



LETÍCIA ANDRADE DO VALE CANESTRI

**ADAPTAÇÃO HOMÓLOGA E HETERÓLOGA DE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *Cronobacter sakazakii* A
ÓLEOS ESSENCIAIS**

**LAVRAS – MG
2019**

LETÍCIA ANDRADE DO VALE CANESTRI

**ADAPTAÇÃO HOMÓLOGA E HETERÓLOGA DE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *Cronobacter sakazakii*
A ÓLEOS ESSENCIAIS**

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

Orientadora
Dr^a. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG
2019**

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

Canestri, Letícia Andrade do Vale.

Adaptação homóloga e heteróloga de células planctônicas e
sésseis de *Cronobacter sakazakii* a óleos essenciais / Letícia
Andrade do Vale Canestri. - 2019.

57 p.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Bactéria patogênica. 2. Adaptação microbiana. 3. Óleos
essencial. I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Título.

LETÍCIA ANDRADE DO VALE CANESTRI

**ADAPTAÇÃO HOMÓLOGA E HETERÓLOGA DE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *Cronobacter sakazakii*
A ÓLEOS ESSENCIAIS**

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2019.

Dra. Susana Reis Evangelista	UFLA
Dra. Sandra Maria Oliveira Morais Veiga	UNIFAL
Dra. Angélica Cristina de Souza	UFLA
Dra. Monique Suela Silva	UFLA

Dr^a. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

Agradeço a Prof^ª. Dr^ª. Roberta, por muito mais que apenas uma orientação, pela ajuda e por entender tão bem seus orientados.

Agradeço a banca, pela participação e partilha do saber com valiosas contribuições para o trabalho.

A todos os professores e técnicos do DCA, por todos os ensinamentos.

Ao pessoal do laboratório, por fazerem os dias alegres e mais leves. E a todos amigos que conheci ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Márcia e Fernando, meu irmão Gustavo, Fernanda e Laura, pelo incentivo e força. A toda família pela preocupação.

Ao Guilherme, meu marido, com amor, por permanente incentivo e preocupação com que sempre acompanhou este meu trabalho. Agradeço ainda pela paciência e amor demonstrados nos meus momentos menos bons.

Ao meu pequeno Fábio, que mesmo tão pequeno já sente minhas emoções e me incentivou a terminar e ser cada dia uma pessoa melhor.

A todos meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Cronobacter sakazakii é uma bactéria patogênica que acomete principalmente recém-nascidos, idosos e pessoas imunodeprimidas e possui alta taxa de morte, e risco de complicações. Muitos casos têm sido relacionados com uso de fórmulas infantis, mas também foram relatados em outros alimentos como cereais, frutas, legumes, ervas e especiarias e alimentos de origem animal, bem como alimentos processados. *C. sakazakii* possui características peculiares que lhe permitem tolerar baixa atividade de água, estresses osmóticos e extremos de temperatura, dificultando sua eliminação nas plantas de processamento de alimentos. Outra característica importante é a capacidade de formar biofilme, que garante maior resistência aos processos de sanitização e adaptação ao uso de agentes bacterianos. Devido a tais características de adaptação ao estresse vários estudos vêm buscando antimicrobianos alternativos. Os óleos essenciais são compostos naturais com ação antimicrobiana que possuem diferentes mecanismos de ação sobre a célula e tem se mostrado uma alternativa natural. Os óleos essenciais de menta, ho wood e canela foram testados em Concentração Mínima Bactericida (CMB) sobre células planctônicas e sésseis de *C. sakazakii*, e após, testados a capacidade de adaptação homóloga e heteróloga de *C. sakazakii* aos óleos nas subconcentrações 1/8 e 1/16 da CMB. A CMB encontrada para células planctônicas foi 0,12% para canela, 0,25% para menta e ho wood e para células sésseis foi 1,0% para canela e menta e 2,0% para ho wood. A adaptação homóloga de células planctônicas foi observado no óleo de ho wood e menta com 1/8 CMB e 1/16 CMB e no óleo de canela com 1/16 CMB. Já para as células sésseis apenas o óleo de canela nas concentrações 1/8 e 1/16 apresentou adaptação homóloga. Avaliando-se a capacidade de adaptação heteróloga, apenas as células adaptadas ao óleo de canela, tanto em 1/8 quanto em 1/16 da CMBs e posteriormente cultivada em presença do óleo de ho wood ficaram mais sensíveis ao mesmo óleo. Para todas as outras combinações foram observadas a capacidade de adaptação heteróloga.

Palavras-chave: Bactéria patogênica. Células planctônicas. Células sésseis. Adaptação microbiana. Óleo essencial.

ABSTRACT

Cronobacter sakazakii is a pathogenic bacterium that mainly affects newborns, elderly and immunodepressed people and has a high death rate and complications risk. Many cases have been related to use of infant formulas but have also been reported in other foods such as cereals, fruits, vegetables, herbs and spices and animal foods as well as processed foods. *C. sakazakii* has peculiar characteristics that allow it to tolerate low water activity, osmotic stresses and extremes of temperature, making it difficult to eliminate them in food processing plants. Another important characteristic is the ability to form biofilm, which guarantees greater resistance to the processes of sanitization and adaptation to the use of bacterial agents. Due to such stress adaptation characteristics several studies have been looking for alternative antimicrobials. Essential oils are natural compounds with antimicrobial action that have different mechanisms of action on the cell and have been shown to be a natural alternative. The mint, ho wood and cinnamon essential oils were tested on Minimum Bactericidal Concentration (MBC) on *C. sakazakii* plankton and sessile cells, and after testing the capacity of homologous and heterologous adaptation of *C. sakazakii* to the oils in the sub concentrations 1 / 8 and 1/16 of the MBC. The MBC found for plankton cells was 0.12% for cinnamon, 0.25% for mint and ho wood, and for sessile cells it was 1.0% for cinnamon and mint and 2.0% for ho wood. The homologous adaptation of plankton cells was observed in ho wood and mint oil with 1/8 MBC and 1/16 MBC and cinnamon oil with 1/16 MBC. And for the sessile cells, only cinnamon oil at concentrations 1/8 and 1/16 presented homologous adaptation. Evaluating the heterologous adaptability, only the cells adapted to the cinnamon oil, in 1/8 and 1/16 of the MBCs and later cultivated in the presence of ho wood oil, were more sensitive to the same oil. For all other combinations, heterologous adaptability was observed.

Keywords: Pathogenic bacteria. Plankton cells. Sessile cells. Microbial adaptation. Essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação de biofilme.....	16
Figura 2 - Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários.....	21
Figura 3 - Principais locais e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana.	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes majoritários dos óleos essenciais utilizados.	41
Tabela 2 - Concentração mínima bactericida de óleos essenciais sobre células planctônicas (CMB) e sésseis (CMBS) de <i>Cronobacter sakazakii</i>	47
Tabela 3 - Adaptação homóloga de células planctônicas e sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i> a concentrações subletais dos óleos essenciais de canela, ho wood e menta.	48
Tabela 4 - Adaptação heteróloga de células planctônicas e sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i> a concentrações subletais dos óleos essenciais de canela, ho wood e menta.	49

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	<i>Cronobacter sakazakii</i>	12
2.2	Biofilmes bacterianos	14
2.3	Óleos essenciais	19
2.4	Ação antibacteriana dos óleos essenciais	21
2.5	Resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos: adaptação e adaptação cruzada	24
	REFERÊNCIAS	27
	CAPÍTULO 2 ADAPTAÇÃO HOMÓLOGA E HETERÓLOGA DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE <i>CRONOBACTER SAKAZAKII</i> A ÓLEOS ESSENCIAIS	37
1	INTRODUÇÃO	37
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1	Óleos essenciais (OE)	41
2.2	Microrganismo, manutenção, padronização do inóculo	41
2.3	Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais sobre células planctônicas	42
2.4	Avaliação da capacidade de adaptação homóloga e heteróloga de <i>Cronobacter sakazakii</i> aos óleos essenciais	42
2.4.1	Indução de resposta ao estresse de células de <i>Cronobacter sakazakii</i> a concentrações subletais de óleos essenciais	42
2.4.2	Avaliação da resposta ao estresse (adaptação) de <i>Cronobacter sakazakii</i> aos óleos essenciais	43
2.4.3	Avaliação do desenvolvimento de adaptação heteróloga de <i>Cronobacter sakazakii</i> aos óleos essenciais	43
2.5	Adesão de células de <i>Cronobacter sakazakii</i> em placas de poliestireno	44
2.5.1	Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMBs) dos óleos essenciais sobre células sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i>	44
2.6	Avaliação da capacidade de adaptação homóloga e heteróloga das células sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i> aos óleos essenciais	44
2.6.1	Indução a resposta ao estresse de células sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i>	44
2.6.2	Avaliação da resposta ao estresse (adaptação homóloga) de células sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i> aos óleos essenciais	45
2.6.3	Avaliação do desenvolvimento da adaptação heteróloga de células sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i> aos óleos essenciais	45
2.7	Delineamento experimental	46
3	RESULTADOS	47
3.1	Concentração mínima bactericida de óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de <i>C. sakazakii</i>	47
3.2	Adaptação homóloga de células planctônicas e sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i> aos óleos essenciais	47
3.3	Adaptação heteróloga de células planctônicas e sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i> a concentrações subletais de óleos essenciais	49
4	DISCUSSÃO	50
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Cronobacter sakazakii é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae. Esta espécie não faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal humano ou animal e é reconhecida como um potencial patógeno emergente de origem alimentar (FARBER, 2004).

Infecções associadas com significativa morbidade e mortalidade, principalmente entre recém-nascidos, têm sido associadas a *Cronobacter sakazakii*. As infecções causadas por *C. sakazakii* são importantes causas de risco de morte, podendo causar meningite, septicemia e enterocolite necrosante em lactentes. São mais comuns em recém-nascidos e bebês, entre os quais estão, geralmente, associados a mau prognóstico. Taxas de mortalidade entre 33% a 80% foram relatadas e infecções por *C. sakazakii* também estão associadas com morbidade significativa, podendo deixar sequelas graves (KIM et al., 2008).

Lactentes e crianças pequenas são especialmente vulneráveis às infecções transmitidas por alimentos. Portanto, a segurança das crianças e o acompanhamento da qualidade microbiológica de fórmulas infantis são de extrema importância (KIM; KLUMPP; LOESSNER, 2007).

A presença de *C. sakazakii* em equipamentos e utensílios pode ser decorrente de sua capacidade de aderir às superfícies e formar biofilmes, Iversen e Forsythe (2004) investigaram e comprovaram essa capacidade de cepas de *C. sakazakii* em formar biofilme em materiais comumente encontrados tanto em ambiente industrial como doméstico, tais como silicone, látex, policarbonato e aço inoxidável.

Quando microrganismos patogênicos e deterioradores participam do processo de formação de biofilme, podem contaminar produtos alimentícios, causando danos à saúde do consumidor e provocar grandes prejuízos econômicos (CHARACKLIS, 1990). Biofilmes formados por microrganismos patogênicos têm sido considerados de grande importância no contexto da segurança alimentar, despertando o interesse de inúmeros grupos de pesquisa (GANDARA; OLIVEIRA, 2000; SHARMA; ANAND, 2002; SHI; ZHU, 2009; ZOTOLLA; SASAHARA, 1994).

Devido à resistência apresentada por biofilmes a antissépticos convencionais e sanificantes, a demanda por novos antimicrobianos para o controle dos mesmos tem aumentado. Com isso, as atenções estão se voltando cada vez mais para o uso de compostos

naturais com atividade antimicrobiana, o que instigou algumas pesquisas com relação aos efeitos de fitoquímicos. Entre esses estudos, há crescente pesquisa com relação aos óleos essenciais (CHORIANOPOULOS et al., 2008).

As características de adaptação ao estresse apresentado por *C. sakazakii*, mostram que pouco se sabe a respeito da capacidade adaptativa homóloga e heteróloga desta bactéria. Diante do exposto este estudo tem a finalidade de avaliar a adaptação homóloga e heteróloga de células planctônicas e sésseis de *Cronobacter sakazakii* aos óleos essenciais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Cronobacter sakazakii*

Cronobacter é um gênero de bactérias Gram-negativas, aeróbias facultativas, não formadoras de endósporos, possuem motilidade e pertencem a família *Enterobacteriaceae*. Atualmente, sete espécies são conhecidas: *Cronobacter sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. dublinensis*, *C. muytjensii*, *C. turicensis*, *C. condimenti*, e *C. universalis* (IVERSEN et al., 2007, 2008; JOSEPH et al., 2012; STEPHAN et al., 2014). Com exceção de *C. condimenti*, todas as espécies de *Cronobacter* foram isoladas de espécies clínicas. As espécies de *Cronobacter* com significado clínico grave são: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis* e *C. universalis*. Os outros membros do gênero (*C. dublinensis*, *C. muytjensii* e *C. condimenti*) são principalmente comensais ambientais com baixa significância clínica (FORSYTHE, 2018; HOLÝ et al., 2011, 2014; HOLÝ; FORSYTHE, 2014; IVERSEN et al., 2007; KUCEROVA et al., 2010).

