44, n 68/69, p 32-41, jan./fev. 2000.

RAINA, V. K.; SRIVASTAVA, S. K.; AGGARWAL, K. K.; SYAMASUNDAR, K. V.; KUMAR, S. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour and fragrance journal**, v. 16, n. 5, p. 334-336, 2001.

RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the response of microorganisms to biocides. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, London: v. 52, p. 750–763, 2003.

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

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

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.;

MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre: Ed. da UFSC, v. 5; p. 467-495, 2004.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M. de; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, Mar. 1994.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, June 1995.

SILVA JÚNIOR, A. A.; VERONA, M. L. F. **Plantas medicinais e aromáticas**. Itajaí, SC: Ministério de Meio Ambiente, Fundo Nacional do Meio Ambiente, 1997, 456 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológicas de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007, 536p.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da UFSC, v. 5, p. 467-495, 2004.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

SOUZA, E. L.; BARROS, J. C.; CONCEIÇÃO, M. L.; GOMES NETO, N. J.; COSTA, A.C.V. Combined application of *Origanum vulgare* l. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 40, p. 387-393, 2009.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium Compêndio de Fitoterapia**. 3.ed. Curitiba, 1997, 317 p.

TUNON, G. I. L.; NUNES, R. N.; SILVA, T. M.; CALASANS, M. W. M. Resistência antimicrobiana de *Salmonella sp isolada de carne de frango resfriada* comercializada em Aracaju, Sergipe. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 52, p. 4-6, 2008.

USTA, J; KREYDIYYEH, S; BAJAKIAN, K; NAKKASH-CHMAISSE, H. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and

respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 935-940, 2002.

VON HERTWING, I. F. **Plantas aromáticas e medicinais**: plantio, colheita, secagem, comercialização. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991, 414 p.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of natural products**, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992.

**CAPÍTULO 2 Adaptação e adaptação cruzada de *Clostridium perfringens*
a diferentes fatores**

RESUMO

A preocupação com a produção de alimentos mais seguros e a necessidade do aumento da vida útil dos produtos tem levado ao uso constante de diferentes agentes antimicrobianos. Estudos mostram que o uso de determinados sanificantes, principalmente em concentrações inadequadas, promovem pressão seletiva e contribuem para o surgimento de microrganismos resistentes a eles, ativando seus mecanismos de resposta adaptativa ao estresse e fazendo com que sobrevivam em condições ambientais antes limitantes ao seu crescimento. Este trabalho teve como objetivo avaliar a adaptação e a adaptação cruzada de *Clostridium perfringens* a concentrações subletais dos óleos essenciais (OE) de *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), aos compostos majoritários eugenol e timol e ao ácido peracético. As concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos antimicrobianos e a influência da temperatura de cultivo sobre elas foram determinadas empregando-se a técnica de diluição em caldo, utilizando-se caldo Brain Heart Infusion (BHI). As temperaturas empregadas foram: 20°C, 30°C e 37°C, o tempo de incubação foi de 24 horas. Os antimicrobianos foram homogeneizados em caldo BHI contendo 0,5% (v/v) de Tween 80. As concentrações testadas foram de 0,00; 0,05; 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25% (v/v). Após incubação, alíquotas das culturas foram retiradas e plaqueadas em ágar BHI adicionado de 0,5% de glicose, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A CMB foi determinada baseando-se na ausência de crescimento nas placas. Para avaliação da resposta adaptativa, após ativação da cultura, alíquotas foram transferidas para tubos contendo concentrações subletais (1/4 CMI e 1/8 CMI) dos antimicrobianos e cultivados a 37°C por seis horas. Após esse período as células foram recuperadas e as CMB foram novamente determinadas. O estudo da adaptação cruzada foi realizado cultivando *Clostridium perfringens* em presença de concentrações subletais de eugenol, timol e ácido peracético a 37°C por seis horas. Após adaptação, as células recuperadas foram utilizadas para determinação das CMB dos compostos aos quais elas não foram previamente expostas, em meio contendo diferentes pH (6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0) e a temperatura de cultivo de 20°C. Não houve influência da temperatura de cultivo sobre a CMB dos óleos essenciais de cravo e orégano e do composto timol, cujas CMB foram de 6,25; 1,56 e 0,78%. Entretanto, a 30°C as CMB do eugenol e ácido peracético foram o dobro (6,25%) e a metade (0,06%), respectivamente, daquelas obtidas nas outras temperaturas. Após exposição às concentrações subletais dos antimicrobianos a 37°C, *C. perfringens* se mostrou mais sensível ao timol e ao eugenol, não crescendo em meio contendo metade da CMB desses antimicrobianos. Entretanto, observou-se adaptação ao OE de cravo e ao ácido peracético, uma vez que nas concentrações de 11,25% e 0,24%, respectivamente, *C. perfringens* cresceu. Na temperatura de cultivo de 20°C

houve adaptação cruzada de *C. perfringens* a todos os antimicrobianos testados. Apenas as células expostas a 1/8 da CMB de eugenol foram capazes de se adaptar ao pH maior que o mínimo de crescimento. *C. perfringens* apresentou capacidade de adaptação e adaptação cruzada a alguns fatores de estresse estudados, fato que mostra o risco de ocorrência de toxinfecções alimentares.

Palavras-chave: Resistência bacteriana. Timol. Eugenol. Ácido peracético

ABSTRACT

The concern with the production of safer food and the need to increase the shelf life of products has led to the constant use of different antimicrobial agents. Studies show that the use of certain sanitizers, especially in inadequate concentrations, promote selective pressure and contribute to the emergence of microorganisms resistant to them, activating the mechanisms of adaptive response to stress and causing them to survive in environmental conditions that were limiting to their growth. This work aimed to evaluate the adaptation and cross-adaptation of *Clostridium perfringens* to sublethal concentrations of essential oils (EO) of *Origanum vulgare* (oregano) and *Syzygium aromaticum* (clove), to the major compounds eugenol and thymol and to peracetic acid. The minimum bactericidal concentrations (MBC) and the antimicrobial effect of the temperature cultivation on them were determined employing the broth dilution technique, using Brain Heart Infusion broth (BHI). The temperatures used were 20 °C, 30 °C and 37 °C, the incubation time was 24 hours. The antimicrobial agents were homogenized in BHI broth containing 0.5% (v/v) Tween 80. The tested concentrations were 0.00%; 0.05%; 0.09%; 0.19%; 0.39%; 0.78%; 1.56, 3.12 and 6.25% (v/v). After incubation, aliquots of the cultures were taken and plated on BHI agar, supplemented with 0.5% glucose, plates were incubated at 37 °C for 24 hours. The MBC was determined based on the lack of growth on the plates. To evaluate the adaptive response after activation of culture, aliquots were transferred to tubes containing sublethal concentrations (1/4 MIC and 1/8 MIC) of antimicrobial agents and cultured at 37 °C for 6 hours. After this period, the cells were recovered and MBC was again determined again. The study of cross-adaptation was conducted by cultivating *Clostridium perfringens* in the presence of sublethal concentrations of eugenol, thymol and peracetic acid at 37 °C for 6h. After adjustment, the recovered cells were used to determine the MBC of the compounds to which they have not previously been exposed to in media containing different pH (6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0) and cultivation temperature of 20 °C. There was no influence of cultivation temperature on the MBC of the essential oils of clove and oregano and thymol compound whose MBC were 6.25; 1.56 and 0.78%. However at 30 °C, the MBC of eugenol and peracetic acid were double (6.25%) and half (0.06%), respectively, than those obtained in the other temperatures. After exposure to sublethal concentrations of the antimicrobial at 37 °C, *C. perfringens* was more sensitive to the thymol and eugenol, not growing in media containing these antibiotics half of the MBC. However, there was adaptation to EO and to peracetic acid, once at concentrations of 0.24% and 11.25%, respectively, *C. perfringens* grew. In cultivation temperature of 20 °C there was cross adaptation of *C. perfringens* to all antibiotics tested. Only exposed to 1/8 cells of eugenol MBC were able to adapt to greater pH than the minimal growth one. *C. perfringens* showed

capacity of adaptation and cross-adaptation to some stress factors studied, a fact that shows the risk of food poisoning.

Keywords: Bacterial resistance. Thymol. Eugenol. Peracetic acid.

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a produção de alimentos mais seguros e com o aumento da vida útil dos produtos tem levado ao uso mais frequente de sanificantes químicos (LANGSRUD et al., 2003). Assim, se os agentes antimicrobianos e sanificantes têm como função controlar patógenos de origem alimentar, os fabricantes de alimentos devem saber mais sobre o potencial de desenvolvimento de resistência dos microrganismos alvos (DAVIDSON; HARRISON, 2003).

Estudos mostram que o uso frequente de sanificantes promove pressão seletiva e contribui para o surgimento de microrganismos resistentes a eles (LANGSRUD et al., 2003). Após a exposição regular aos sanificantes, bactérias Gram-positivas, apresentam tolerância a esses compostos químicos. Estudos revelaram que bactérias de mesmo gênero e espécie têm diferentes graus de sensibilidade ao mesmo desinfetante. Além disso, desinfetante com formulações químicas similares, porém não idênticas, têm eficácia diferente contra as mesmas bactérias (SANDER et al., 2002).