Cronobacter spp. são patógenos oportunistas que causam doenças raras, porém potencialmente fatais, como meningite, enterocolite necrosante e septicemia em recém-nascidos e bebês. A taxa de letalidade da meningite, em crianças, foi estimada em 41,9%, com a morte ocorrendo em poucas horas após a manifestação dos sintomas (FRIEDEMANN, 2009; HOLÝ; FORSYTHE, 2014; WILLIS; ROBINSON, 1988). Os sobreviventes geralmente desenvolvem sequelas irreversíveis, incluindo complicações neurológicas graves, como tetraplegia e desenvolvimento mental prejudicado (BOWEN; BRADEN, 2006). Bebês até dois meses de idade, prematuros com baixo peso ao nascer ou recém-nascidos imunocomprometidos estão mais propensos a essa infecção (HOLÝ et al., 2019).

Os Centros de Prevenção de Doenças e Controle estimam que as taxas de casos fatais de infecção por *C. sakazakii* chegam a 40% (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2017) e, embora, sejam raros os casos provavelmente são subnotificados (PATRICK et al., 2014). A aquisição de infecções neonatais por *C. sakazakii* tem sido atribuída ao consumo de fórmulas infantis em pó (CAUBILLA-BARRON et al., 2007; CDC, 2001; COIGNARD et al., 2004; KALYANTANDA; SHUMYAK; ARCHIBALD, 2015; LAI, 2001; VAN ACKER et al., 2001) porque *C. sakazakii* sobrevive aos estresses osmóticos, dessecação e extremos de temperatura (BAUMGARTNER et al., 2009; OSAILI; FORSYTHE, 2009; PAVA-RIPOLL et al., 2012; SANI; ODEYEMI, 2015).

Cronobacter possui natureza ubíqua e o habitat natural não foi claramente determinado, mas sugere-se que esses microrganismos não façam parte da microbiota natural dos animais e que a água, o solo e os vegetais são as principais fontes ambientais, sendo que as fontes de contaminação e o modo de transmissão não são muito claros (FARMER et al., 1980).

Tal espécie bacteriana é considerada como patógeno oportunista e está associada a quadros infecciosos em neonatos que, embora raros, são frequentemente letais. A termotolerância de algumas cepas pode garantir a sua sobrevivência e desse modo, promover a contaminação de fórmulas infantis desidratadas, as quais têm sido identificadas como potenciais fonte de infecção (ORIESKOVA et al., 2016).

O primeiro surto de *C. sakazakii* ligado à fórmula infantil em pó, a partir de uma lata fechada, foi em 2001 (CDC, 2001; HIMELRIGHT et al., 2002; WEIR, 2002). Em outro surto, a bactéria não foi encontrada no produto (leite em pó) e sim no misturador utilizado para preparar a fórmula reidratada (NORIEGA et al., 1990). Sendo assim, sugeriu-se que a contaminação pode ter surgido a partir de lotes anteriores da referida fórmula.

No Brasil, Santos (2006) avaliou 86 amostras de fórmula infantil em pó, 20 fórmulas reconstituídas e 5 amostras de amido. Destas, em 12 (14%) amostras de fórmulas em pó e em 4 (80%) amostras de amido foi detectado *C. sakazakii*.

Estudo realizado na maternidade de um hospital da cidade de São Paulo, Brasil, foi avaliada a população de *Cronobacter sakazakii* e de enterobactérias em amostras de fórmula infantil em pó e reconstituídas, ambientes das cozinhas, água, mamadeiras, utensílios e mãos dos manipuladores. O *C. sakazakii* foi encontrado em fórmula infantil em pó, em resíduos de mamadeira e em esponja utilizada no hospital (PALCICH et al., 2009).

As fórmulas infantis em pó têm sido consumidas com segurança por crianças há mais de 50 anos e constitui cerca de 80% do volume desse alimento consumido no mundo todo. Como não é um produto estéril, pode conter baixos níveis de patógenos oportunistas, como, por exemplo, *C. sakazakii* (UNITED STATES OF AMERICA - USA, 2002).

A atividade de água (a_w) de fórmula infantil em pó é baixa, igual a 0,2, o que garante sua estabilidade (BREEUWER et al., 2003). Por outro lado, tem sido demonstrado que *C. sakazakii* tem resistência notável em meio seco por períodos de até dois anos (CAUBILLA-BARRON; IVERSEN; FORSYTHE, 2004). Esse recurso representa uma vantagem competitiva, facilitando a sua prevalência em produtos com baixo teor de água (EDELSON-MAMMEL; PORTEUS; BUCHANAM, 2005). *Cronobacter* spp. pode acumular solutos, tais

como trealose, que protege o microrganismo contra o estresse osmótico, estabilizando a sua membrana (BREEUWER et al., 2003).

Kandhai et al. (2004), na Holanda, verificaram que *C. sakazakii* pode estar amplamente distribuído, tanto no ambiente doméstico como no industrial (fabricas produtoras de leite em pó, massas, cereais, chocolate, farinha de batata e condimentos). O microrganismo foi isolado em 35 unidades de 147 amostras provenientes de 9 fábricas e em 16 casas avaliadas.

A presença de *C. sakazakii* em equipamentos e utensílios pode ser decorrente de sua capacidade de aderir às superfícies e formar biofilmes. Iversen, Lane e Forsythe (2004) investigaram o potencial de cepas de *C. sakazakii* em formar biofilme, em materiais comumente encontrados no ambiente industrial e doméstico, tais como silicone, látex, policarbonato e aço inoxidável. A formação de biofilme foi verificada em todos os materiais.

Kim, Ryu e Beuchat (2006a) demonstraram a formação de biofilme de *C. sakazakii* em aço inoxidável e em tubos de alimentação enteral, quando estes eram imersos em fórmula infantil. Já Iversen, Lane e Forsythe (2004) estudaram a capacidade de *C. sakazakii* se multiplicar, quando cultivada em fórmula infantil em temperatura de refrigeração e de formar biofilmes a 37°C, em superfícies como látex, silicone e, em menor quantidade, no aço inoxidável.

A capacidade de *C. sakazakii* em formar biofilme, combinada à sua alta resistência ao estresse osmótico pode favorecer a sua persistência no ambiente, após a colonização nos equipamentos utilizados no preparo dos alimentos (LEHNER; STEPHAN, 2004).

Mais de 90% das infecções têm sido relacionadas com a ingestão de fórmulas infantis em pó contaminadas (PIF) (SINGH; GOEL; RAGHAV, 2015). O patógeno possui capacidade de formar biofilmes em tubos de alimentação enteral, silício, aço inoxidável, policarbonato, vidro e cloreto de polivinila (PVC) para sobreviver às condições estressantes de crescimento (KIM; RYU; BEUCHAT, 2006b). De acordo com o órgão norte-americano National Institutes of Health (NIH, 2002), aproximadamente 80% de todas as infecções no mundo estão associadas a biofilmes, especialmente, envolvendo biomateriais.

2.2 Biofilmes bacterianos

A descrição dos biofilmes bacterianos vem sendo discutida em muitos sistemas desde a invenção do microscópio por Antonie van Leeuwenhoek, em 1675, quando foi realizada a análise de dentes de animais pequenos. Mas, a teoria geral da existência de biofilmes só foi

publicada em 1978, por meio de um estudo realizado por Costerton, Geesey e Cheng. A partir dessa publicação, foi observado que várias bactérias não se desenvolvem igualmente quando comparadas como células individuais, mas sim, em comunidades estruturadas, como exemplo, possuíam organismos pseudomulticelulares, ou melhor, biofilmes, onde estariam presentes em todos os ecossistemas naturais e patogênicos (COSTERTON et al., 1981; LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

A capacidade de adaptação em ambientes diferentes e variabilidade metabólica fazem parte das características fundamentais de microrganismos presentes em biofilmes. Pode-se definir que as bactérias possuem dois estados básicos de vida: como células planctônicas, que podem ser caracterizadas como células de vida livre, e tem metabolismo mais ativo e as células sésseis, que são as células que compõe os biofilmes, que possuem um metabolismo mais compensado. As células planctônicas são essenciais para garantir rápida proliferação e pode resultar na disseminação dos microrganismos para outros locais, por outro lado as células sésseis têm a característica de cronicidade (CONSTERTON et al., 1981).

Existe na natureza o biofilme bacteriano que tem muitas características fenotípicas diferentes das bactérias planctônicas, tais como aumento da resistência ao estresse ambiental. Vários componentes são considerados envolvidos na formação de biofilmes, como flagelos, fímbrias e substâncias poliméricas extracelulares (LEHNER et al., 2005). Além disso, o biofilme de *C. sakazakii* na superfície de contato com alimentos ou as células hospedeiras fornecem uma defesa física, protegendo-as de maior resistência ao estresse, incluindo falta de água, alta temperatura, alta voltagem e muitos antibióticos. A incapacidade na eliminação ou remoção de biofilme microbiano pode elevar o risco de contaminação (ANNOUS; FRATAMICO; SIMITH, 2008).

Os biofilmes podem ser definido como uma comunidade de microrganismos sésseis embebidos em matriz polimérica extracelular (HARRISON; TURNER; CERI, 2005), caracterizada por células aderidas irreversivelmente a uma superfície ou interface e que exibem alteração fenotípica em relação ao crescimento planctônico (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Eles representam a parte majoritária de toda a vida microbiana, tanto em quantidade como em termos de atividade (XAVIER et al., 2003).

Os biofilmes microbianos ocorrem naturalmente nos mais variados tipos de ambientes, sejam eles bióticos, como tecidos vegetais e animais ou abióticos, como rochas, metais e polímeros diversos. A opção por sua constituição está no fato de que estes, por meio da formulação de micro-hábitats, oferecem proteção aos indivíduos que dele fazem parte contra as intempéries e estresses do meio ambiente (COSTERTON; STEWART; GREENBERG,

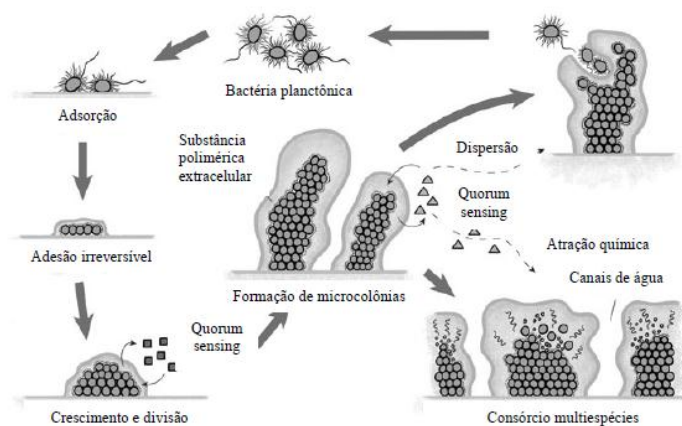
1999; JOHNSON, 2007; MADDULA et al., 2006). Os biofilmes constituem uma barreira física, protegendo as células de inúmeros fatores de estresse ambiental, como luz ultravioleta (UV), estresse osmótico, calor, inanição, detergentes ácidos, antibióticos, fagócitos, anticorpos e bacteriófagos. Esta comunidade de células bacterianas fechadas, encerradas em uma matriz polimérica de produção própria e aderida a uma superfície viva ou inerte, constitui um modo protegido de crescimento que permite a sobrevivência em ambientes hostis (LEHNER et al., 2005).

A matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), também chamada de glicocálix, é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme. Sua composição química, heterogênea e complexa (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007), determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Ainda que haja a predominância de polissacarídeos (WATNICK; KOLTER, 2000), ela também pode ser constituída por proteínas, como glicoproteínas, ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico) e fosfolipídios (GUIBAUD et al., 2008).

Vários microrganismos deterioradores e patogênicos são capazes de aderir e formar biofilme em diversos tipos de superfícies. Na indústria de alimentos, o grupo de maior predominância é o das bactérias, cujas elevadas taxas de multiplicação, grande capacidade de adaptação e produção de substâncias e estruturas extracelulares as tornam aptas à formação de biofilme (CHARACKLIS, 1990; NITSCHKE; COSTA, 2007).

O processo de formação de biofilme é caracterizado por diferentes etapas como mostrado na figura 1.

Figura 1 - Formação de biofilme.



Fonte: Harrison, Turner e Ceri (2005).

Durante o primeiro estágio, as moléculas orgânicas e inorgânicas presentes no meio circundante são transportadas até a superfície por intermédio de difusão ou fluxo turbulento; o acúmulo dessas substâncias à superfície, denominado de filme condicionante, representa importante papel na aderência bacteriana, uma vez que pode alterar as propriedades físico-químicas da superfície (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). A formação do biofilme tem início com adesão primária das bactérias em sua forma planctônica a uma determinada superfície, este processo é considerado complexo, pois ocorre através de interações físico-químicas não específicas entre a bactéria e a superfície abiótica (inanimada, plástico e metais por exemplo). Esta interação ocorre aleatoriamente, através de força gravitacional, movimento browniano ou de forma ordenada, através de mecanismos de cada patógeno como quimiotaxia e motilidade através de flagelos e pili, este estado é reversível, assim, por interações físico-químicas não específicas de longo alcance entre os mesmos, incluindo forças hidrodinâmicas, hidrofóbicas, eletrostáticas, força de van Walls e força de atração e repulsão entre esta interação, que será o fator primordial para determinação desta fase de adesão. No entanto, estes mecanismos ainda estão em fases de estudo e não totalmente elucidados (MORAES et al., 2013; TRENTI; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Na segunda etapa, um grande número de células aderidas reversivelmente permanece imobilizado e torna-se adsorvido irreversivelmente. Vale ressaltar que o processo de adesão pode ocorrer dentro de poucos minutos ou poucas horas. Na etapa seguinte ocorre a divisão celular, aumentando rapidamente a população. Nesse estágio, a presença de expolissacarídeos e de cátions divalentes propicia forte ligação entre as células, formando o biofilme maduro.

O processo de maturação do biofilme é constituído por significativo aumento da densidade populacional, produção e adsorção das substâncias presentes na matriz de EPS que funcionam como adesivos dos microrganismos colonizadores secundários (CLONTS, 2008), possibilitando o acréscimo em sua espessura (CHENG et al., 2007). São fatores determinantes na maturação do biofilme a difusão de oxigênio, osmolaridade, pH interno, disponibilidade e transporte de nutrientes, bem como a excreção de substâncias tóxicas às células (CARPENTIER; CERF, 1993; O'TOOLE; KOLTER, 1998).

Os biofilmes maduros são ecossistemas altamente organizados em que canais de água que se encontram dispersos e fornecem passagem para a troca de nutrientes, metabólitos, oxigênio e produtos de excreção. A comunidade do biofilme pode compreender apenas uma espécie bacteriana ou múltiplas espécies, arranjadas em camadas únicas de células ou em estruturas tridimensionais (SAUER; RICKARD; DAVIES, 2007). Posteriormente, ocorre a

produção de enzimas, que rompem partes do biofilme, que podem iniciar outro processo de adesão em substrato fresco (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Após a fase de amadurecimento, pode ocorrer um evento de destacamento de células do biofilme marcando a transição do estado sésil para o planctônico (CLONTS, 2008), fato que possibilita colonizar novas superfícies, disseminando bactérias patogênicas (WALTER et al., 2013). O desprendimento das células do biofilme é dado por mecanismos físicos como descamação de grandes frações do biofilme, perda contínua de aglomerados de células por erosão ou remoção por colisão de partículas sobre a superfície (DERLON et al., 2008). Outros fatores, como ação de enzimas degradantes da matriz, resposta fenotípica e moléculas sinalizadoras podem ativar mecanismos de liberação das células sésseis (PEREIRA, 2014).

Outra interessante teoria é proposta por Shi e Zhu (2009), que abordaram a formação de biofilmes microbianos, enfatizando sua ocorrência em indústrias alimentícias. Segundo estes autores, a formação de biofilmes microbianos em ambiente de processamento de alimentos é um processo complexo. Inicialmente, moléculas orgânicas provenientes do alimento são depositadas sobre a superfície de equipamentos formando o filme condicionante. Em seguida, microrganismos ativos biologicamente aderem à superfície condicionada, atraídos pelas moléculas orgânicas. Algumas células microbianas persistem mesmo após a limpeza e a sanitização e iniciam o crescimento do biofilme. Por último, forma-se o biofilme maduro com a ajuda da expressão de genes específicos e *quorum sensing*. Para se evitar a formação de biofilmes na indústria de alimentos são essenciais o estabelecimento e a adequação das medidas de higiene e sanitização (ARAÚJO, 2011).

O crescimento não desejado de biofilmes tem impacto negativo em várias atividades. Danos em equipamentos devido à biocorrosão, à contaminação de produtos, às perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, à resistência acrescida a transferências de calor e às perdas de pressão são alguns dos efeitos adversos do acúmulo de biofilmes microbianos e representam perdas significativas para indústrias, em âmbito global. Tais problemas são agravados pela resistência aumentada a métodos de desinfecção e limpeza que os biofilmes demonstram, comparados com células bacterianas livres. Assim, os métodos convencionais de desinfecção não são suficientes e requerem, por vezes, doses elevadas de desinfetantes, indesejados do ponto de vista ambiental (SIMÕES; PEREIRA; VIEIRA, 2003).

Os principais microrganismos envolvidos nos processos de contaminações de alimentos são as bactérias, pois atuam sobre numerosos tipos de substratos, com diferentes temperaturas, pH e condições do meio ambiente. Tendo em vista os problemas de resistência de microrganismos a antibióticos e desinfetantes convencionais, e diante da atual tendência do

mercado de utilizar produtos ecologicamente seguros, o emprego de óleos essenciais para a conservação de alimentos e controle fitossanitário vem sendo muito estudado, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias alimentícias (PEREIRA et al., 2008; SACCHETTI, 2004).

2.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de vários componentes voláteis, formados pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas e conhecidos pela sua solubilidade em solventes orgânicos apolares e pelo seu aroma agradável e intenso (MALINOWSKI, 2010). Esses constituintes dos óleos essenciais, tais como monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois, estão geralmente relacionados com a defesa da planta contra pragas, fungos e bactérias. Os óleos essenciais e as plantas aromáticas não só são conhecidos pelos seus variados usos em relação ao sabor e à fragrância, como também pelo emprego com finalidades conservantes, antioxidantes e antimicrobianas (HARKAT-MADOURI et al., 2015).

Na natureza, os óleos essenciais exercem importante papel na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e contra herbívoros. Podem agir também atraindo insetos para favorecer a dispersão de pólenes e sementes ou repelir aqueles indesejáveis (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais vêm ganhando espaço devido à sua utilização crescente nas áreas de alimentos (condimentos, antioxidantes, aromatizantes de alimentos e bebidas), cosméticos (perfumes e produtos de higiene), atuando no controle de microrganismos, como bactericidas, fungicidas e virucidas, bem como no controle de nematoides, insetos e parasitas (ALTOÉ, 2012).

Simões et al. (2007) definem os óleos essenciais, como os produtos obtidos de partes de plantas, por meio de destilação por arraste com vapor d'água, assim como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De maneira geral, são misturas de substâncias orgânicas voláteis, de consistência semelhante ao óleo, definida por um conjunto de propriedades, entre as quais se destacam volatilidade, aroma agradável e solubilidade em solventes orgânicos apolares, entre outras. Assim, diferem dos óleos fixos, que são misturas de triacilglicerídeos, obtidos geralmente de sementes. São denominados de essências, óleos etéreos ou óleos voláteis. Quando recentemente extraídos, são incolores ou ligeiramente amarelados; alguns podem apresentar coloração intensa, como o óleo de camomila, que é azul intenso, devido à presença dos derivados do azuleno.

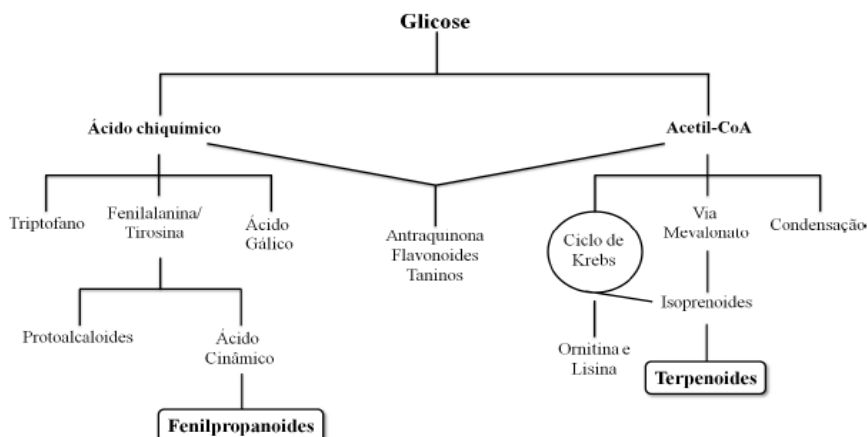
A composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal pode variar com diversos fatores, como por exemplo, com a época da colheita, condições climáticas e de solo (BRUM, 2010). A intensidade de produção e a composição também variam de acordo com a espécie, a variabilidade genética, os fatores ambientais, sendo, geralmente, específicos para um determinado órgão e característicos para o estágio de desenvolvimento da planta. Podem ser consideradas moléculas lipofílicas, de baixo peso molecular, constituídas de uma ou mais insaturações, instáveis à temperatura e à luz, podendo ser degradadas ou sofrer polimerização (GUIMARÃES et al., 2008).

Há, ainda, os fatores relacionados ao processo de colheita do material vegetal e de extração do óleo essencial, que podem interferir diretamente no seu rendimento. Souza et al. (2011) notaram que o horário de coleta interfere no rendimento de óleo essencial para a espécie *Cordia verbenacea* DC. Em dias chuvosos, de maneira geral, o rendimento de óleo essencial é reduzido, para a maioria das espécies (GOBBO NETO; LOPES, 2007). Teles et al. (2012) verificaram que há diferenças no rendimento de óleo essencial e na composição química deste, em amostras de *Lippia alba* (Mill) N.E. processadas frescas ou submetidas a método de secagem.

Os óleos essenciais podem ser obtidos a partir da prensagem do conjunto dos invólucros que envolvem uma semente ou fruto, o chamado pericarpo, ou por métodos de destilação por arraste de vapor, hidrodestilação, sendo este último o mais utilizado. Outros métodos que podem ser utilizados são a extração com solventes orgânicos e extração com fluídos supercríticos (PEREIRA, 2010).

A constituição química é caracterizada por terpenóides e fenilpropanóides (SIMÕES; SPITZER, 2004). Os terpenóides são encontrados com maior frequência e compreendem todas as substâncias, cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (2-metil1,3-butadieno) e são sintetizadas pela via do mevalonato. Os compostos terpênicos, comumente encontrados em óleos essenciais, são os monoterpenos (cadeia de dez carbonos) e os sesquiterpenos (cadeia de quinze carbonos), formados por duas e três unidades de isopreno respectivamente. A origem dos metabólitos secundários ocorre a partir da via glicolítica por dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (SANTOS, 2004) conforme demonstrado na Figura 2:

Figura 2 - Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários.



Fonte: Simões et al. (2007).

Os óleos essenciais são constituídos por uma complexa mistura de compostos, incluindo terpenos, álcoois, cetonas, fenóis, ácidos, aldeídos e ésteres (AYALA-ZAVALA et al., 2009). Segundo Simões et al. (2004), esses constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços).

Em virtude da grande variedade de moléculas presentes em extratos naturais, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais não pode ser atribuída a um único mecanismo. Em vez disso, diferentes mecanismos bioquímicos e estruturais estão envolvidos em locais múltiplos no interior e na superfície da célula (BURT, 2004).

2.4 Ação antibacteriana dos óleos essenciais

A resistência de patógenos humanos às drogas antimicrobianas tem-se destacado como um dos mais graves problemas de saúde pública, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS, 2018). Como alternativas para resolver esse problema, surge a necessidade de descobertas terapêuticas que contribuam para o desenvolvimento da saúde, em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas, a partir de fontes naturais.

Os óleos essenciais de plantas aromáticas e condimentares surgem como medida alternativa eficaz no controle e remoção de biofilmes no setor alimentício, devido as suas conhecidas propriedades antimicrobianas de seus princípios ativos. O uso de óleos essenciais como bioconservantes é de grande importância, principalmente na indústria de alimentos visto que os consumidores preferem aditivos naturais ao invés de sintéticos (LANG; BUCHBAUER, 2012).

Em virtude da grande variedade de moléculas presentes, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais não pode ser atribuída a um único mecanismo. Em vez disso, diferentes mecanismos bioquímicos e estruturais estão envolvidos em locais múltiplos no interior e na superfície da célula (BURT, 2004).