Em razão do aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, existe a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas (OLIVEIRA et al., 2006). Os óleos essenciais e seus compostos majoritários estão entre os produtos naturais de grande interesse científico, devido à possibilidade de empregá-los como agentes antimicrobianos, pois constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos (MICHELIN et al., 2005).

A toxinfecção alimentar causada por *Clostridium perfringens* tipo A é uma das mais comuns no segmento industrializado (restaurantes, hospitais e asilos), o aumento de alimentos prontos refrigerados proporciona ambiente adequado para o agente patogênico oportunista. O microrganismo tem

capacidade de crescer entre 12-50°C, com crescimento lento na temperatura de 20°C e faixa ótima de crescimento de 43-45°C, podendo ser encontrado viável em alimentos, água e ar (NOVAK; JUNEJA, 2002). A dose infecciosa para a ocorrência da doença é cerca de 10^7 - 10^9 células. Sobrevivência em condições extremas é fator de diferenciação das células vegetativas desse microrganismo. O lento resfriamento após cocção permite que os endósporos germinem desde que haja condições anaeróbicas. Uma vez germinados em temperatura ambiente as células vegetativas aumentam em número (BANERJEE; BHUNIA, 2010).

A resistência cruzada pode ocorrer quando diferentes agentes antimicrobianos têm o mesmo alvo na célula, atingem rota comum de acesso aos respectivos alvos ou iniciam uma via comum para a morte celular, ou seja, o mecanismo de resistência é o mesmo para mais de um agente antibacteriano (CHAPMAN, 2003). De acordo com Landau e Shapira (2012), evidências moleculares e fisiológicas apontam que bactérias patogênicas de origem alimentar podem se adaptar a estresses subletais, e como consequência, tornando-se mais resistentes em níveis letais do estresse ou proteção cruzada contra outros estressores.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta adaptativa e a adaptação cruzada de *Clostridium perfringens* a concentrações subletais dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), aos compostos majoritários eugenol e timol e ao desinfetante ácido peracético.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de execução do experimento

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

2.2 Antimicrobianos

Óleos essenciais (OEs) de *Syzygium aromaticum* e *Origanum vulgare* foram adquiridos da FERQUIMA[®] Indústria e Comércio Ltda., (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) e os compostos majoritários eugenol e timol adquiridos na Sigma-Aldrich[®]. O desinfetante ácido peracético utilizado foi o SANDET 286[®].

2.3 Microrganismo

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a cepa de *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 13124 pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

2.3.1 Padronização, estocagem e preparo dos inóculos

A cultura de *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 13124 foi reativada inoculando-se 10 μ L em tubos contendo 10 mL de Caldo *Clostridium*, suplementado com 0,5% (m/v) de glicose e incubados a 37°C por 24 horas em

condições anaeróbicas geradas em jarra de anaerobiose. Após a incubação foram retirados 10µL da cultura e transferidos para 100 mL de caldo BHI, suplementado com 0,5% de glicose, seguido de incubação a 37°C por 24 horas em condições anaeróbicas geradas pela adição de óleo mineral estéril.

A padronização do inóculo foi realizada por meio da elaboração de curva de crescimento; o desenvolvimento do microrganismo foi monitorado por espectrofotometria, D.O. 600 nm, e contagem direta em placas em Ágar BHI suplementado com 0,5% (m/v) de glicose, seguido de incubação a 37°C por 24 horas.

A cultura estoque foi armazenada em meio de congelamento (15 mL de glicerol; 0,5g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; 100 mL de água destilada; pH 7,2±2), em freezer a -80°C, durante o período de execução do experimento.

2.4 Influência da temperatura de cultivo de *Clostridium perfringens* sobre as concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia, timol, eugenol e ácido peracético

As concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais (OEs) de cravo-da-índia e orégano, eugenol, timol e do ácido peracético foram determinadas empregando-se o método de diluição em caldo descrito por Nccls, 2003. As temperaturas de incubação utilizadas foram 20, 30 e 37°C.

Tubos de ensaio contendo 6 mL de caldo BHI, suplementado com 0,5% (m/v) de glicose e acrescido 0,5% de Tween 80 foram adicionados de óleos essenciais e dos compostos majoritários, onde as seguintes concentrações foram preparadas: 0,00; 0,05; 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25 (v/v). Para o ácido peracético o meio não foi adicionado de Tween 80, sendo utilizadas as concentrações de: 0,00; 0,0039; 0,0078; 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5% (v/v).

A cada tubo foram adicionados 200 μ L de suspensão de inóculo padronizada. Os tubos foram incubados nas diferentes temperaturas por 24 horas em condições anaeróbicas geradas pela adição de óleo mineral. Após esse período, alíquotas foram plaqueadas em ágar BHI suplementado com 0,5% de glicose, empregando-se a técnica de sobrecamada e incubadas a 37°C por 24 horas. As menores concentrações que resultaram em completa inibição do crescimento bacteriano foram denominadas concentrações mínimas bactericidas (CMBs).

2.5 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório

A influência do pH no crescimento foi avaliada em tubos de ensaio, adicionados de 1mL de caldo BHI suplementado com 0,5% de glicose com pH ajustados com ácido clorídrico, ácido acético e ácido láctico em: 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0. Em cada tubo foram adicionados 100 μ L de cultura padronizada e incubados a 37°C por 24 horas em condições anaeróbicas geradas pela adição de óleo mineral estéril.

O pH mínimo inibitório foi definido como o menor valor capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. O pH mínimo de crescimento foi aquele imediatamente anterior ao pH mínimo inibitório.

2.6 Adaptação de *Clostridium perfringens* às concentrações subletais dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético

As células foram expostas a concentrações subletais dos OEs, compostos majoritários e ácido peracético. As doses subletais utilizadas foram equivalentes a 1/4 CMB e 1/8 CMB de cada óleo essencial, compostos majoritários e ácido peracético. Em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI suplementado com 0,5% de glicose e acrescido de 0,5% de Tween 80, foram adicionados os

antibacterianos nas concentrações subletais de 1/4 CMB e 1/8 CMB. Após homogeneização, o inóculo foi adicionado na concentração de 10^5 UFC mL⁻¹, onde foi estabelecido, através da absorbância obtida na curva de crescimento e os tubos foram incubados em anaerobiose pela adição de óleo mineral estéril a 37°C por seis horas.

2.7 Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético sobre as células adaptadas

Após exposição às doses subletais, alíquotas de 1 mL das culturas foram retiradas, centrifugadas (5000 x g/ 5 minutos), lavadas e ressuspensas em solução salina 0,9% (m/v) por três vezes. A suspensão foi padronizada em 10^8 UFC mL⁻¹ utilizando-se a escala de MacFarland. As células adaptadas foram expostas a diferentes concentrações dos óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano, dos compostos majoritários eugenol e timol e do ácido peracético (CMB/2; CMB; 1,2 x CMB; 1,4 x CMB; 1,6 x CMB; 1,8 x CMB; 2 x CMB). A técnica utilizada foi a de microdiluição em placas (OLIVEIRA et al., 2012). A absorbância das amostras foi lida a 620 nm em leitor de microplacas. As menores concentrações que resultaram em completa inibição do crescimento bacteriano após 24 horas de incubação a 37°C sob anaerobiose foram denominadas concentrações mínimas inibitórias das células expostas a doses subletais (CMB_{DS}).

O controle foi constituído de células não expostas às doses subletais (CMB_{NDS}).

2.8 Determinação da capacidade de adaptação cruzada de *Clostridium perfringens*

A capacidade de *C. perfringens* em desenvolver capacidade de adaptação cruzada foi avaliada empregando-se a pré-exposição da bactéria a concentrações subletais de eugenol, timol e/ou ácido peracético.

2.8.1 Compostos majoritários e ácido peracético

Células expostas às concentrações subletais de eugenol foram submetidas a diferentes concentrações de timol e ácido peracético; células expostas às concentrações subletais de timol foram submetidas a diferentes concentrações de eugenol e ácido peracético, e; células expostas às concentrações subletais de ácido peracético foram submetidas a diferentes concentrações de eugenol e timol. Foi utilizado o procedimento descrito no item 4.7.

2.8.2 pH

Células submetidas a concentrações subletais dos compostos eugenol e timol e do ácido peracético foram cultivadas em meio com diferentes valores de pH, foi utilizado o procedimento do item 4.5.

2.8.3 Temperatura

As células submetidas a concentrações subletais dos compostos eugenol e timol e do ácido peracético foram incubadas a 20°C de acordo com a metodologia utilizada no item 4.7.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência da temperatura de crescimento sobre as concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético

As concentrações mínimas bactericidas dos antimicrobianos sobre *C. perfringens* e a influência da temperatura sobre elas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 Influência da temperatura de cultivo de *Clostridium perfringens* sobre as concentrações mínimas bactericidas (%) dos óleos essenciais, timol, eugenol e ácido peracético

Antimicrobianos	Concentração Mínima Bactericida		
	20°C	30°C	37°C
Cravo	6,25	6,25	6,25
Orégano	1,56	1,56	1,56
Timol	0,78	0,78	0,78
Eugenol	3,12	6,25	3,12
Ácido Peracético	0,12	0,06	0,12

(Cravo) Óleo essencial de cravo. (Orégano) Óleo essencial de orégano. Os valores de CMB foram obtidos através da análise do plaqueamento. Devido à técnica utilizada, não foi possível obter os valores da CMI.