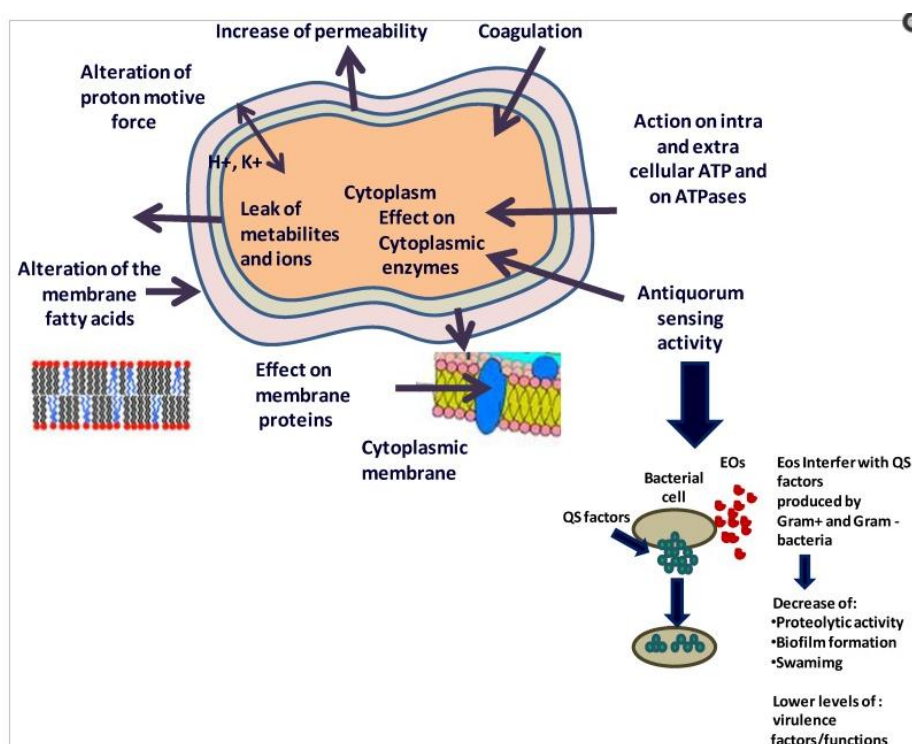
Considerando que os óleos essenciais são formados por diversos constituintes, torna-se difícil atribuir a eficácia da atividade antimicrobiana a apenas um deles. O mecanismo de ação de um dado constituinte pode diferir, quando comparado ao de outros, sendo relatados vários alvos na célula microbiana (AYALA-ZAVALA et al., 2009). A interação inicial entre os componentes dos óleos essenciais e a célula microbiana parece ser a difusão passiva da molécula componente, por meio da parede celular de bactérias gram-positivas e fungos ou membrana externa de bactérias gram-negativas (HAMMER; CARSON, 2011). Contudo, pode ocorrer, também, interação de constituintes dos óleos essenciais com a membrana externa de bactérias gram-negativas, conforme demonstrado por La Storia et al. (2011), que utilizaram carvacrol contra diferentes espécies bacterianas.

Óleos essenciais são compostos tipicamente lipofílicos e, por isso, são capazes de passar pela parede celular e se acumular na membrana citoplasmática bacteriana, causando aumento da permeabilidade, por danificar a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidos (BAKKALI et al., 2008). O aumento da fluidez da membrana parece estar entre os primeiros efeitos antimicrobianos causados pelo tratamento com óleos essenciais. A expansão e o aumento da fluidez da membrana citoplasmática podem levar à quebra da integridade com consequente perda de pequenos componentes intracelulares, como hidrogênio, potássio e sódio. A perda destes íons está associada ao decréscimo do potencial de membrana, pH intracelular e *pool* de ATP, causado pelo dano ao gradiente de íons que ocorre entre o interior e exterior da célula. Concentrações elevadas de óleos essenciais ou longos tempos de exposição podem acarretar danos maiores à membrana citoplasmática, ocasionando perda de macromoléculas, como DNA e proteínas, estritamente relacionadas à morte celular (HAMMER; CARSON, 2011).

Ainda, segundo Ayala-Zavala et al. (2009) e Burt (2004), o mecanismo de ação dos óleos essenciais, fenômeno complexo e diversificado, pode incluir destruição da parede celular e membrana citoplasmática, danificação de proteínas de membrana, liberação de conteúdo celular, coagulação do citoplasma, depleção da força próton motiva, inativação de enzimas essenciais e perturbação da funcionalidade do material genético.

Na figura 3, são descritos alguns potenciais mecanismos de ação dos óleos essenciais e/ou seus componentes, com os potenciais alvos celulares da sua atividade antimicrobiana. No entanto, cada uma dessas ações não pode ser considerada eventos separados, mas em vez disso pode ser uma consequência das outras atividades (NAZZARO et al., 2013).

Figura 3 - Principais locais e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana.



Fonte: Nazzaro et al. (2013).

O mecanismo de ação pelo qual a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito antibacteriano envolve a parede celular bacteriana, em que os óleos essenciais desnaturam e coagulam proteínas. Mais especificamente, eles atuam alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons hidrogênio (H^+) e potássio (K^+). A alteração dos gradientes de íons conduz ao comprometimento dos processos vitais da célula como transporte de elétrons, translocação de proteínas, processo de fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e,

consequentemente, na morte do microrganismo (DORMAN; DEANS, 2000 citados por BONA et al., 2012).

Em estudo realizado por Amalaradjou e Venkitanarayanan (2011), o biofilme de *C. sakazakii*, formado sobre superfícies abióticas, foi inibido e inativado por trans-cinamaldeído.

A ação inibitória das especiarias e de seus óleos nos diferentes microrganismos tem sido relatada em diversos estudos (OATTARA et al., 1997). O interesse renovado no uso de especiarias como agentes antibacterianos é atribuído, basicamente, a duas razões: a segurança dos aditivos químicos é constantemente questionada, havendo uma tendência ao uso de substâncias naturais de plantas, e a redução do sal ou do açúcar em alimentos por razões dietéticas tende a aumentar o uso de outros temperos (ISMAIEL; PIERSON, 1990).

Além dos recentes estudos da manipulação de óleos com ação antimicrobiana, têm-se avaliado diferentes misturas de óleos essenciais, a fim de comprovar os seus níveis de sinergismo ou antagonismo, visto que não se pode afirmar que o componente majoritário é o que realiza a atividade biológica, podendo haver a interação entre os diferentes componentes do óleo. Além disso, o estudo dessas misturas de óleos tem a finalidade de maximizar a atividade e minimizar as concentrações para não haver interferência diante das características sensoriais dos alimentos, bem como se podem constituir bases para a produção de conservantes de alimentos naturais (NGUEFACK et al., 2012).

2.5 Resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos: adaptação e adaptação cruzada

A resistência antimicrobiana é definida como a resistência de microrganismos a um agente antimicrobiano contra o qual eles foram originalmente sensíveis (BRIG et al., 2015). O surgimento da resistência antimicrobiana é uma questão complexa, multifatorial. A falta de compreensão dos potenciais perigos do uso inadequado, bem como o acesso generalizado a antimicrobianos, podem ter levado ao estado atual dessa crise de resistência antimicrobiana. O uso inadequado de antibióticos constitui uma série de definições, que variam de prescreve-los desnecessariamente, uma dose ou droga incorreta. O uso não regulamentado de antibióticos em áreas não médicas, como a agricultura, complica ainda mais esse problema de resistência e continua a ser uma prática controversa (HWANG; GUMS, 2016; LAXMINARAYAN et al., 2013).

A produção de alimentos, em escala industrial, proporcionou também aumento da resistência dos microrganismos, facilitando o aparecimento e a disseminação da resistência

devido ao uso intensivo de agentes antimicrobianos, sanificantes e do comércio internacional de animais e de produtos alimentícios, cuja principal rota de transmissão entre animais e seres humanos ocorre através de produtos alimentares, embora outras formas de transmissão, como contato direto e ambiente, também possam ocorrer (AARESTRUP; WEGENER; COLLIGNON, 2008). O processo natural de resistência antimicrobiana existe nos microrganismos por muitos anos (FAIR; TOR, 2014). A evidência sugeriu que os elementos de resistência identificados no DNA bacteriano podem ser rastreados há milhares de anos mesmo antes da introdução da penicilina (FAIR; TOR, 2014; HWANG; GUMS, 2016). A resistência através da penicilinase bacteriana foi identificada; indicando que os microrganismos provavelmente têm propensão intrínseca para a resistência armazenada dentro do seu genoma (DAVIES; DAVIES, 2010).

É notório que a exposição subletal a condições ambientais e/ou substâncias antimicrobianas pode resultar no desenvolvimento de um aumento da resistência e da promoção da resistência cruzada para compostos antimicrobianos (RUSSELL, 1984; YUK; MARSHALL, 2004). Resistência cruzada ocorre quando o mecanismo de resistência é o mesmo para diversos agentes bacterianos, ou seja, diferentes agentes antimicrobianos atacam o mesmo alvo na célula, atingindo uma via comum para a morte celular, ou compartilham uma rota comum de acesso aos seus respectivos alvos (CHAPMAN, 2003). Deve-se mencionar que o estresse subletal induz o desenvolvimento e crescimento do microrganismo condicionado ao estresse, tornando-o fisiologicamente mais tolerante em níveis aumentados do mesmo ou proteção cruzada a outros estressores (HWANG; GUMS, 2016; SMIGIC et al., 2009).

A resistência antimicrobiana é um problema de segurança alimentar, representando risco direto quando o microrganismo patogênico resistente se encontra no alimento ingerido ou indiretamente quando a resistência é transmitida de uma bactéria comensal do alimento para outra patogênica ao homem. O monitoramento da resistência aos antimicrobianos e o uso prudente de antibióticos em animais e em humanos em todos os setores é o aspecto chave para a prevenção e controle da resistência antimicrobiana (GUARDABASSI; KRUSE, 2008).

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 (BRAOUDAKI; HILTON, 2005; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; RUSSELL, 2003). O fenômeno de resistência cruzada pode ocorrer quando diferentes agentes antimicrobianos têm o mesmo alvo na célula, atingem rota comum de acesso aos respectivos

alvos ou iniciam uma via comum para a morte celular, ou seja, o mecanismo de resistência é o mesmo para mais de um agente antibacteriano (CHAPMAN, 2003). Evidências moleculares e fisiológicas apontam que bactérias patogênicas de origem alimentar podem suportar e adaptarem-se a estresses subletais e, como consequência, tornarem-se resistentes a níveis anteriormente letais do agente estressante ou exibir proteção cruzada contra outros (LANDAU; SHAPIRA, 2012).

Novas medidas no controle de microrganismos devem ser tomadas, com o intuito de encontrar biocidas com amplo espectro de ação. Desde a antiguidade, as plantas e seus extratos, tais como os óleos essenciais, têm sido utilizados na medicina popular. Os óleos essenciais representam uma alternativa no controle de microrganismos patogênicos e/ou deteriorante pois mostram ação antimicrobiana comprovada (BEHBAHANI et al., 2018; DIAS et al., 2015; MIRANDA et al., 2016; NAZZARO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C.; COLLIGNON, P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 6, p. 733-750, 2008.
- ALTOÉ, T. F. **Sustentabilidade de plantações de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) na produção e qualidade de óleo essencial**. 2012. 154 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- AMALARADJOU, M. A. R.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 74, n. 2, p. 200-208, Feb. 2011.
- ANNOUS, B. A.; FRATAMICO, P. M.; SIMITH, J. I. Scientific status summary. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, p. R24-R37, 2008.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2011. 601 p.
- AYALA-ZAVALA, J. F. et al. Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. **Journal of Food Science**, Malden, v. 74, n. 7, p. R84-R91, Sept. 2009.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Sept. 2008.
- BAUMGARTNER, A. et al. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, London, v. 136, p. 189-192, 2009.
- BEHBAHANI, B. A. et al. *Oliveria decumbens* essential oil: chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. **Microbial Pathogenesis**, New York, v. 114, p. 449-452, 2018.
- BONA, T. D. M. M. et al. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeriae* *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 411-418, maio 2012.
- BOWEN, A. B.; BRADEN, C. R. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 8, p. 1185-1189, 2006.
- BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 31-37, Jan. 2005.
- BREEUWER, P. et al. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 967-973, Nov. 2003.

BRIG, J. A. K. et al. Antimicrobial resistance: a public health challenge. **Medical Journal Armed Forces India**, New Delhi, v. 71, n. 2, p. 178-181, Apr. 2015.

BRUM, L. F. W. **Obtenção e avaliação de extratos de folhas de eucalipto (*Eucalyptus dives*) como potenciais antioxidantes em alimentos**. 2010. 135 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

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

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 75, n. 6, p. 499-511, Dec. 1993.

CAUBILLA-BARRON, J. et al. Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 3979-3985, 2007.

CAUBILLA-BARRON, J.; IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. J. The desiccation survival of *Enterobacter sakazakii* and related Enterobacteriaceae. **American Society for Microbiology**, New Orleans, v. 3, p. 23-27, May 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Cronobacter**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/Cronobacter/technical.html>>. Acesso em: 20 jul. 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. ***Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula**. Tennessee, 2001. 300 p.

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

CHARACKLIS, W. G. Laboratory biofilm reactors. In: CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (Ed.). **Biofilms**. New York: J. Wiley, 1990. p. 55-89.