Os resultados mostraram que os óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano foram bactericidas em concentrações quatro vezes maiores que os seus respectivos compostos majoritários, eugenol e timol, na temperatura ótima de crescimento da bactéria. Segundo laudo fornecido pela empresa (FERQUIMA), o óleo essencial de cravo-da-índia possui 83% de eugenol e o óleo essencial de orégano possui 71% de carvacrol e 3% de timol, compostos isômeros cuja atividade antimicrobiana é semelhante. O óleo de cravo foi o agente antimicrobiano com o maior CMB, enquanto que o composto timol apresentou o menor CMB dentre os agentes estudados.

A temperatura de incubação influenciou na CMB do eugenol e do ácido peracético. A CMB do eugenol sobre *C. perfringens* quando incubado a 30°C foi maior quando comparada aos valores obtidos nas temperaturas de 20°C e 37°C, sendo esta ótima ao crescimento celular da bactéria.

Os danos causados pelo estresse térmico às células bacterianas resultam principalmente em quebra de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Esses eventos conduzem diretamente na desnaturação geral de proteínas e ácidos nucleicos. Como as bactérias não têm capacidade de controlar a sua temperatura intracelular, quanto maior a temperatura externa, maior serão os danos às células (MADIGAN et. al., 2010).

As CMBs dos óleos essenciais, timol, eugenol e ácido peracético sobre *C. perfringens* são mostradas na Tabela 2. Não houve influência da temperatura sobre as CMBs dos óleos de cravo (6,25%) e orégano (1,56%) e o timol (0,78%).

As temperaturas de incubação influenciaram nos efeitos bactericidas do eugenol e do ácido peracético, ambos na temperatura de 30°C. O eugenol apresentou a maior concentração estudada (6,25%) como CMB e o ácido peracético a menor (0,06%).

As CMBs dos OEs não diferiram entre as temperaturas de incubação. Neste sentido, para os microrganismos anaeróbios, os antimicrobianos podem ser utilizados junto à diminuição da temperatura, caracterizando os “obstáculos de leistner” já amplamente utilizado nas indústrias de processamento de alimentos (LEISTNER, 1992).

3.2 Determinação do pH mínimo inibitório e do mínimo de crescimento

A determinação do pH mínimo inibitório (pH_{MI}) e o mínimo de crescimento (pH_{MC}) dos ácidos orgânicos e inorgânicos, influenciaram de forma

diferente o crescimento celular da bactéria. A membrana citoplasmática das bactérias é relativamente impermeável aos íons H^+ e OH^- . Desta forma, em ambientes ácidos as células precisam evitar que os íons H^+ entrem, ou expeli-los numa velocidade maior que a de entrada, pois alguns compostos-chave intracelulares, como o DNA e o ATP, necessitam da neutralidade (JAY, 2005).

Os ácidos orgânicos, láctico e acético promoveram maior estresse sobre *C. perfringens* (Tabela 2) uma vez que houve crescimento somente a partir do pH 4,5. Esses resultados são esperados, pois ácidos orgânicos são considerados ácidos fracos de cadeia curta (C1-C7) (DIBNER; BUTTIN, 2002) o que resulta em ação antimicrobiana elevada, devido às suas características lipofílicas na forma não dissociada, onde o ácido permeia membrana celular do microrganismo, se dissociando no citoplasma e acidificando-o. Desta forma promove o abaixamento do pH intracelular, precipitação de proteínas, coagulação do citoplasma, inibição do transporte de nutrientes, etc.

Tabela 2 Determinação do pH mínimo inibitório (pH_{MI}) e o mínimo de crescimento (pH_{MC}) de *Clostridium perfringens* exposto a diferentes ácidos

Ácidos	pH_{MI}	pH_{MC}
Acético	4,0	4,5
Clorídrico	3,0	3,5
Lático	4,0	4,5

(pH_{MI}) pH mínimo inibitório. (pH_{MC}) pH mínimo de crescimento. Os valores de pH_{MI} e pH_{MC} foram obtidos através da análise de absorbância

A aplicação de estresse físico sobre os microrganismos é o método mais utilizado para induzir a inativação de células e promover a estabilidade dos alimentos. Contudo, sobre pressão ambiental constante, os microrganismos são capazes de desenvolver mecanismos fisiológicos e genéticos para sobreviverem, dentre elas de tolerar algumas condições físicas extremas como a diminuição do pH (BEALES, 2004). Isso mostra a importância de se estudar a influência dos

diferentes ácidos utilizados dentro da indústria de alimentos, para que não ocorra a sobrevivência de patógenos ou organismos de deterioração nos alimentos.

Como não houve diferença entre a ação dos ácidos fracos, o ácido láctico foi escolhido para a condução dos experimentos.

3.3 Adaptação de *Clostridium perfringens* às concentrações subletais dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético

As condições em que os microrganismos são expostos durante o processamento de alimentos pode levar ao desenvolvimento de respostas adaptativas e desenvolvimento de tolerância após a exposição a fatores subletais de estresse, capazes de provocar danos às células microbianas (LUZ et al., 2012).

Tabela 3 Adaptação de *Clostridium perfringens* aos óleos essenciais, eugenol, timol e ácido peracético

Estresse subletal	Resistência ao fator letal								
	1/4 CMB	0	0,5xCMB	CMB	1,2xCMB	1,4xCMB	1,6xCMB	1,8xCMB	2xCMB
AP	+	+	-	-	-	-	-	+	-
OEC	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EUG	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OEO	+	+	-	-	-	-	-	-	-
TI	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1/8 CMB	0	0,5xCMB	CMB	1,2xCMB	1,4xCMB	1,6xCMB	1,8xCMB	2xCMB	
AP	+	+	+	-	-	-	-	+	
OEC	+	-	-	-	-	-	-	-	
EUG	+	-	-	-	-	-	-	-	
OEO	+	+	-	-	-	-	-	-	
TI	+	+	-	-	-	-	-	-	

(OEC) Óleo essencial de cravo. (OEO) Óleo essencial de orégano. (TI) Timol. (EUG) Eugenol. (AP) Ácido peracético. (+) Houve crescimento. (-) Não houve crescimento. AP, OEC, EUG, OEO e TI são os antimicrobianos testados. A CMB encontrada para cada antimicrobiano está representada na tabela 1 deste estudo. Os resultados do crescimento ou ausência do crescimento foram obtidos através da análise da absorvância.

Clostridium perfringens apresentou resposta adaptativa apenas para o OE de cravo na concentração 1,8 vezes o valor de CMB (Tabela 3) e para o ácido peracético na concentração 2xCMB, quando adaptada na concentração 1/8CMB. Provavelmente esse fato ocorreu, pois, ao ser submetido a condições de estresse, *C. perfringens* esporula não ocorrendo exposição das células vegetativas às condições inadequadas de crescimento.

Diante deste resultado, os compostos eugenol e timol podem ser considerados como alternativas para o controle do crescimento de *C. perfringens* na indústria de alimentos, uma vez que não induziram à resposta adaptativa.

3.4 Avaliação da adaptação cruzada de *Clostridium perfringens* aos compostos majoritários, ácido peracético e temperatura

Quanto aos testes de adaptação cruzada de compostos majoritários e ácido peracético as células foram expostas às concentrações subletais por 6 horas e incubadas à temperatura ótima de crescimento 37°C, posteriormente cultivadas em presença de outros compostos e ácido peracético nas concentrações acima da CMB a 20°C, foi observada (Tabela 4) resposta de adaptação cruzada de *C. perfringens*, após exposição ao ácido peracético e ao timol, ao eugenol.

Os obstáculos em um alimento estável como diminuição de temperatura e pH controlam o crescimento dos microrganismos. Apesar de esse efeito barreira ser de fundamental importância para a preservação dos alimentos, esses fatores subletais combinados podem oferecer proteção cruzada aos microrganismos (BEALES, 2004).

Tabela 4 Adaptação cruzada de *Clostridium perfringens* ao timol, eugenol, ácido peracético e temperatura (20°C)

Estresse subletal	Fator letal	Resistência ao fator letal							
		0	0,5CMB	CMB	1,2CMB	1,4CMB	1,6CMB	1,8CMB	2CMB
1/4 CMB									
AP	EUG	+	-	+	-	-	-	-	+
AP	TI	+	-	-	-	-	-	-	-
EUG	AP	+	+	-	-	-	-	-	-
EUG	TI	+	+	-	-	-	-	-	-
TI	AP	+	+	-	-	-	-	-	-
TI	EUG	+	+	-	-	+	-	+	-
1/8 CMB									
AP	EUG	+	-	-	-	+	+	-	+
AP	TI	+	+	-	-	-	-	-	-
EUG	AP	+	+	-	-	-	-	-	-
EUG	TI	+	+	-	-	-	-	-	-
TI	AP	+	+	-	-	-	-	-	-
TI	EUG	+	+	+	+	-	+	-	+

(TI) Timol. (EUG) Eugenol. (AP) Ácido peracético. Os valores apresentados de (+) Houve crescimento e (-) Não houve crescimento foram obtidos através de plaqueamento. A CMB encontrada para cada antimicrobiano está representada na tabela 1 deste estudo.

Quanto aos resultados de adaptação cruzada a outros fatores de estresse ambientais como pH e temperatura, observou-se (Tabela 6) resposta adaptativa de *C. perfringens* quando exposto à concentração subletal oito vezes menor que a CMB de eugenol e cultivado em pH 4,0, ajustado com ácido láctico.

Os tipos de conservação de alimentos como redução da temperatura, pH e conservantes como os ácidos fracos têm sido discutidos isoladamente. Contudo, é habitual combinar fatores subletais para se atingir diferentes grupos de microrganismos dentro de um alimento denominando de “obstáculo de Leistner” ou teoria das barreiras. Porém, se os microrganismos presentes no alimento forem capazes de superar os obstáculos presentes eles farão com que o alimento deteriore ou cause toxinfecção alimentar, dependendo dos microrganismos presentes (BEALES, 2004).

Tabela 5 Resposta da indução à adaptação cruzada de *C. perfringens* ao timol, eugenol e ácido peracético a diferentes pH ajustados com ácido láctico

pH	Não Adaptadas	Estresse subletal					
		1/4 CMB			1/8CMB		
		AP	EUG	TI	AP	EUG	TI
3.5	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	+	-
4.5	+	-	-	+	+	+	+
BHI	+	+	+	+	+	+	+

(TI) Timol. (EUG) Eugenol. (AP) Ácido peracético. Os valores de pH foram obtidos através da análise de absorvância. Os resultados de (+) Houve crescimento e (-) Não houve crescimento foram obtidos através do plaqueamento.

Essas alterações permitem aos microrganismos manterem seu metabolismo e, portanto, sobreviverem e se multiplicarem após exposição a condições de estresse em produtos alimentares. Também tem sido demonstrado que existe uma série de mecanismos moleculares que os microrganismos utilizam para se adaptar e sobreviver. Mudanças adaptativas a estresses ambientais exigem grandes quantidades de energia e durante as fases de

adaptação todas as divisões celulares normais são interrompidas. Isso tem várias consequências importantes para as toxinfecções alimentares microbianas ou deterioração, como a fase de latência antes que o crescimento se estenda, as reduções das taxas de crescimento e os números celulares finais diminuam. Os requisitos nutricionais e composição enzimática e química das células são também afetados. Isso caracteriza a importância de se entender as respostas adaptativas que os microrganismos utilizam para sobreviver em ambientes antes letais.

4 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano foram bactericidas em concentrações quatro vezes maiores que os seus respectivos compostos majoritários eugenol e timol.

Observou-se resposta adaptativa de *C. perfringens* quando exposto à concentração subletal oito vezes menor que a concentração mínima bactericida (CMB) de eugenol e cultivado em pH 4,0, ajustado com ácido láctico.

REFERÊNCIAS

- BANERJEE, P.; BHUNIA, A. K. Cell-based biosensor for rapid screening of pathogens and toxins. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 99-106, 2010.
- BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 1-20, 2004.
- CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p.271-276, 2003.
- DAVIDSON, P. M. ;HARRISON, M. A. Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. **Food Technology**, v. 56, n. 11, p. 69-78, 2002.
- DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 4, p. 453-463, 2002.
- JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**, 6ª Edição, Artmed, 2005, 711p.
- LANDAU, E.; SHAPIRA, R. Effects of subinhibitory concentrations of menthol on adaptation, morphological, and gene expression changes in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5361–5367, Aug. 2012.
- LANGSRUD, S; SIDHU, M. S.; HEIR, E.; HOLCK, A. L. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 283-290, 2003.
- LEISTNER, L. Food preservation by combined methods. **Food Research International**, v. 25, n. 2, p. 151-158, 1992.
- LIMA, I. O; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.
- LUZ, I. S.; GOMES NETO, N. J.; TAVARES, A. G.; NUNES, P. C.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Evidence for no acquisition of tolerance in

Salmonella typhimurium ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 5021–5024, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 13 edição, Artmed, 2010.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, João Pessoa: v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A6, Wayne, Pa, USA, 2003.

NOVAK, J. S.; JUNEJA, V. K. *Clostridium perfringens*: hazards in new generation foods. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, p. 127-132, 2002.

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

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

**CAPÍTULO 3 Adaptação e adaptação cruzada de *Salmonella enterica*
Enteritidis e *Staphylococcus aureus* a diferentes fatores**

RESUMO

A necessidade de se produzir alimentos seguros leva as indústrias alimentícias a utilizarem diferentes agentes antimicrobianos, tanto para a sanificação de utensílios e equipamentos quanto para desinfecção dos manipuladores, bem como conservantes. Contudo, muitas vezes os microrganismos ficam expostos constantemente a concentrações subletais desses antimicrobianos, o que pode levar à sua adaptação ou adaptação cruzada, proporcionando sua sobrevivência em ambientes antes inóspitos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta adaptativa e a adaptação cruzada de *Salmonella enterica* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* aos óleos essenciais (OEs) de *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), aos compostos majoritários eugenol e timol e ao desinfetante ácido peracético. A influência da temperatura sobre a concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) dos OEs eugenol, timol e ácido peracético foi estudada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo. Os antibacterianos foram utilizados nas concentrações de 0,00; 0,05; 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25 (v/v) e as temperaturas estudadas foram 20; 30 e 37°C. Em todos os experimentos os OEs timol e eugenol foram homogeneizados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) adicionado de 0,5% (v/v) de Tween 80. Em todos os estudos envolvendo ácido peracético o Tween 80 não foi utilizado. O crescimento bacteriano foi verificado pela leitura da absorbância (DO_{620nm}) após incubação das culturas nas diferentes temperaturas por 24 horas. Para avaliação da resposta adaptativa, os microrganismos foram expostos às concentrações subletais de 1/4 CMI e 1/8 CMI dos antibacterianos por seis horas e, posteriormente, incubados a 37°C por 24 horas em concentrações acima das CMI. A capacidade de adaptação cruzada de *S. aureus* e *S. Enteritidis* foi estudada cultivando previamente as células por seis horas em presença de timol, carvacrol e/ou ácido peracético, em concentrações subletais (1/4 e 1/8 do CMI). Após cultivo as células foram recuperadas e expostas a agentes antimicrobianos, diferentes daqueles expostos a concentrações subletais, à temperatura de 20°C e a diferentes pH (6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0) ajustados com ácido láctico. As CMI dos OEs de orégano e cravo-da-índia, timol, eugenol e ácido peracético foram para *S. Enteritidis*, respectivamente de 0,39; 0,39; 0,09; 0,39 e 0,03%. Já para *S. aureus* foram, respectivamente, 0,78; 0,78; 0,39; 1,56 e 0,06%. As CMI dos OE e do eugenol foram maiores a 37°C para *S. aureus* do que a 20 e 30°C. Já para *S. Enteritidis* as CMI tanto do OE de cravo da índia (0,39%) quanto para o eugenol (0,39%) foram maiores a 37°C, nesta temperatura a CMI do ácido peracético, 0,03% foi menor. A CMI do timol foi influenciada apenas pela temperatura de 30°C, onde foi maior que as outras (0,19%). Tanto *S. aureus* quanto *S. Enteritidis* adaptadas se mostraram mais sensíveis às CMI anteriormente determinadas, entretanto, foi observada alta variabilidade no

crescimento das células expostas quando cultivadas em concentrações mais elevadas que a CMI. Da mesma forma, a variabilidade na resposta fisiológica das células tanto de *S. aureus* quanto de *S. Enteritidis* foi observada na adaptação cruzada. *S. aureus* se mostrou capaz de tolerar pH mais baixos após exposição a concentrações subletais de eugenol, timol e ácido peracético, fato não observado com *Salmonella*. As bactérias estudadas mostraram-se capazes de se adaptar a condições antes inadequadas ao seu crescimento, quando expostas a condições subletais, indicando risco na obtenção de alimentos seguros.

Palavras-chave: Timol. Eugenol. Bactérias patogênicas. Alimentos.