CHENG, G. et al. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 28, n. 29, p. 4192-4199, Oct. 2007.

CHORIANOPOULOS, N. G. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bacteria effect of essential oil and hydrosol of *Stureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1596, Dec. 2008.

CLONTS, L. Como evitar a formação de biofilmes. **Revista Controle de Contaminação**, São Paulo, v. 109, p. 50-56, maio 2008.

COIGNARD, B. et al. Infections sévères à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourrissons, France, octobre-décembre. 2004. Disponível em: http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=5062>. Acesso em: 7 fev. 2018.

COSTERNON, J. W. et al. The bacterial glycocalix in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 35, p. 299-304, Jan. 1981.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 74, p. 417-433, 2010.

DERLON, N. et al. Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. **Water Research**, New York, v. 42, n. 8/9, p. 2102-2110, Apr. 2008.

DIAS, N. A. A. et al. Antimicrobial activity of essential oil on *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 35, p. 466-472, Mar. 2015.

EDELSON-MAMMEL, S. G.; PORTEOUS, M. K.; BUCHANAN, R. L. Survival of *E. sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 9, p. 1900-1902, Sept. 2005.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, Auckland, v. 6, p. S14459, 2014.

FARBER, J. M. *E. sakazakii*: new foods for thought? **Lancet**, London, v. 363, n. 9402, p. 5-6, Jan. 2004.

FARMER, J. J. et al. *Enterobacter sakazakii*: a new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 30, n. 3, p. 569-584, July 1980.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. The EPS matrix: the house of biofilm cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, p. 7945-7947, Nov. 2007.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. 623-633, Aug. 2010.

FORSYTHE, S. J. Updates on the Cronobacter Genus. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 9, n. 1, p. 23-44, 2018.

FRIEDEMANN, M. Epidemiology of invasive neonatal Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*) infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 28, n. 11, p. 1297-1304, 2009.

GANDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 1-7, abr. 2000.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, Bethesda, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, Sept. 2008.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. (Ed.). **Guide to antimicrobial use in animals**. Hoboken: Blackwell, 2008. p. 1-12.

GUIBAUD, G. et al. Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains. **Colloids and Surfaces**, Washington, v. 63, p. 48-54, May 2008.

GUIMARÃES, L. G. de L. et al. Influência de luz e temperatura na oxidação de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, nov./dez. 2008.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: THORMAR, H. (Ed.). **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. West Sussex: J. Wiley, 2011. p. 255-306.

HARRISON, J. J.; TURNER, R. J.; CERI, H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, Ottawa, v. 7, n. 7, p. 981-994, July 2005.

HIMELRIGHT, I. et al. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001. **Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 287, n. 14, p. 2204-2205, 2002.

HOLÝ, O. et al. Antibiotic susceptibility of Cronobacter spp. isolated from clinical samples. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 68, n. 1, Mar. 2019. Disponível em: <https://www.exeley.com/polish_journal_of_microbiology/doi/10.21307/pjm-2019-001>. Acesso em: 10 maio 2019.

HOLÝ, O. et al. Epidemiology of Cronobacter spp. isolates from patients admitted to the Olomouc University Hospital (Czech Republic). **Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie**, Olomouc, v. 63, n. 1, p. 69-72, 2014.

HOLÝ, O. et al. Isolation of Cronobacter spp. (formerly Enterobacter sakazakii) from nostrils of healthy stable horse: short communication. **Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie**, Olomouc, v. 60, n. 4, p. 167-169, 2011.

HOLÝ, O.; FORSYTHE, S. Cronobacter spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 86, n. 3, p. 169-177, 2014.

HWANG, A. Y.; GUMS, J. G. The emergence and evolution of antimicrobial resistance: impact on a global scale. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 24, n. 24, p. 6440-6445, 2016.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 1-24, Jan. 2012.

ISMAIEL, A.; PIERSON, M. D. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum*33A, 40B, and 1623E by essential oil of spices. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 6, p. 1676-1678, 1990.

IVERSEN, C. et al. Cronobacter gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies 1*, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 58, n. 6, p. 1442-1447, 2008.

IVERSEN, C. et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies 1*. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, n. 1, p. 64, 2007.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. J. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 771-777, Dec. 2004.

IVERSEN, C.; LANE, M.; FORSYTHE, S. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* in infant formula milk. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 378-382, 2004.

JOHNSON, L. R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 251, n. 1, p. 24-34, Jan. 2007.

JOSEPH, S. et al. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 62, n. Pt 6, p. 1277-1283, 2012.

KALYANTANDA, G.; SHUMYAK, L.; ARCHIBALD, L. K. Cronobacter species contamination of powdered infant formula and the implications for neonatal health. **Frontiers in Pediatrics**, Lausanne, v. 3, p. 56, 2015.

KANDHAI, M. C. et al. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. **Lancet**, London, v. 363, n. 9402, p. 39-40, Jan. 2004.

- KIM, H.; RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 9, p. 5846-5856, 2006a.
- KIM, H.; RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Survival of *Enterobacter sakazakii* on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its elimination. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 134-143, Sept. 2006b.
- KIM, K. et al. Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 196-203, Sept. 2008.
- KIM, K. P.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M. J. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 1/2, p. 195-203, Feb. 2007.
- KUCEROVA, E. et al. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 3, p. e9556, 2010.
- LA STORIA, A. et al. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, Paris, v. 162, n. 2, p. 164-172, Feb./Mar. 2001.
- LAI, K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. **Case Reports and a Review of the Literature**, Baltimore, v. 80, p. 113-122, 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**, Washington, v. 78, n. 15, p. 5361-5367, Aug. 2012.
- LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 27, n. 1, p. 13-39, Jan. 2012.
- LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance: the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.
- LEHNER, A. et al. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 11, p. 2287-2294, Nov. 2005.
- LEHNER, A.; STEPHAN, R. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 12, p. 2850-2857, 2004.
- HARKAT-MADOURI, L. et al. **Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria**. New York: Elsevier, 2015.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Perspectives in Biology**, Cold Spring Harbor, v. 2, n. 2, p. 1-11, Feb. 2010.

MADDULA, V. S. R. K. et al. Quorum sensing and phenazine are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (aureofaciens) strain 30-84. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, n. 2, p. 289-301, Aug. 2006.

MALINOWSKI, L. R. L. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de eucalyptus globulus labill. subespécie bicostata (maiden et al.) J. B. Kirkpat., Myrtaceae**. 2010. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 213-220, jan./mar. 2016.

MORAES, M. N. et al. Mecanismos de adesão bacteriana aos biomateriais. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 99-10, jan. 2013.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Research on microbial biofilms**: número PA: PA-03-047. Bethesda, 2002. Disponível em: <<http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>>. Acesso em: 10 maio 2019.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oil on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, p. 1451-1474, 2013.

NGUEFACK, A. J. et al. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, Guildford, v. 23, n. 2, p. 377-383, 2012.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 252-259, May 2007.

NORIEGA, F. R. et al. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 9, p. 447-449, 1990.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent, signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 28, n. 3, p. 449-461, Apr. 1998.

OATTARA, B. et al. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 37, n. 2/3, p. 155-162, 1997.

OLIVEIRA, M. M. et al. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed in stainless steel surfaces. **European Food Research & Technology**, Berlin, v. 234, n. 5, p. 821-832, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Novos dados revelam níveis elevados de resistência aos antibióticos em todo o mundo**. Brasília, DF, 2018.

ORIESKOVA, M. et al. Contribution of the thermotolerance genomic island to increased thermal tolerance in Cronobacter strains. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 109, n. 3, p. 405-414, 2016.

OSAILI, T.; FORSYTHE, S. Desiccation resistance and persistence of Cronobacter species in infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, London, v. 136, p. 214-220, 2009.

PALCICH, G. et al. *Enterobacter sakazakii* in dried infant formulas and milk kitchens of maternity wards in São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 1, p. 37-42, 2009.

PALMER, J.; FLINT, S. H.; BROOKS, J. D. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Hampshire, v. 34, n. 9, p. 577-588, Sept. 2007.

PATRICK, M. E. et al. Incidence of Cronobacter spp. infections, United States, 2003-2009. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, p. 1536-1539, 2014.

PAVA-RIPOLL, M. et al. Prevalence and relative risk of Cronobacter spp., Salmonella spp., and Listeria monocytogenes associated with the body surfaces and guts of individual filth flies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p. 7891-7902, 2012.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PEREIRA, A. de A. **Estudo da atividade bactericida de óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de Salmonella spp.** 2014. 94 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

PEREIRA, J. L. **Composição química dos óleos essenciais de espécies de Eucalyptus L'Hert (Myrtaceae)**. 2010. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the response of microorganisms to biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 52, n. 5, p. 750-763, Sept. 2003.

RUSSELL, N. J. Mechanism of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. **Trends in Biochemical Science**, Amsterdam, v. 9, p. 108-112, 1984.

SACCHETTI, G. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 621-632, 2004.

- SANI, N. A.; ODEYEMI, O. A. Occurrence and prevalence of Cronobacter spp. in plant and animal derived food sources: a systematic review and meta-analysis. **Springerplus**, Heidelberg, v. 4, p. 545, 2015.
- SANTOS, R. F. S. **Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis para lactentes em hospital e maternidades da região de Campinas/SP**. 2006. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários. In: SIMOES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2004. p. 467-495.
- SAUER, K.; RICKARD, A. H.; DAVIES, D. G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe**, Washington, v. 2, n. 7, p. 347-353, 2007.
- SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry: a case. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 6/7, p. 469-477, Sept./Oct. 2002.
- SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 20, n. 9, p. 407-413, Sept. 2009.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2007. 1104 p.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMOES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2004. p. 467-495.
- SIMÕES, M.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different bow regimes. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 217-223, 2003.
- SINGH, N.; GOEL, G.; RAGHAV, M. Prevalence and characterization of Cronobacter spp. from various foods, medicinal plants, and environmental samples. **Current Microbiology**, New York, v. 71, n. 1, p. 31-38, 2015.
- SMIGIC, N. et al. Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 with lactic acid, neutralized electrolyzed oxidizing water 42 and chlorine dioxide followed by growth under sub-optimal conditions of temperature, pH and modified atmosphere. **Food Microbiology**, London, v. 26, p. 629-637, 2009.
- SOUZA, M. F. et al. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Biotemas**, Florianópolis, v. 24, n. 1, p. 9-14, 2011.

STEPHAN, R. et al. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 64, n. Pt10, p. 3402-3410, 2014.

TELES, S. et al. Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 247-252, 2012.

TRENTI, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013.

UNITED STATES OF AMERICA. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Health professionals letter on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units.** Washington, 2002. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

VAN ACKER, J. et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 293-297, 2001.

WALTER, M. et al. Detachment characteristics of a mixed culture biofilm using particle size analysis. **Chemical Engineering Journal**, Netherlands, v. 228, n. 15, p. 1140-1147, July 2013.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 10, p. 2675-7679, May 2000.

WEIR, E. Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 166, n. 1570, p. 1570, June 2002.

WILLIS, J.; ROBINSON, J. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 7, n. 3, p. 196-199, 1988.

XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 76, p. 1-12, abr. 2003.

YUK, H. G.; MARSHALL, D. L. Adaptation of *Escherichia coli* O157: H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 7, p. 3500-3505, June 2004.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry: should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 125-148, Oct. 1994.

CAPÍTULO 2

ADAPTAÇÃO HOMÓLOGA E HETERÓLOGA DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *CRONOBACTER SAKAZAKII* A ÓLEOS ESSENCIAIS

1 INTRODUÇÃO

Cronobacter sakazakii é uma bactéria que tem se destacado em ambientes hospitalares, como contaminante de fórmulas infantis, levando a morte de neonatos. Devido ao seu impacto nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, em 2004, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), após três encontros de grupos de especialistas de avaliação de risco, sugeriu o controle desse patógeno de origem alimentar (FORSYTH; DICKINS; JOLLEY, 2014) no mundo todo. Essa foi a primeira situação onde a OMS interferiu no controle de um patógeno de origem alimentar.

Embora seja principalmente conhecido por afetar neonatos, *C. sakazakii* pode contaminar pessoas de diferentes idades e condições (bebês, imunocomprometidos e idosos), vários tipos de infecções e sintomas, com taxa de morte de até 40%. Em bebês, com menos de 12 meses de idade, normalmente se observa sepse ou meningite grave, entretanto, convulsões, abscessos cerebrais, infarto, hidrocefalia e outras complicações neurológicas podem ocorrer. Nas pessoas imunocomprometidas e idosos observam-se infecções na corrente sanguínea (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2017).