ABSTRACT

The need to produce safe food, led food industry to use different antimicrobial agents for both the sanitizing of utensils and equipment and for disinfection of handlers, as conservants. However, the organisms are constantly exposed to sublethal concentrations of antimicrobials, which may lead to their adaptation or cross-adaptation providing their survival in harsh environments. The objective of this study was to evaluate the adaptive response and cross-adaptation of *Salmonella enterica* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* to the essential oils (EOs) of *Origanum vulgare* (oregano) and *Syzygium aromaticum* (clove), to the major compounds of eugenol and thymol and to peracetic acid disinfectant. For *S. aureus* e *S. Enteritidis* the influence of temperature on the minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal (MBC) of EOs, eugenol, thymol and peracetic acid was studied using the technique of broth microdilution. Antibacterial agents were used in concentrations of 0.00; 0.05; 0.09; 0.19; 0.39; 0.78; 1.56, 3.12 and 6.25 (v / v) and temperatures were studied 20; 30 and 37 ° C. In all experiments, the EOs, thymol and eugenol were homogenized in brain heart infusion broth (BHI), supplemented with 0.5% (v / v) of Tween 80. In all studies involving peracetic acid the tween 80 was not used. Bacterial growth was checked by reading the absorbance (DO_{620nm}) after incubation of the cultures at different temperatures for 24 hours. To evaluate the adaptive response, microorganisms were exposed to sublethal concentrations of 1/4 MIC and 1/8 MIC of antibacterial for 6 hours and then incubated at 37 ° C for 24 hours in concentrations above the MIC. The ability to cross adaptation of *S. aureus* and *S. enteritidis* has been previously studied by culturing the cells for 6h in the presence of thymol and carvacrol or peracetic acid in sub-lethal concentrations (1/4 and 1/8 MIC). After cultivation, cells were recovered and exposed to different antimicrobials of those exposed to sublethal concentrations, temperature of 20 ° C and different pH (6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0) adjusted with lactic acid. MICs of EOs of oregano and clove, thymol, eugenol and peracetic acid were to *S. Enteritidis*, respectively 0.39; 0.39; 0.09; 0.39 and 0.03%. For *S. aureus* they were, respectively, 0.78, 0.78; 0.39; 1.56 and 0.06%. The MIC of eugenol and EO were higher at 37 °C for *S. aureus* than at 20 °C and 30 °C. As for *S. Enteritidis*, the MIC of both OE clove (0.39%) and for eugenol (0.39%) were higher at 37 °C, at this temperature the MIC of peracetic acid, 0.03%, was lower. Thymol MIC was only influenced by the temperature of 30 °C, which was higher than the others (0.19%). Both *S. aureus* as *S. Enteritidis*, adapted, were more sensitive to the previously determined MICs, however, high variability was observed in the growth of treated cells when grown in higher concentrations than the MIC. Similarly, variability in the physiological response of the cells of both *S. aureus* and *S. enteritidis* was observed in the cross adaptation. *S. aureus* has been shown to tolerate lower pH after exposure to

sublethal concentrations of eugenol, thymol and peracetic acid, fact that was not observed with *Salmonella*. The bacteria studied were capable of adapting to conditions prior to the inadequate growth when exposed to sublethal conditions indicating risk in getting safe food.

Keywords: Thymol. Eugenol. Pathogenic bacteria. Food

1 INTRODUÇÃO

Pode-se inferir que a resistência antimicrobiana é resultado de uma complexa interação entre os agentes antimicrobianos, microrganismos e meio ambiente. Assim, a versatilidade microbiana de se adequar às condições impostas representa um formidável mecanismo de defesa (FIOCRUZ, 2005).

Crescentes preocupações sobre a transmissão de doenças de origem alimentar têm levado a um aumento na utilização de agentes antimicrobianos nas indústrias e em ambientes domésticos. Há preocupações no uso indiscriminado e inadequado desses compostos biocidas (concentrações inadequadas, limpeza insuficiente antes da aplicação ou a presença de desinfetantes residuais subletais após limpeza) que podem contribuir para a propagação da resistência bacteriana, bem como para uma resistência cruzada a certos antibióticos de uso terapêutico. (BRAOUDAKI; HILTON, 2005; RUSSELL, 2003).

A resistência dos microrganismos aos antimicrobianos tem sido atribuída a mecanismos herdados e não herdados (LEVIN; ROZEN, 2006), que estão diretamente ligados à espécie e fisiologia destes (LEVIN, 2004). Essa diferença pode ser observada dentro da mesma linhagem quando esta se encontra livre.

A contaminação de superfícies e alimentos por microrganismos deterioradores e patogênicos como a *Salmonella enterica* Enteritidis e o *Staphylococcus aureus* é preocupação na indústria de alimentos. As características fisiológicas dos microrganismos pode conferir resistência aos agentes antimicrobianos, como, por exemplo, aos sanificantes usados no procedimento de higienização ou nos antimicrobianos utilizados na conservação dos alimentos.

Salmonella enterica é o agente etiológico de doenças transmitidas por alimentos em aves e produtos avícolas, sendo essas as principais fontes de

infecção no ser humano, sendo os sorovares *S. Typhimurium* e Enteritidis os mais comuns associados com a infecção humana (GONZÁLEZ-GIL et al., 2012), ambos classificados atualmente como re-emergentes. *Salmonella*, assim como outros microrganismos enteropatogênicos, possui surpreendente capacidade de sobreviver em condições rigorosas encontradas no ambiente natural e no organismo hospedeiro. A capacidade de adaptação e sobrevivência a estes estresses está diretamente relacionada à habilidade de alguns microrganismos em causar doenças (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001).

As bactérias do gênero *Salmonella* caracterizam-se por provocar contaminações devido às deficiências de saneamento básico e às más condições higiênico-sanitárias da maioria da população, aliadas ao precário controle de qualidade de algumas indústrias alimentícias e de abatedouros de aves (TUNON et al., 2008).

Staphylococcus aureus é muito comum em alimentos de grande manipulação. Essa espécie do gênero *Staphylococcus* que se apresenta em forma de cocos Gram-positivos não esporulados, catalase e coagulase positivos se dividem em mais de um plano para formar racimos tridimensionais de células denominados como “cachos de uva” (PERREIRA et al., 2000). O crescimento de *S. aureus* em alimentos representa potencial perigo à saúde pública, porque muitas cepas produzem uma ou a maioria das enterotoxinas (SES) que causam toxiose alimentar se ingerida (AKINEDEN et al., 2008). A toxiose estafilocócica é caracterizada por náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia e dores de cabeça. O início dos sintomas é normalmente rápido, dependendo da suscetibilidade individual à toxina, da quantidade de alimentos contaminados ingeridos e da quantidade de toxina no alimento ingerido (FORSYTHE, 2002).

Apesar da resistência bacteriana a antibióticos ser bastante conhecida, a resistência a sanificantes e conservantes de alimentos ainda é pouco estudada (LANGSRUD et al., 2003). Os mecanismos bioquímicos exatos de adaptação e

de resistência permanecem amplamente desconhecidos (LEVIN, 2004; BRAOUDAKI; HILTON, 2005; RUSSEL, 2003). Já a resistência cruzada pode ocorrer quando diferentes agentes antimicrobianos atacam o mesmo alvo na célula, atingindo uma rota comum de acesso aos respectivos alvos ou iniciando uma via comum para a morte celular (CHAPMAN, 2003).

Neste sentido, o interesse em compostos antimicrobianos naturais tem aumentado devido a mudanças nas atitudes dos consumidores em relação ao uso de agentes sintéticos de conservação de alimentos, detergentes e sanificantes que principalmente possuam impactos negativos ao ambiente (LEBERT; LEROY; TALON, 2007). Neste contexto, destaca-se a utilização de óleos essenciais que são formados a partir de vias metabólicas secundárias e podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Estes ocorrem em estruturas secretoras especializadas tais como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (BURT, 2004). Como os óleos essenciais e seus compostos já vêm sendo utilizados nas indústrias de alimentos e seu efeito antibacteriano já foi comprovado, a atual preocupação é a possibilidade de que os mesmos possam induzir mecanismos de adaptação nos microrganismos, se usados em doses subletais como conservantes e sanificantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de execução do experimento

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras

2.2 Antimicrobianos

Óleos essenciais (OEs) de *Syzygium aromaticum* e *Origanum vulgare* foram adquiridos da FERQUIMA[®] Indústria e Comércio Ltda., (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) e os compostos majoritários eugenol e timol adquiridos na Sigma-Aldrich[®]. O desinfetante ácido peracético utilizado foi o SANDET 286[®].

2.3 Microrganismos

A cepa de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis S64 foi fornecida pelo Laboratório do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pertence à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

2.3.1 Padronização, estocagem e preparo dos inóculos

As culturas de *Salmonella enterica* Enteritidis S64 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram reativadas em frascos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. As cepas foram estocadas em meio de congelamento (15 mL de glicerol; 0,5g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; 100 mL de água destilada; pH 7,2 ±2) em freezer a -80°C. As culturas estoques foram reativadas pela transferência de alíquotas para tubos de ensaio contendo BHI, com incubação a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, uma alíquota de 200µL foi transferida para erlenmeyer contendo 150 mL de BHI, o qual foi incubado a 37°C até atingir 10⁸ UFC mL⁻¹.

Para a padronização do inóculo foi realizada curva de crescimento, pela transferência de 200µL da cultura reativada para frasco contendo 150 mL de BHI e incubação a 37°C. Foram realizadas leituras periódicas da absorbância da cultura a D.O. 600 nm e acompanhado por plaqueamento em superfície, utilizando-se como meio Agar Triptona de Soja (TSA). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A cultura foi padronizada em 10⁸ UFC mL⁻¹.

2.4 Influência da temperatura de crescimento sobre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético

As concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos óleos essenciais (OEs) de *S. aromaticum* (cravo-da-índia) e *O. vulgare* (orégano), compostos majoritários eugenol e timol e do ácido peracético em diferentes temperaturas (20; 30 e 37°C) foram determinadas empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de microdiluição de 96 cavidades, de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (M7-A6) (NCCLS,

2003). Foram testadas as concentrações de 0,00; 0,05; 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25% (v/v) obtidas pela homogeneização dos antimicrobianos em caldo BHI, adicionado de 0,5% (v/v) de Tween 80. A CMI do ácido peracético foi determinada utilizando-se o mesmo meio de cultivo sem adição de Tween 80. As concentrações testadas foram: 0,00; 0,0039; 0,0078; 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5% (v/v). O volume final de líquido nas cavidades, após esta etapa, foi de 150µL. Alíquotas de 10 µL do inóculo bacteriano padronizado foi adicionado às cavidades. Foram realizadas três repetições. Para todas as concentrações, cavidades sem o inóculo foram preparadas. As microplacas foram incubadas nas diferentes temperaturas por 24 horas. A absorbância das amostras foi lida a D.O. 620 nm em leitor de microplacas. As menores concentrações que resultaram em completa inibição do crescimento bacteriano foram denominadas concentração mínima inibitória (CMI).

2.5 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório

A influência do pH no crescimento de *S. enterica* Enteritidis e *S. aureus* foi avaliada em microplacas de poliestireno com 96 cavidades. Em cada cavidade foram adicionados 140 µL de caldo BHI, com pH ajustado com ácido clorídrico, ácido acético e/ou ácido láctico para 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0. Após adição do meio de cultura, 10 µL de cultura padronizada foi adicionada em cada poço, as microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A absorbância foi lida a 620nm em leitor de microplacas.

O pH mínimo inibitório foi definido como o menor valor capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. O pH mínimo de crescimento foi aquele imediatamente anterior ao pH mínimo inibitório.

2.6 Adaptação das bactérias às concentrações subletais dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético

As células foram expostas a concentrações subletais dos OEs, compostos majoritários e ácido peracético. As doses subletais utilizadas foram equivalentes a 1/4 CMI e 1/8 CMI de cada óleo essencial, compostos majoritários e ácido peracético. Em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 foram adicionados os antibacterianos nas concentrações subletais. Após homogeneização, os inóculos foram adicionados na concentração de 10^5 UFC mL⁻¹ e os tubos foram incubados a 37°C por seis horas.

2.7 Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético sobre as células adaptadas

Após exposição às doses subletais, alíquotas de 1 mL das culturas foram retiradas, centrifugadas (5000 x g/5 minutos), lavadas e ressuspendidas em solução salina 0,9% (m/v) por três vezes. A suspensão foi padronizada em 10^8 UFC mL⁻¹ utilizando-se a escala de MacFarland. As células adaptadas foram expostas a diferentes concentrações dos óleos essenciais de cravo da Índia e orégano, dos compostos majoritários eugenol e timol e do ácido peracético (CMB/2; CMB; 1,2 x CMB; 1,4 x CMB; 1,6 x CMB; 1,8 x CMB; 2 x CMB). A técnica utilizada foi a de microdiluição em placas (OLIVEIRA et al., 2012). A absorbância das amostras foi lida a 620 nm em leitor de microplacas. As menores concentrações que resultaram em completa inibição do crescimento bacteriano, após 24 horas de incubação a 37°C sob anaerobiose, foram denominadas concentrações mínimas inibitórias das células expostas a doses subletais (CMB_{DS}).

O controle foi constituído de células não expostas às doses subletais (CMB_{NDS}).

2.8 Avaliações da aquisição de resistência cruzada

A capacidade de *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* em desenvolver capacidade de adaptação cruzada foi avaliada empregando-se a pré-exposição das bactérias a concentrações subletais de eugenol, timol e/ou ácido peracético.

2.9.1 Compostos majoritários e Ácido peracético

Células expostas às concentrações subletais de eugenol foram submetidas a diferentes concentrações de timol e ácido peracético; células expostas às concentrações subletais de timol foram submetidas a diferentes concentrações de eugenol e ácido peracético, e; células expostas às concentrações subletais de ácido peracético foram submetidas a diferentes concentrações eugenol e timol. Foi utilizado o procedimento descrito no item 4.7.

2.9.2 pH

Células submetidas a concentrações subletais dos compostos eugenol e timol e ácido peracético foram submetidas ao crescimento a diferentes valores de pH, como utilizado no procedimento do item 4.5.

2.9.3 Temperatura

As células submetidas a concentrações subletais dos compostos eugenol e timol e do ácido peracético foram incubadas a 20°C de acordo com a metodologia utilizada no item 4.7.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) dos Óleos Essenciais, Compostos Majoritários e Ácido Peracético

A inibição do crescimento da cultura testada evidencia o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético. Os valores observados das concentrações testadas na determinação da concentração mínima inibitória e da concentração mínima bactericida dos antimicrobianos sobre *Salmonella enterica* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* estão apresentados na tabela 1. A concentração mínima inibitória (CMI) foi observada onde ocorreu a inibição do crescimento bacteriano. A concentração mínima bactericida (CMB) foi observada onde ocorreu a ausência do crescimento bacteriano.

Tabela 1 Concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) dos antimicrobianos sobre *Salmonella enterica* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* a 37°C

Antimicrobianos	<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB
OEC	0.39	0.78	0.78	0.78
OEO	0.39	0.39	0.78	1.56
TI	0.09	0.19	0.39	0.78
EUG	0.39	0.39	1.56	3.12
AP	0.03	0.06	0.06	0.12

(CMI) concentração mínima inibitória. (CMB) Concentração mínima bactericida. (OEC) Óleo essencial de cravo-da-índia. (OEO) Óleo essencial de orégano. (TI) Timol. (EUG) Eugenol. (AP) Ácido peracético. Os valores da CMI foram obtidos através da análise da absorvância. Os valores de CMB foram obtidos através da análise do plaqueamento.

Na temperatura ótima de crescimento de *S. aureus* e *S. enterica* Enteritidis, a maior CMI foi de 1,56% do eugenol e de 0,39% para os óleos essenciais e eugenol, respectivamente. Já a maior CMB para *S. aureus* foi de

3,12% do eugenol e para *S. enterica* Enteritidis foi de 0,78% do óleo de cravo. Estes resultados mostram que *S. aureus* é mais resistente que *S. enterica* Enteritidis frente aos antimicrobianos estudados.

A diferença entre a sensibilidade das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas se deve principalmente à constituição química de suas paredes celulares, sendo a primeira com quantidade de peptídeoglicano maior, e conteúdo lipídico e complexidade química de parede celular menores do que as Gram-negativas (PINTO et. al., 2001).

3.2 Influência da temperatura de crescimento sobre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético

Para a determinação da CMI e CMB dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético em diferentes temperaturas de crescimento, a análise foi realizada em microplacas contendo diferentes concentrações dos óleos que variou de 0,0 a 6,25% para óleos e compostos e de 0,0 a 0,5% para o ácido peracético. As microplacas foram realizadas em triplicata para cada antimicrobiano e posteriormente foram incubadas em 20°C, 30°C e 37°C.

A temperatura de incubação dos microrganismos influenciou nas CMI dos óleos essenciais, seus compostos e do ácido peracético (Tabela 2). Para *S. aureus*, tanto a 20°C quanto a 30°C as CMI dos óleos de cravo-da-índia e orégano e do timol foi de 0,39% (v/v), sendo menor quando comparadas aos valores obtidos na temperatura de 37°C, ótima ao crescimento celular.

A influência da temperatura não foi observada para *Salmonella enterica* Enteritidis no óleo de orégano, que apresentou o mesmo CMI para todas as temperaturas estudadas e nem para *S. aureus* no timol que também apresentou o as mesmas CMI e as mesmas CMB nas temperaturas estudadas. A concentração mínima inibitória do desinfetante ácido peracético foi de 0,06% para todas as

temperaturas analisadas. Para *S. enterica* Enteritidis esse mesmo desinfetante apresentou diferença na temperatura de 37°C, onde a CMI foi de 0,03% (v/v). Considerando que a indústria utiliza esse desinfetante na concentração de 0,2 a 0,5% (v/v), o presente estudo mostra a possibilidade de redução da concentração do uso para os microrganismos estudados.

Tabela 2 Influência da temperatura de crescimento sobre as concentrações mínimas inibitórias (%) de óleos essenciais, timol, eugenol e ácido peracético sobre *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* Enteritidis

Anti-microbianos	<i>Staphylococcus aureus</i>					
	Temperatura					
	20°C		30°C		37°C	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
OEC	0.39	0.78	0.39	0.78	0.78	0.78
OEO	0.39	0.78	0.39	0.78	0.78	1.56
TI	0.39	0.78	0.39	0.78	0.39	0.78
EUG	0.78	0.78	0.39	0.78	1.56	3.12
AP	0.06	0.12	0.06	0.12	0.06	0.12
	<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis					
OEC	0.19	0.39	0.19	0.39	0.39	0.78
OEO	0.39	0.39	0.39	0.78	0.39	0.39
TI	0.09	0.19	0.19	0.39	0.09	0.19
EUG	0.19	0.39	0.19	0.78	0.39	0.39
AP	0.06	0.12	0.06	0.06	0.03	0.06

(CMI) Concentração mínima inibitória. (CMB) Concentração mínima bactericida. (OEC) Óleo essencial de cravo. (OEO) Óleo essencial de orégano. (TI) Timol. (EUG) Eugenol. (AP) Ácido peracético. Os valores de CMI foram obtidos através da análise da absorbância. Os valores de CMB foram obtidos através da análise do plaqueamento.