Em revisão sistematizada realizada por Friedemann (2007), é mostrado que *C. sakazakii* pode estar presente em diversos alimentos, não apenas em fórmulas infantis, sendo encontrado em cereais, frutas, legumes, leguminosas, ervas e especiarias, bem como em alimentos de origem animal, como leite, carne e peixe e seus derivados. O espectro de alimentos contaminados abrange alimentos crus e processados, podendo serem frescos, congelados, prontos para consumo, fermentados e cozidos, bebidas e água. Dessa forma, a importância de seu controle na indústria alimentícia se destaca.

Uma das formas de controle de bactérias patogênicas como *C. sakazakii* nos ambientes de processamento e produto final é pela utilização de agentes sanificantes. Entretanto, fatores como pH, atividade de água, potencial de oxidação-redução, temperatura de armazenamento e disponibilidade de oxigênio, apresentam-se como agentes estressores que diminuem a chance de sobrevivência de *C. sakazakii*. Outro estressor comumente usado é o conservante que,

somado aos fatores intrínsecos e extrínsecos e a higienização fazem parte de um complexo ambiente que atua sobre os microrganismos, auxiliando na conservação e segurança dos alimentos.

Os vários processos utilizados na indústria visando a saúde do consumidor também podem apresentar tendência de proporcionar o surgimento de bactérias tolerantes (ou adaptadas ao estresse), persistentes ou resistentes (BRAUNER et al., 2016). A maioria das bactérias também possui a capacidade de formar biofilmes, fator que favorece o aumento de sua tolerância aos agentes estressores no ambiente de processamento (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013).

A resposta adaptativa ou adaptação ao estresse confere aos microrganismos a habilidade de resistir melhor aos efeitos danosos do agente estressor, quando são previamente expostos a ele em baixas concentrações, ou seja, em condições subletais. Nessas condições, ocorrem mudanças fisiológicas temporárias que, frequentemente resultam no aumento da tolerância àquele estresse (homóloga) ou a outro fator estressante (adaptação heteróloga) (BEGLEY; HILL, 2015).

Cronobacter sakazakii apresenta capacidade adaptativa homóloga e heteróloga a vários agentes estressores, além de ser capaz de formar biofilme sobre várias superfícies. Existem estudos que avaliam a adaptação de *C. sakazakii* em diferentes condições como adaptação homóloga ao estresse térmico (ARKU; FANNING; JORDAN, 2011) e heteróloga ao estresse ácido (HSIAO; HO; CHOU, 2010), o aumento de tolerância ao estresse oxidativo acompanhado do aumento de sua virulência (KIM et al., 2015). Sua capacidade de se adaptar aos agentes bactericidas, como biguanidina polihexametileno e ao triclosan (COWLEY et al., 2015), bem como a adaptação aos sanificantes quaternário de amônio e a base de cloro, após exposição ao calor (47°C por 15min.) (LI et al., 2013). Normalmente, o desenvolvimento de adaptação homóloga e heteróloga é mediado por reguladores de resposta ao estresse que levam a respostas complexas envolvendo a indução de genes reguladores, síntese de enzimas e proteínas específicas relacionadas ao estresse que protegem e reparam o DNA, alteram a parede celular, a membrana citoplasmática, mantêm a homeostase celular, dentre outros (WESCHE et al., 2009).

Devido a capacidade de adaptação das bactérias ao estresse causado tanto por sanificantes quanto outros estressores, vários estudos têm sido realizados buscando antimicrobianos alternativos, destacando-se nesse contexto os óleos essenciais. Vários deles apresentaram atividade antimicrobiana sobre *C. sakazakii*, com destaque para os óleos de

Mentha piperita, *Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum camphora* (VALE, 2015; VALERIANO et al., 2012).

A grande vantagem que os óleos essenciais possuem sobre outros agentes antimicrobianos é sua composição, pois são compostos naturais oriundas do metabolismo secundário de diversas espécies vegetais. De modo geral, são misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações variáveis. Geralmente, um deles é o componente majoritário, chegando a representar 80% ou mais da composição do óleo essencial, existindo outros em menores teores ou apenas em traços (BAKKALI et al., 2008). Seus constituintes químicos podem ser agrupados em duas grandes classes: (1) derivados de terpenóides, formados por meio da rota do acetato-ácido mevalônico ou da via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) e (2) compostos aromáticos, formados por meio da rota do ácido chiquímico, os fenilpropanoides (BOUNATIROU et al., 2007; DEWICK, 2009).

Esses diferentes componentes presentes nos óleos essenciais, apresentam mecanismos de ação diferenciados sobre a célula bacteriana, sendo relatadas alterações na membrana citoplasmática, força próton-motriz, DNA, parede celular, produção de ATP, síntese de proteínas, mudanças intracitoplasmáticas e bloqueio do sistema *quorum sensing* (FALEIRO, 2011; NAZZARO et al., 2013), desfavorecendo assim, a recuperação celular ou a adaptação homóloga e heteróloga.

Ampla revisão realizada por Souza (2016) mostra que pouco se sabe a respeito da capacidade adaptativa homóloga e heteróloga de bactérias causadoras de toxinfecções alimentares, sendo a maior parte dos artigos publicados relacionados apenas com a ação letal dos óleos essenciais e de seus componentes majoritários. Entretanto, outros trabalhos têm surgido com essa temática. A adaptação homóloga e heteróloga de *Listeria monocytogenes* e *L. innocua* a concentrações subletais dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e noz moscada e ao pH foi avaliada e comprovada (SANTOS et al., 2018). *Salmonella* Senftenberg também foi capaz de se adaptar ao linalool e ao óleo de manjeriço (KALILY et al., 2017). A adaptação aos óleos de *Origanum vulgare*, *Melaleuca alternifolia*, *Cinnamomum cassia* e *Thymus vulgaris* foi relatada para *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MELO et al., 2015). Dois isolados de *Staphylococcus aureus*, de quarto testados, foram capazes de se adaptar ao carvacrol (NOSTRO et al., 2017) e *L. monocytogenes* ATCC 19117 apresentou adaptação homóloga e heteróloga ao carvacrol e ao eugenol (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015). Pode-se observar que a adaptação homóloga e heteróloga de

bactérias aos óleos essenciais ou aos seus componentes majoritários é dependente da cepa avaliada. Dessa forma, estudos com várias cepas de várias espécies devem ser realizados para a avaliação real da segurança da utilização desses antimicrobianos naturais.

Embora relatos tenham sido encontrados a respeito da resposta adaptativa das bactérias aos óleos essenciais, não foram encontrados trabalhos realizados com *C. sakazakii*. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a adaptação homóloga e heteróloga de células planctônicas e sesséis de *C. sakazakii* aos óleos essenciais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleos essenciais (OE)

Os óleos essenciais de Canela (*Cinnamomum cassia*), Menta (*Mentha piperita*) e Ho wood (*Cinnamomum camphora*) foram adquiridos da Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). Na tabela 1 estão apresentados os constituintes majoritários dos óleos utilizados, de acordo com o fornecedor.

Tabela 1 - Componentes majoritários dos óleos essenciais utilizados.

Nome popular	Nome científico	Componente
Canela	<i>Cinnamomum cassia</i>	Aldeído cinâmico (81%), cumarina (3%), benzaldeído (3%), álcool cinâmico (3%), estireno (3%).
Menta	<i>Mentha piperita</i>	l-mentol (34%), mentona (25%), acetato de mentila (5%), eucaliptol (9%).
Ho wood	<i>Cinnamomum camphora</i>	Linalol (98 %).

Fonte: Da autora (2019).

2.2 Microrganismo, manutenção, padronização do inóculo

O microrganismo utilizado no trabalho foi *Cronobacter sakazakii* INCQS 00115 (ATCC 29004), obtido na Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). A cultura estoque foi armazenada em meio de congelamento (glicerol - 15 mL; peptona bacteriológica - 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL) durante o desenvolvimento do trabalho.

A cultura foi reativada, inoculando-se alíquotas de 10 µL em tubos contendo 10 mL de caldo tripton de soja (TSB), sendo incubada a 37°C por 24 horas. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento em TSB e incubação a 37°C. A cultura foi padronizada em cerca de 10^8 UFC mL⁻¹ pelo acompanhamento da absorbância (D.O. 600nm) e plaqueamento em ágar tripton de soja (TSA), com incubação a 37°C por 24 horas.

2.3 Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais sobre células planctônicas

A concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em placas de poliestireno com 96 cavidades, de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), com modificações. Soluções contendo os óleos essenciais nas concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,0 e 16,00% (v/v) foram elaboradas em TSB acrescido de 0,5% (v/v) de Tween 80. Em cada cavidade contendo 140 μL de solução inoculou-se 10 μL da cultura padronizada. Incubou-se as placas a 37°C por 24 horas. Após esse período, alíquotas das culturas foram plaqueadas em TSA e incubadas a 37°C por 24 horas. Foi realizado um tratamento controle, contendo TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e inóculo.

A CMB de cada óleo essencial foi definida como sendo aquela onde não houve crescimento em TSA após 24h de cultivo. O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições.

2.4 Avaliação da capacidade de adaptação homóloga e heteróloga de *Cronobacter sakazakii* aos óleos essenciais

2.4.1 Indução de resposta ao estresse de células de *Cronobacter sakazakii* a concentrações subletais de óleos essenciais

Culturas de *C. sakazakii* foram expostas a concentrações subletais dos óleos essenciais, sendo definidas 1/8 e 1/16 da CMB de cada óleo (DI PASQUA et al., 2010; SANTOS et al., 2018).

Em tubos tipo Falcon contendo 10 mL de TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 foram adicionados os óleos essenciais nas concentrações subletais. Após homogeneização, alíquotas de 1 mL de cultura padronizada foram inoculadas e os tubos foram incubados a 37 °C por 6 horas. Após incubação, as culturas foram centrifugadas a 5.000 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado, as células foram lavadas e ressuspensas em solução de NaCl 0,85% (m/v). As suspensões foram padronizadas em, aproximadamente, 10^8 UFC.mL⁻¹, utilizando-se o padrão de turvação de 0,5 da escala de MacFarland. As células recuperadas foram denominadas adaptadas.

2.4.2 Avaliação da resposta ao estresse (adaptação) de *Cronobacter sakazakii* aos óleos essenciais

Após a indução ao estresse das células de *Cronobacter sakazakii* aos agentes estressores em concentração subletais (1/8 e 1/16 da CMB) de cada óleo essencial, as células adaptadas foram cultivadas em presença do mesmo agente estressor, nas concentrações de 0;0,5 CMB; CMB; 1,2 CMB; 1,4 CMB; 1,6 CMB; 1,8 CMB e 2,0 CMB.

Alíquotas de 10 µL das suspensões de células adaptadas foram transferidas para as cavidades das microplacas contendo soluções de 140 µL de TSA acrescido de 0,5% de Tween 80 e de OE. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, alíquotas de 10 µL das culturas foram plaqueadas em TSA empregando-se a técnica de microgotas e incubadas a 37 °C por 24 horas. As células de *C. sakazakii* foram classificadas como capazes de se adaptarem quando apresentaram crescimento em placas em concentrações iguais ou maiores que a CMB do agente estressor. O controle foi realizado com células de *C. sakazakii* não expostas a concentrações subletais, possibilitando a comparação entre células expostas e não expostas, quanto à susceptibilidade aos óleos essenciais.

2.4.3 Avaliação do desenvolvimento de adaptação heteróloga de *Cronobacter sakazakii* aos óleos essenciais

Após a indução ao estresse das células de *C. sakazakii* aos agentes estressores em concentração subletais (1/8 e 1/16 da CMB) de cada óleo essencial, as células adaptadas foram cultivadas em presença de agente estressor diferente do qual foi adaptada anteriormente, nas concentrações de 0;0,5CMB; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2,0CMB.

Alíquotas de 10 µL das suspensões de células adaptadas foram transferidas para as cavidades das microplacas contendo soluções de 140 µL de TSA acrescido de 0,5% de Tween 80 e de OE. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após incubação, alíquotas de 10 µL das culturas foram plaqueadas em TSA empregando-se a técnica de microgotas e incubadas a 37°C por 24 horas. As células de *C. sakazakii* foram classificadas como capazes de se adaptarem quando apresentaram crescimento em placas referente aos ensaios com concentrações iguais ou maiores que a CMB do agente estressor. O controle foi realizado com células de *C. sakazakii* não expostas a concentrações subletais, possibilitando a comparação entre células expostas e não expostas, quanto à susceptibilidade aos óleos essenciais.

2.5 Adesão de células de *Cronobacter sakazakii* em placas de poliestireno

A adesão de células da bactéria nas cavidades das placas de poliestireno foi realizada segundo Oliveira et al. (2012).

Alíquotas de 50 µL da cultura padronizada foram inoculadas em 150 µL de TSB contidos nas cavidades das microplacas e incubadas a 37 °C por 48 horas. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução salina 0,85% (m/v) e secas ao ar.