Para *Staphylococcus aureus* as temperaturas de 20°C e 30°C não interferiram nas CMB para os antimicrobianos estudados, apresentando estes os mesmos valores de CMB para ambas as temperaturas. O maior efeito da temperatura sobre a CMB para o microrganismo em questão foi verificado em sua temperatura ótima de incubação, mostrando que quando o microrganismo se encontra em sua temperatura ótima menos nociva são as condições adversas.

As temperaturas mínimas e máximas de crescimento assumem condições ótimas diferentes de acordo com os outros parâmetros que também são utilizados (JAY, 2005).

3.3 Determinação do pH mínimo inibitório e do mínimo de crescimento

A determinação do pH mínimo inibitório (pH_{MI}) e o mínimo de crescimento (pH_{MC}) dos ácidos estudados, mostraram diferença no efeito dos ácidos orgânicos e ácidos inorgânicos sobre o crescimento celular das bactérias. Para *S. aureus* e *S. enterica* Enteritidis os ácidos orgânicos, lático e acético apresentaram (Tabela 3) o mesmo efeito sobre as células, uma vez que permitiram o crescimento somente a partir de pH 5,5. Estes resultados são esperados, pois de acordo com Franco e Landgraf, (1996) dependendo do ácido estudado o pH mínimo pode subir de acima de 4,0 para 5,5.

Tabela 3 Determinação pH mínimo inibitório (pH_{MI}) e o mínimo de crescimento (pH_{MC}) de *S. aureus* e *S. enterica* Enteritidis expostos a diferentes ácidos

Ácidos	Microrganismos			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	
	pH_{MI}	pH_{MC}	pH_{MI}	pH_{MC}
Acético	5.0	5.5	5.0	5.5
Clorídrico	4.5	5.0	4.0	4.5
Lático	5.0	5.5	5.0	5.5

(pH_{MI}) pH mínimo inibitório. (pH_{MC}) pH mínimo de crescimento. Os valores de pH_{MI} e pH_{MC} foram obtidos através da análise de absorbância

Um pH adverso afeta pelo menos dois aspectos de uma célula microbiana viva: o funcionamento de suas enzimas e o transporte de nutrientes para o interior da célula. Em relação ao transporte de nutrientes, a célula bacteriana tende a possuir uma carga residual negativa. Deste modo, compostos não ionizados conseguem entrar na célula, enquanto compostos ionizados não

conseguem. Em pH neutro ou alcalino, os ácidos orgânicos não entram, ao passo que em valores de pH ácidos, esses compostos estão não ionizados e conseguem entrar nas células carregados negativamente (JAY, 2005).

Quando os microrganismos são colocados em meios com pH abaixo ou acima da neutralidade, sua capacidade de proliferar depende da capacidade de modificar o pH do meio para um valor ou faixa ótima. Quando colocados em ambientes ácidos, as células precisam evitar que íons H^+ entrem ou expeli-los numa velocidade maior que a de entrada (JAY, 2005).

Como não houve diferença entre a ação dos ácidos orgânicos, o ácido láctico foi escolhido para a condução dos experimentos.

3.4 Adaptação das bactérias às concentrações subletais dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético

A avaliação da adaptação bacteriana às condições subletais foi realizada incubando-se o microrganismo à temperatura ótima de 37°C por seis horas. Após as seis horas de incubação as células foram recuperadas e colocadas em concentrações acima da concentração mínima inibitória, depois foram novamente incubadas a 37°C por 24 horas e a leitura da absorbância foi realizada no tempo 0 e 24 horas, onde foi observado o crescimento ou a ausência dele nas células adaptadas e não adaptadas.

Nos resultados apresentados (Tabela 4), a resposta adaptativa direta para *S. enterica* Enteritidis ocorreu quando adaptada à concentração subletal ¼ CMI do OE de cravo e comparados com as células não adaptadas. Nesta condição, as células de *S. enterica* Enteritidis se mostraram adaptadas a crescer em todas as concentrações estudadas acima da CMI. Para o composto eugenol, as células adaptadas à concentração subletal ¼ CMI deste composto e comparados com as células não adaptadas, mostrou resposta adaptativa nas concentrações de 1,8 e duas vezes maior que o CMI.

É bem conhecido que a exposição a condições subletais de substâncias antimicrobianas pode resultar no desenvolvimento de aumento da tolerância aos mesmos (homólogos), ou a agente de estresse de tolerância cruzada (heterólogos) (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2008).

Luz et al. (2012) estudaram a resposta adaptativa de *Salmonella* Typhimurium a quantidades subletais do OE de orégano e do composto carvacrol, e não observaram resposta adaptativa direta nem cruzada. As células subcultivadas com quantidades crescentes de orégano ou carvacrol, sobreviveram até o CMI de qualquer composto, revelando algumas mudanças significativas na suscetibilidade bacteriana.

Tabela 4 Resposta da indução da adaptação de *S. enterica* Enteritidis aos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético

Cepas	<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis							
	0	CMI/2	CMI	1,2xCMI	1,4xCMI	1,6xCMI	1,8xCMI	2xCMI
Adaptadas 1/4 CMI								
AP	+	+	-	+	+	+	-	-
OEC	+	+	-	+	+	+	+	+
EUG	+	-	-	-	-	-	+	+
OEO	+	-	-	-	-	-	-	-
TI	+	+	-	-	-	-	+	-
Adaptadas 1/8 CMI								
AP	+	+	-	+	+	+	+	+
OEC	+	-	-	+	+	+	-	-
EUG	+	-	-	-	-	-	-	-
OEO	+	+	-	+	-	-	-	-
TI	+	+	-	-	+	+	-	-

(OEC) Óleo essencial de cravo. (OEO) Óleo essencial de orégano. (TI) Timol. (EUG) Eugenol. (AP) Ácido peracético. AP, OEC, EUG, OEO e TI são os antimicrobianos testados (+) Houve crescimento. (-) Não houve crescimento. A CMI encontrada para cada antimicrobiano está representada na tabela 1 deste capítulo. Os resultados do crescimento ou ausência do crescimento foram obtidos através da análise da absorbância.

Em *S. aureus* por sua vez, foi possível observar (Tabela 5), que onde não havia crescimento nas células não adaptadas, quando adaptada à concentração

1/8 CMI o crescimento pode ser observado, caracterizando, assim, a resposta adaptativa. Porém, não ocorreu resposta adaptativa para o sanificante ácido peracético quando submetido a concentrações subletais oito vezes menor que CMI.

Gomes Neto et al. (2012) estudaram a indução da proteção direta e cruzada em *S. aureus* e observaram que ocorreu a inibição do *S. aureus* já presente com a adição de 1/2 da CMI do óleo essencial de orégano ou carvacrol, que pode ser relacionado com a manifestação de lesão celular e, quando as células bacterianas são continuamente expostas num ambiente estressante mas não letal, as células podem perder a viabilidade e a capacidade de sobrevivência ao longo do tempo.

Tabela 5 Resposta da indução da adaptação de *S. aureus* aos óleos essenciais, compostos majoritários e ácido peracético

Cepas		<i>Staphylococcus aureus</i>							
Adaptadas 1/4 CMI	0	CMI/2	CMI	1,2xCMI	1,4xCMI	1,6xCMI	1,8xCMI	2xMC	
AP	+	-	-	-	+	-	+	+	
OEC	+	-	-	-	-	-	-	-	
EUG	+	-	-	-	+	+	-	-	
OEO	+	-	-	-	-	-	-	-	
TI	+	-	-	-	-	-	-	-	
Adaptadas 1/8 CMI	0	CMI/2	CMI	1,2 x CMI	1,4 x CMI	1,6 x CMI	1,8 x CMI	2xCMI	
AP	+	-	-	-	-	-	-	+	
OEC	+	-	+	+	-	-	-	-	
EUG	+	-	-	+	-	+	+	-	
OEO	+	-	-	-	-	-	-	-	
TI	+	-	+	-	+	+	-	-	

(OEC) Óleo essencial de cravo. (OEO) Óleo essencial de orégano. (TI) Timol. (EUG) Eugenol. (AP) Ácido peracético. AP, OEC, EUG, OEO e TI são os antimicrobianos testados (+) Houve crescimento. (-) Não houve crescimento. A CMI encontrada para cada antimicrobiano está representada na tabela 1 deste capítulo. Os resultados do crescimento ou ausência do crescimento foram obtidos através da análise da absorbância

3.5 Avaliação da aquisição de resistência cruzada bacteriana entre os compostos majoritários, ácido peracético e temperatura

Quanto aos testes de adaptação cruzada de compostos majoritários e ácido peracético, as células foram expostas a concentrações subletais a 37°C por seis horas, posteriormente cultivadas a outros compostos e ácido peracético a concentrações acima da CMI a 20°C. Observou-se que *S. enterica* Enteritidis (Tabela 7) somente mostrou resposta adaptativa quando adaptada à concentração 1/4 CMI do composto eugenol e, posteriormente, cultivadas com timol na concentração 1,2 vezes o valor do CMI.

Tabela 6 Resposta da indução à adaptação cruzada de *S. enterica* Enteritidis aos compostos majoritários e ácido peracético

Cepas	<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis							
	0	CMI/2	CMI	1,2xCMI	1,4xCMI	1,6xCMI	1,8xCMI	2 x CMI
Adaptadas 1/4 CMI								
AP/EUG	+	+	-	-	-	-	-	-
AP/TI	+	+	+	-	-	-	-	-
EUG / AP	+	+	+	+	-	+	-	-
EUG / TI	+	+	-	+	-	-	-	-
TI/AP	+	+	+	+	-	+	-	-
TI/EUG	+	+	-	-	-	-	-	-
Adaptadas 1/8 CMI								
AP/EUG	+	+	-	-	-	-	-	-
AP/TI	+	+	-	-	-	-	-	-
EUG / AP	+	+	+	+	-	+	-	-
EUG / TI	+	-	-	-	-	-	-	-
TI/AP	+	+	+	+	+	+	-	-
TI/EUG	+	+	-	-	-	-	-	-

Os valores de CMI foram obtidos através da análise da absorbância. Os valores apresentados de (+) Houve crescimento e (-) Não houve crescimento foram obtidos através de plaqueamento. (AP/EUG) exposta (37°C) no AP e cultivada (20°C) no EUG. Para todas as siglas seguem essa ordem.

S. aureus, no entanto, mostrou resposta adaptativa na maior concentração estudada de 2 x CMI quando adaptada a concentrações subletais 1/8 CMI dos compostos eugenol e timol, quando cultivados em concentrações de ácido peracético e timol, respectivamente.

Tabela 7 Resposta da indução à adaptação cruzada de *S. aureus* aos compostos majoritários e ácido peracético

Cepas	<i>Staphylococcus aureus</i>							
	0	CMI/2	CMI	1,2xCMI	1,4xCMI	1,6xCMI	1,8xCMI	2 x CMI
Adaptadas 1/4 CMI								
AP/EUG	+	+	-	-	-	-	-	-
AP/TI	+	+	+	-	-	-	-	-
EUG / AP	+	+	+	+	-	+	-	-
EUG / TI	+	+	-	+	-	-	-	-
TI/AP	+	+	+	+	-	+	-	-
TI/EUG	+	+	-	-	-	-	-	-
Adaptadas 1/8 CMI								
AP/EUG	+	+	-	-	-	-	-	-
AP/TI	+	+	+	-	-	-	-	-
EUG / AP	+	-	-	-	+	+	+	+
EUG / TI	+	+	-	-	-	-	-	-
TI/AP	+	+	+	+	+	+	+	-
TI/EUG	+	+	+	-	-	-	-	+

Os valores de CMI foram obtidos através da análise da absorbância. Os valores apresentados de (+) Houve crescimento e (-) Não houve crescimento foram obtidos através de plaqueamento. (AP/EUG) exposta (37°C) no AP e cultivada (20°C) no EUG. Para todas as siglas seguem essa ordem.

Quanto aos resultados de adaptação cruzada a outros fatores de estresse ambientais, como pH e temperatura, observou-se (Tabela 10) que quando as células foram expostas a concentrações subletais por seis horas a 37°C, e posteriormente cultivadas a 20°C em diferentes pHs, *S. enterica* Enteritidis e *S. aureus* não apresentaram respostas adaptativas em nenhum dos experimentos.

Os tipos de conservação de alimentos como redução da temperatura, pH e conservantes ácidos fracos têm sido discutidos isoladamente. Contudo, como é habitual combinar fatores subletais para atingir diferentes grupos de microrganismos dentro de um produto alimentar, denominando o conceito obstáculo de Leistner. Apesar de este efeito barreira ser de fundamental importância para a preservação de alimentos, pelo fato dos obstáculos em um alimento estável controlarem o crescimento dos microrganismos, estes fatores subletais combinados podem oferecer proteção cruzada aos microrganismos. Se os microrganismos presentes no alimento forem capazes de superar os

obstáculos presentes, eles farão com que o alimento estrague ou pode até mesmo causar intoxicação alimentar, dependendo dos microrganismos presentes (BEALES, 2004).

Tabela 8 Resposta da indução à adaptação cruzada de *S. enterica* Enteritidis e *S. aureus* aos compostos e ácido peracético a diferentes pHs

pH	<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis						
	Não Adaptadas	Adaptadas 1/4 CMI			Adaptadas 1/8 CMI		
		AP	EUG	TI	AP	EUG	TI
3.5	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
4.5	+	+	+	+	-	-	+
BHI	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>							
4	+	+	-	+	+	-	+
4.5	+	+	-	+	+	+	+
5	+	+	-	+	+	+	+
BHI	+	+	+	+	+	+	+

(TI) Timol. (EUG) Eugenol. (AP) Ácido peracético. Os valores de pH foram obtidos através da análise de absorvância. Os resultados de (+) Houve crescimento e (-) Não houve crescimento foram obtidos através do plaqueamento.

O estudo da resposta adaptativa ao estresse em diferentes microrganismos mostrou que mudanças complexas na composição celular e regulação podem ocorrer como resultado da exposição a ambientes estressantes. Uma vez que cada tipo de microrganismo, como gram-positivo e gram-negativo, tiveram um tipo de resposta às concentrações subletais.

Essas alterações permitem a microrganismos manterem a fisiologia da célula e, portanto, potencialmente sobreviver e crescer após exposição a condições de stress em produtos alimentares. Também tem sido demonstrado que existe uma série de mecanismos moleculares que os microrganismos utilizam para se adaptar e sobreviver. Mudanças adaptativas a estresses ambientais exigem grandes quantidades de energia e durante as fases de adaptação todas as divisões celulares normais são interrompidas. Isso tem várias consequências importantes para a intoxicação alimentar microbiana ou

deterioração, como a fase de latência antes que o crescimento se estenda, as reduções das taxas de crescimento e os números de celulares finais diminuem. Os requisitos nutricionais e composição enzimática e química das células são também afetados. Isso caracteriza a importância de se entender as respostas adaptativas que os microrganismos utilizam para sobreviver em ambientes antes letais.

4 CONCLUSÃO

Diante do exposto, este trabalho permitiu demonstrar que a temperatura de incubação influenciou na sensibilidade das células quanto aos antimicrobianos estudados. Na determinação do pH mínimo inibitório (pH_{MI}) e o mínimo de crescimento (pH_{MC}) houve diferença no efeito dos ácidos orgânicos e inorgânicos no crescimento dos microrganismos.

Para *Salmonella enterica* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* ocorreu adaptação a alguns antimicrobianos e observou-se, também, o aumento da sensibilidade celular após sua exposição às concentrações subletais.

Quanto aos resultados de adaptação cruzada a outros fatores de estresses ambientais, como pH e temperatura, concluiu-se que quando as células foram expostas a concentrações subletais por seis horas a 37°C e posteriormente cultivadas a 20°C em diferentes pHs, *S. enterica* Enteritidis e *S. aureus* não apresentaram respostas adaptativas em nenhum dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- AKINEDEN, Ö.; HASSAN, A. A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **Food Microbiology**, v. 124, p. 211–216, 2008.
- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ, M.; ARENAS, R.; BERNARDO, A. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 212–219, 2008.
- AUDIA, J. P.; WEBB, C. C.; FOSTER, J. W. Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 97-106, 2001.
- BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 1-20, 2004.
- BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 31–37, 2005.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n.3, p. 223–253, 2004.
- CHAPMAN, J. S. Desinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p.271-276, 2003.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424 p.
- FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, 182 p.
- FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ (FIOCRUZ/LRNCEB/LAB). Manual de Procedimentos para Determinação da Suscetibilidade Antimicrobiana em Enterobactérias. 2005. (Um CD ROOM).

GOMES NETO, N. J.; LUZ, I. S.; TAVARES, A. G.; HONÓRIO, V. G.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Rosmarinus officinalis L. essential oil and its majority compound 1, 8-cineole at sublethal amounts induce no direct and cross protection in *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9, n. 12, p. 1071-1076, 2012.

GONZÁLEZ-GIL, F.; LE BOLLOCH, A.; PENDLETON, S.; ZHANG, N.; WALLIS, A.; HANNING, I. Expression of *hilA* in response to mild acid stress in *Salmonella enterica* is serovar and strain dependent. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 5, p. 292-297, 2012.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**, 6ª Edição, Artmed, 2005, 711p.

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

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, London: v. 24, p. 281-287, 2007.

LEVIN, B. R. Noninherited resistance to antibiotics. **Science**, Washington, v. 305, p.1578–1579, 2004.

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

LUZ, I. S.; GOMES NETO, N. J.; TAVARES, A. G.; NUNES, P. C.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Evidence for no acquisition of tolerance in *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 5021–5024, 2012.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A6, Wayne, Pa, USA, 2003.

PERREIRA, M. L.; PERREIRA, J. L.; SERRANO, A. M.; BERGDOLL, M. S. Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, São Paulo: v. 44, n 68/69, p 32-41, jan./fev. 2000.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the response of microorganisms to biocides. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, London: v. 52, p. 750–763, 2003.

TUNON, G. I. L.; NUNES, R. N.; SILVA, T. M.; CALASANS, M. W. M. Resistência antimicrobiana de *Salmonella sp* isolada de carne de frango resfriada comercializada em Aracaju, Sergipe. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 52, p. 4-6, 2008.