2.5.1 Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMBs) dos óleos essenciais sobre células sésseis de *Cronobacter sakazakii*

Às células sésseis contidas nas cavidades das placas de poliestireno foram adicionados 200 µL de soluções aquosas contendo 0,5% de Tween 80 e óleos essenciais nas concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,0 e 16,00% (v/v). Após 20 minutos de contato, removeu-se as soluções antimicrobianas e as cavidades lavadas três vezes com solução salina (0,85% m/v). Adicionou-se as cavidades 200 µL de TSB e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após cultivo, realizou-se o plaqueamento das culturas em TSA e incubou-se a 37 °C por 24 horas. A CMBs de cada óleo essencial ficou definida como sendo aquela onde não houve crescimento em TSA após 24h de cultivo. Realizou-se um tratamento controle, contendo água destilada acrescida de 0,5% de Tween 80.

O experimento foi conduzido em triplicata e com três repetições.

2.6 Avaliação da capacidade de adaptação homóloga e heteróloga das células sésseis de *Cronobacter sakazakii* aos óleos essenciais

2.6.1 Indução a resposta ao estresse de células sésseis de *Cronobacter sakazakii*

A adesão de células da bactéria nas cavidades das placas de poliestireno seguiu a metodologia realizada segundo Oliveira et al. (2012) com modificações.

Inoculou-se alíquotas de 50 µL da cultura padronizada em 150 µL de soluções de TSB acrescidas de 0,5% de Tween 80 e concentrações subletais (1/8 e 1/16 da CMBs) dos óleos essenciais, contidas nas cavidades das microplacas e incubadas a 37 °C por 48 horas. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução

salina 0,85% (m/v) e secas ao ar. Após esse procedimento, as células sésseis nas cavidades são denominadas adaptadas.

2.6.2 Avaliação da resposta ao estresse (adaptação homologa) de células sésseis de *Cronobacter sakazakii* aos óleos essenciais

As células sésseis adaptadas foram submetidas a diferentes concentrações dos óleos essenciais. Adicionou-se alíquotas de 200 µL de soluções aquosas acrescidas de 0,5% de Tween 80 (v/v) e óleos essenciais nas concentrações de 0; 0,5 CMBS; 1,0 CMBS; 1,2 CMBS; 1,4 CMBS; 1,6 CMBS; 1,8 CMBS e 2,0 CMBS nas cavidades. Após 20 minutos de contato, as soluções foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v). Em seguida, adicionou-se 200 µL de TSB às cavidades e as microplacas incubadas a 37°C por 24h. Após incubação, alíquotas de 10 µL das culturas contidas nas cavidades foram plaqueadas em TSA e incubadas a 37°C por 24h.

Classificou-se as células sésseis de *C. sakazakii* como capazes de se adaptarem quando apresentaram crescimento após exposição a concentrações iguais ou maiores que a CMBS do agente estressor. Realizou-se o controle com células sésseis não expostas a concentrações subletais, possibilitando a comparação entre as células expostas e não expostas, quanto à susceptibilidade aos óleos essenciais.

2.6.3 Avaliação do desenvolvimento da adaptação heteróloga de células sésseis de *Cronobacter sakazakii* aos óleos essenciais

Utilizou-se as células sésseis previamente adaptadas aos óleos essenciais.

A capacidade de adaptação cruzada foi avaliada pela exposição das células sésseis a agentes estressores aos quais não foram adaptadas anteriormente. Utilizou-se as concentrações dos óleos essenciais de 0,5 CMBS; 1,0 CMBS; 1,2 CMBS; 1,4 CMBS; 1,6 CMBS; 1,8 CMBS e 2,0CMBS. Os óleos foram homogeneizados em água destilada contendo 0,5% de Tween 80 (v/v).

Adicionou-se alíquotas de 200 µL das soluções de óleos essenciais às cavidades das microplacas. Após 20 minutos de contato, as soluções são removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de salina (0,85% m/v). Em seguida, adicionou-se 200 µL de TSB às cavidades e as microplacas incubadas a 37 °C por 24 horas. Após cultivo, plaqueou-se alíquotas de 10 µL das culturas em TSA e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Cronobacter sakazakii em estado séssil foi considerado capaz de desenvolver adaptação cruzada quando observado seu crescimento em placas após exposição a concentrações iguais e, ou, superiores a CMBS de cada óleo essencial.

2.7 Delineamento experimental

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) em todos os experimentos realizados.

3 RESULTADOS

3.1 Concentração mínima bactericida de óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de *C. sakazakii*

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de canela, menta, e ho wood sobre as células planctônicas e sésseis de *Cronobacter sakazakii* são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração mínima bactericida de óleos essenciais sobre células planctônicas (CMB) e sésseis (CMBS) de *Cronobacter sakazakii*.

Óleo essencial	CMB (%)	CMBS (%)
Canela	0,12	1,0
Menta	0,25	1,0
Ho wood	0,25	2,0

Fonte: Da autora (2019).

Os resultados apontam que os óleos essenciais apresentaram atividade bactericida em diferentes concentrações. O óleo essencial de canela a 0,125% (v/v) foi mais eficaz sobre as células planctônicas. Não foram encontradas diferenças entre as atividades bactericidas dos óleos de menta e ho wood, sendo a CMB de 0,25% (v/v). Entretanto as células sésseis se mostraram mais resistentes aos óleos essenciais, observando-se aumento nas CMBS, respectivamente, em 8,33; 4; e 8 vezes para os óleos de Canela, Menta e Ho wood.

3.2 Adaptação homóloga de células planctônicas e sésseis de *Cronobacter sakazakii* aos óleos essenciais

Foi observada resposta adaptativa de ambos os estados celulares, planctônico e sésil, de *Cronobacter sakazakii* aos OE de canela, ho wood e menta (Tabela 3).

Tabela 3 - Adaptação homóloga de células planctônicas e sésseis de *Cronobacter sakazakii* a concentrações subletais dos óleos essenciais de canela, ho wood e menta.

Agente estressor	Concentração subletal (%)		Agente estressor	Concentração letal (%)	
	CMB	CMBS		Células Planctônicas	Células Sésseis
	1/8	1/8			
Canela	0,015	0,125	Canela	0,06*	1,40**
Ho Wood	0,031	0,125	Ho Wood	0,45**	0,50*
Menta	0,031	0,25	Menta	0,50**	0,50*
	1/16	1/16			
Canela	0,008	0,063	Canela	0,192**	1,40**
Ho Wood	0,016	0,063	Ho Wood	0,45**	1,60*
Menta	0,016	0,125	Menta	0,45**	0,5*

* diminuição da CMB-ausência de adaptação; **aumento da CMB-adaptação

Fonte: Da autora (2019).

Em estado planctônico as células de *C. sakazakii* não apresentaram maior tolerância a concentração do óleo de canela após serem adaptadas a 1/8 da CMB. Entretanto, quando a concentração usada foi de 1/16 CMB houve o crescimento de *C. sakazakii* em concentrações maiores que a CMB (0,12%), sendo 0,192% o novo valor letal.

As células de *C. sakazakii* cresceram em concentração superior da CMB obtida para o óleo essencial de ho wood, passando de 0,25% para 0,45%, concentração 1,8 vezes maior do que aquela sem adaptação prévia a 0,031% do óleo. A mesma resposta foi observada após adaptação a 0,016%, dezesseis vezes menor que a CMB. Comportamento semelhante foi observado após exposição das células ao óleo de menta, na qual após a adaptação das células a 1/8 CMB (0,031%), a nova CMB foi 0,5%, duas vezes a CMB (0,25%) das células não adaptadas. Após serem adaptadas a 1/16 CMB (0,016%) do óleo de menta a concentração letal foi de 0,45% (1,8CMB), pouco mais sensível ao agente estressor do que aquelas células adaptadas a 1/8 da CMB.

Entretanto as células sésseis apresentaram comportamento bem diferenciado. Para o óleo de ho wood e menta, nas concentrações subletais de 1/8 CMBS, as células sésseis apresentaram-se mais sensíveis ao agente estressor, onde a concentração letal foi a metade do valor das CMBS.

A pré-exposição das células sésseis a 0,125% (1/16 CMBS) de óleo de menta, levou a maior sensibilidade celular ao agente estressor, com crescimento apenas no controle (apenas meio de cultura). Para o óleo de ho wood houve adaptação das células sésseis após exposição à 0,063% (1/16CMBS), pois na concentração de 1,60% do óleo (1,6CMBS) não houve crescimento.

No estado sésil, tanto para a adaptação a 1/8 quanto 1/16 CMBS dos óleos de canela, houve o mesmo aumento de tolerância da bactéria, passando a CMBS de 1 para 1,4%.

3.3 Adaptação heteróloga de células planctônicas e sésseis de *Cronobacter sakazakii* a concentrações subletais de óleos essenciais

As células planctônicas de *C. sakazakii* desenvolveram adaptação cruzada, ou seja, heteróloga entre óleos essenciais, exceto aquelas adaptadas em ambas as concentrações subletais de canela (0,015 e 0,008%) e cultivadas sequencialmente em presença do óleo de ho wood (Tabela 4). Nesse caso, as células passaram a ser mais sensíveis a esse óleo essencial.

Tabela 4 - Adaptação heteróloga de células planctônicas e sésseis de *Cronobacter sakazakii* a concentrações subletais dos óleos essenciais de canela, ho wood e menta.

Agente Estressor	Conc. subletal	Conc. (%)	Células Planctônicas		Células Sésseis	
			Fator letal	Conc. letal (%)	Fator letal	Conc. letal (%)
1/8						
canela		0,125	menta	0,4	menta	1,6
			ho wood	0,125*	ho wood	1,0*
ho wood		0,125	canela	0,192	canela	1,6
			menta	0,4	menta	1,6
menta		0,25	ho wood	>0,5	ho wood	4,0
			canela	>0,24	canela	>2,0
1/16						
canela		0,063	menta	0,45	menta	1,8
			ho wood	0,125*	ho wood	1,0*
ho wood		0,063	canela	0,216	canela	1,8
			menta	0,5	menta	2,0
menta		0,125	ho wood	>0,50	ho wood	>4
			canela	0,216	canela	1,8

*Diminuição da CMB ** Aumento da CMB

Fonte: Da autora (2019).

Avaliando-se a capacidade de adaptação heteróloga, apenas as células adaptadas ao óleo de canela, tanto em 1/8 quanto em 1/16 da CMB_S e posteriormente, cultivada em presença do óleo de Ho wood ficaram mais sensíveis ao mesmo óleo. Para todas as outras combinações foram observadas a capacidade de adaptação heteróloga.

4 DISCUSSÃO

A potencialidade do uso de óleos essenciais ou seus componentes majoritários na indústria alimentícia ou farmacêutica vem se mostrando cada vez maior, sendo os óleos essenciais de canela, menta e Ho wood promissores.

O óleo essencial de canela tem sua atividade antimicrobiana extensivamente pesquisada, sendo encontrados inúmeros trabalhos, mostrando sua efetividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; CALO et al., 2015). Trabalho realizado por (BERTHOLD-PLUTA et al., 2018) com diversos óleos essenciais, destaca a atividade bactericida dos óleos de tomilho e canela, sendo também o óleo de menta bem efetivo contra 14 cepas de *C. sakazakii*. No mesmo artigo é dado as concentrações mínimas inibitórias do timol, trans-cinamaldeído e mentol, sendo eles 0,05 para ambos, timol e trans-cinamaldeído e 0,8% para o mentol. Trans-cinamaldeído também apresentou ação antimicrobiana sobre células sésseis de *C. sakazakii* (ANNE; AMALARADJOU; VENKITANARAYANAN, 2011; ANNE et al., 2014).

A atividade antimicrobiana de *Mentha piperita*, seu componente majoritário o mentol, e o linalol componente majoritário do óleo de Ho wood também se destacam, sendo o linalol componente potencializador da atividade bactericida de vários óleos essenciais (HERMAN; TAMBOR; HERMAN, 2016; KAMATOU et al., 2013).

Foram encontrados trabalhos mostrando a sensibilidade do *C. sakazakii*, dentre outros componentes majoritários, ao linalol e trans-cinamaldeído, componentes majoritários dos óleos de ho wood e canela, respectivamente; ao citral e ao óleo essencial de canela, óleos essenciais e extratos de várias espécies de *Thymus* e ao óleo essencial de gerânio (FRAŇKOVÁ et al., 2014; LIU et al., 2017; SHI et al., 2016a, 2016b; SIENKIEWICZ et al., 2014).

Uma vez selecionados como bons bactericidas, estudos avaliando a resposta ao estresse de *C. sakazakii* são importantes, pois é sabido que a bactéria possui capacidade de adaptação homóloga e heteróloga a vários tipos de estresse subletais como pH, pressão osmótica, calor e ácidos orgânicos (AL-NABULSI et al., 2015; ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2014; BARRON; FORSYTHE, 2007).

As respostas adaptativas homóloga e heteróloga de *C. sakazakii* foram dependentes tanto do óleo quanto da concentração subletal utilizada, do tempo de adaptação, bem como de seu estado sésil ou planctônico.

A adaptação homóloga das células planctônicas ocorreu praticamente em todos os tratamentos, exceto para o estresse subletal de 1/8 CMB do óleo de canela. Fato interessante, pois após o referido estresse de 1/16 CMB, a adaptação homóloga ocorreu em todos os tratamentos. Essa resposta diferenciada pode ser explicada pelo nível de estresse que a concentração de 1/8 CMB do óleo de canela causou nas células. Nessa concentração, os componentes do óleo de canela podem ter afetado tanto a permeabilidade da membrana quanto atividades metabólicas, ocorrendo morte parcial das células e afetando a capacidade daquelas restantes em suportar o fator estressor (WESCHE et al., 2009).

A interligação entre intensidade de estresse e a capacidade de resposta celular a ele foi mostrada em estudo realizado com *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *L. monocytogenes*, onde a resposta adaptativa das células, quando submetida a concentrações subletais dos óleos essenciais de tomilho e orégano e aos componentes majoritários carvacrol, timol e citral, é dose-dependente estando ligada a alteração da composição dos ácidos graxos de membrana (SIROLI et al., 2015).

Sabe-se que a primeira barreira que as células utilizam quando expostas a estresse químico é a mudança da composição das membranas celulares, buscando, torna-las menos permeável ao agente, dessa forma ocorrem mudanças nos ácidos graxos e também nas porinas da membrana externa, quando se trata de bactérias Gram-negativas (BORE et al., 2007). A exposição a concentrações subletais de óleo essencial de orégano ou ao carvacrol promoveu lesão subletal em *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, levando ao aumento da síntese de ácidos graxos insaturados e isomerização cis-trans da membrana (MELO et al., 2014). A avaliação do proteoma de *Salmonella* Thompson após sua adaptação ao timol mostrou aumento de proteínas de membrana, sendo desencadeada pelo acúmulo de proteínas de membrana externa com dobramento incorreto (DI PASQUA et al., 2010), foi observado também up-regulação das proteínas OmpX e OmpA que estão associadas a membrana externa (PAPENFORT et al., 2006).

Trabalhos mostram que os óleos essenciais e seus componentes majoritários apresentam atividade anti-biofilme sobre bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *Salmonella* (MILLEZI et al., 2016; OH et al., 2017). Contudo, as células sésses de *C. sakazakii*, desenvolveram adaptação homóloga ao óleo essencial, em ambas as concentrações subletais utilizadas.

Os óleos de menta e ho wood promoveram o aumento da sensibilidade das células ao estressor. Em estudo realizado com concentrações subletais de trans-cinamaldeído em microplacas, *C. sakazakii* foi capaz de formar biofilme em presença das concentrações de 750

e 560 mM, entretanto com o passar do tempo, houve redução do número de células aderidas de 7,5 log UFC para 2,4 e 4,0 log UFC/mL após 96h de incubação a 24°C. Análises transcriptômicas revelaram que ambas as concentrações subletais de trans-cinamaldeído decrescem substancialmente a expressão dos genes envolvidos na formação do biofilme (AMALARADJOU; VENKITANARAYANAN, 2011a).

A capacidade de resposta ao estresse heteróloga dos microrganismos é bem conhecida, sendo de grande importância o seu estudo para garantir a utilização dos óleos essenciais de forma segura e eficaz na indústria. *C. sakazakii* possui essa capacidade, o que faz da bactéria grave problema, principalmente na indústria de alimentos em pó infantil.

Como observado nos resultados, a bactéria mostrou-se capaz da adaptação heteróloga aos óleos essenciais estudados, de modo geral. Não foram encontrados trabalhos relatando essa capacidade. Porém, o aumento da sensibilidade a vários estresses ambientais de cepas de *C. sakazakii* após cultivo em concentração sub-inibitória de trans-cinamaldeído é relatada. As cepas de *C. sakazakii* (ATCC 51329, CS 415 e CS 4581) não se adaptaram aos estresses térmico, ácido, elevada pressão osmótica e a dessecação, sendo relatada a supressão de vários genes considerados críticos para o aumento de tolerância ao estresse como *rpoS*, *phoP/Q*, para chaperoninas, porinas da membrana externa, e genes para proteínas transportadoras de osmólitos (AMALARADJOU; VENKITANARAYANAN, 2011b).

O estudo da capacidade de adaptação ao estresse relacionado com óleos essenciais é importante, pois se tem observado que o sistema de resposta ao estresse das células é interligado, onde a exposição das células a determinado agente estressor pode levar ao aumento de tolerância das células a vários outros agentes estressores como temperatura, pH, antibióticos e a outros óleos essenciais.

De maneira geral, *C. sakazakii* não apresentou grande resposta ao estresse causado pelos óleos essenciais testados, entretanto, trabalhos avaliando-se a adaptação heteróloga com outros fatores estressores ainda devem ser realizados.

5 CONCLUSÃO

Para células planctônicas, foi determinada CMB do óleo essencial de Canela a 0,125%, para Menta e Ho wood foi 0,25%. Para células sésseis foi 1,0% para Canela e Menta e 2,0% para Ho wood.

Houve adaptação homóloga na concentração subletal 1/8 para células planctônicas testadas com Ho wood e Menta. E na concentração subletal 1/16 para células planctônicas testadas com Canela, Ho wood e Menta. Para as células sésseis houve adaptação somente para o óleo de canela nas duas concentrações avaliadas.

Avaliando-se a capacidade de adaptação heteróloga, apenas as células adaptadas ao óleo de canela, tanto em 1/8 quanto em 1/16 da CMBS e posteriormente, cultivada em presença do óleo de Ho wood, ficaram mais sensíveis ao mesmo óleo. Para todas as outras combinações foram observadas a capacidade de adaptação heteróloga.

REFERÊNCIAS

- AL-NABULSI, A. A. et al. **Inactivation of Cronobacter sakazakii in reconstituted infant milk formula by plant essential oils**. 2015. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Inactivation-of-Cronobacter-sakazakii-in-infant-by-Al-Nabulsi-Awaisheh/a633a3932590b038820deeea56f540d99a886f02>>. Acesso em: 10 mar. 2018.
- ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Acid stress management by Cronobacter sakazakii. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 178, p. 21-28, 2014.
- AMALARADJOU, M. A. R.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 74, n. 2, p. 200-208, Feb. 2011a.
- AMALARADJOU, M. A. R.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of Trans-Cinnamaldehyde on reducing resistance to environmental stresses in Cronobacter sakazakii. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 8, n. 3, p. 403-409, Mar. 2011b.
- ANNE, M.; AMALARADJOU, R.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of trans-Cinnamaldehyde on Inhibition and Inactivation of Cronobacter sakazakii Biofilm on Abiotic Surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 74, n. 2, p. 200-208, 2011.
- ANNE, M. et al. Sub-inhibitory concentrations of trans-cinnamaldehyde attenuate virulence in Cronobacter sakazakii in Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 5, p. 8639-8655, 2014.
- ARKU, B.; FANNING, S.; JORDAN, K. Heat adaptation and survival of Cronobacter spp. (Formerly Enterobacter sakazakii). **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 8, n. 9, p. 975-981, Sept. 2011.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARRON, J. C.; FORSYTHE, S. J. Dry stress and survival time of Enterobacter sakazakii and other Enterobacteriaceae in Dehydrated powdered infant formula. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70, n. 9, p. 2111-2117, Sept. 2007.
- BEGLEY, M.; HILL, C. Stress adaptation in foodborne pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 6, n. 1, p. 191-210, 2015.
- BERTHOLD-PLUTA, A. et al. Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against Cronobacter strains. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 245, n. 5, p. 1137-1147, 2018.
- BORE, E. et al. Adapted tolerance to benzalkonium chloride in Escherichia coli K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. **Microbiology**, Cambridge, v. 153, n. 4, p. 935-946, Apr. 2007.

BOUNATIROU, S. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. **Food Chemistry**, London, v. 105, n. 1, p. 146-155, 2007.

BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 14, n. 5, p. 320-330, 2016.

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

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems: a review. **Food Control**, Guildford, v. 54, p. 111-119, Aug. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Cronobacter**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/Cronobacter/technical.html>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: twenty-second informational supplement. Wayne, 2012.

COWLEY, N. L. et al. Effects of formulation on microbicide potency and mitigation of the development of bacterial insusceptibility. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 81, n. 20, p. 7330-7338, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. New York: Wiley, 2009.

DI PASQUA, R. et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, Weinheim, v. 10, p. 1040-1049, 2010.

FALEIRO, M. L. The mode of antibacterial action of essential oils. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. New York: Formatex Research Center, 2011. p. 1143-1156.

FORSYTHE, S. S. J.; DICKINS, B. B.; JOLLEY, K. A. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age ; MLST and whole genome sequence analysis. **BMC Genomics**, London, v. 15, p. 1121, Dec. 2014.

FRAŇKOVÁ, A. et al. Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils toward *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 11, n. 10, p. 795-797, Oct. 2014.

FRIEDEMANN, M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages: other than infant formula and milk powder. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p. 1-10, May 2007.

FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013.

HERMAN, A.; TAMBOR, K.; HERMAN, A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. **Current Microbiology**, New York, v. 72, n. 2, p. 165-172, 2016.

HSIAO, W. L.; HO, W. L.; CHOU, C. C. Sub-lethal heat treatment affects the tolerance of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988 to various organic acids, simulated gastric juice and bile solution. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 2, p. 280-284, 2010.

KALILY, E. et al. Adaptation of *Salmonella enterica* Serovar Senftenberg to Linalool and its association with antibiotic resistance and environmental persistence. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 83, n. 10, p. e03398-16, May 2017.

KAMATOU, G. P. P. et al. Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. **Phytochemistry**, Oxford, v. 96, p. 15-25, Dec. 2013.

KIM, S. et al. hfq plays important roles in virulence and stress adaptation in *cronobacter sakazakii* ATCC 29544. **Infection and Immunity**, Washington, v. 83, n. 5, p. 2089-2098, May 2015.

LI, P. T. et al. Effect of heat shock on the fatty acid and protein profiles of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988 as well as its growth and survival in the presence of various carbon, nitrogen sources and disinfectants. **Food Microbiology**, London, v. 36, n. 2, p. 142-148, Dec. 2013.

LIU, Q. et al. Antibacterial and antifungal activities of spices. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 6, p. 1283, June 2017.

MELO, A. D. B. et al. Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 79, n. 4, p. 285-289, 2015.

MELO, A. N. F. de et al. Sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol cause injury and changes in membrane fatty acid of *Salmonella Typhimurium* cultivated in a meat broth. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 11, n. 5, p. 357-361, 2014.

MILLEZI, A. F. et al. Anti-biofilm and antibacterial effect of essential oils and their major compounds. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, Dehradun, v. 19, n. 3, p. 624-631, 2016.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oil on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NOSTRO, A. et al. Effects of adaptation to carvacrol on *Staphylococcus aureus* in the planktonic and biofilm phases. **Biofouling**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 470-480, July 2017.

- OH, S. Y. et al. Effects of essential oil (blended and single essential oils) on anti-biofilm formation of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Journal of Animal Science and Technology**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 4, Dec. 2017.
- OLIVEIRA, M. M. M. de et al. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. **Food and Bioproducts Processing**, Davis, v. 90, n. 4, p. 809-818, 2012.
- PAPENFORT, K. et al. E-dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 62, n. 6, p. 1674-1688, Dec. 2006.
- SANTOS, J. M. P. et al. Homologous and heterologous adaptation of *Listeria* spp. to essential oils of condiment plants. **Advances in Microbiology**, Amsterdam, v. 8, n. 8, p. 639-649, Aug. 2018.
- SHI, C. et al. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. **Plos One**, San Francisco, n. 2002, p. 1-12, 2016a.
- SHI, C. et al. Antimicrobial activity of syringic acid against *Cronobacter sakazakii* and its effect on cell membrane. **Food Chemistry**, London, v. 197, p. 100-106, 2016b.
- SIENKIEWICZ, M. et al. The antibacterial activity of geranium oil against Gram-negative bacteria isolated from difficult-to-heal wounds. **Burns**, London, v. 40, n. 5, p. 1046-1051, Aug. 2014.
- SIROLI, L. et al. Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. **Food Chemistry**, London, v. 182, p. 185-192, Sept. 2015.
- SOUZA, E. L. de. The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 56, p. 1-12, Oct. 2016.
- SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 528-533, dez. 2015.
- VALE, L. A. do. **Ação de óleos essenciais sobre biofilme formado por *Cronobacter sakazakii* em superfície de polipropileno**. 2015. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- VALERIANO, C. et al. Antimicrobial activity of essential oils against sessile and planktonic pathogens of food source. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.
- WESCHE, A. M. et al. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 5, p. 1121-1138, May 2009.