



TENILLE RIBEIRO DE SOUZA

**ADAPTAÇÃO HOMÓLOGA E HETERÓLOGA E
INATIVAÇÃO TERMOQUÍMICA DE *Staphylococcus aureus*
AO CINAMALDEÍDO**

**LAVRAS - MG
2018**

TENILLE RIBEIRO DE SOUZA

**ADAPTAÇÃO HOMÓLOGA E HETERÓLOGA E INATIVAÇÃO TERMOQUÍMICA
DE *Staphylococcus aureus* AO CINAMALDEÍDO**

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

Orientadora
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG
2018**

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

De Souza, Tenille Ribeiro.

Adaptação homóloga e heteróloga e inativação termoquímica
de *Staphylococcus aureus* ao cinamaldeído / Tenille Ribeiro de
Souza. - 2018.

58 p.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf.

.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.
Bibliografia.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Adaptação. 3. Antimicrobiana. I.
Hilsdorf, Roberta. . II. Título.

TENILLE RIBEIRO DE SOUZA

**ADAPTAÇÃO HOMÓLOGA E HETERÓLOGA E INATIVAÇÃO TERMOQUÍMICA
DE *Staphylococcus aureus* AO CINAMALDEÍDO**

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

APROVADA em 21 de junho de 2018.

Dra. Angélica Cristina de Souza UFLA

Dr. Disney Ribeiro Dias UFLA

Dra. Maíra Maciel Mattos de Oliveira IFES

Dra. Monique Suela Silva UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf
Orientadora

**LAVRAS - MG
2018**

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Rita e Enio Carlos, por sempre me apoiarem e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por estar sempre me abençoando e me mostrando o tanto que sou capaz.

À minha orientadora, Roberta, pelos ensinamentos transmitidos nesses anos de convivência, dedicação e amizade, sempre disposta a ajudar. Serei eternamente grata.

Aos meus pais, Maria Rita e Enio Carlos, pela confiança, sempre me apoiando e incentivando a correr atrás dos meus sonhos e objetivos.

Ao meu marido, Alvaro, pelo carinho e apoio, compartilhando comigo todos os momentos.

Ao meu irmão, Enio Jr., pelo amor e incentivo.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA (UFLA), pelo agradável convívio durante esses anos e a todos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela convivência e conhecimentos compartilhados.

À Letícia, Michelle, Bruna, Luara, Heloísa, Aline, Silas e Eliane, pela amizade e convivência nesses anos de pós-graduação. Vou levar todos vocês em meu coração.

À Rose, pelo carinho e disponibilidade.

A todos os meus familiares e amigos, pelo carinho, incentivo e orações.

Aos professores do PPGMA, pelos ensinamentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e a concessão de bolsas.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado, muito obrigada.

RESUMO

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva, mesófila, patogênica, capaz de causar toxiose alimentar. Diversas espécies de *Staphylococcus*, incluindo *S. aureus*, destacam-se pela capacidade de se tornarem resistentes a grande número de drogas antibacterianas. Desse modo, um crescente interesse pela compreensão dos mecanismos envolvidos na adaptação de células microbianas a condições ambientais tem sido constatado, visto que os mecanismos de adaptação antimicrobiana contribuem para a resistência. Novas medidas no controle de micro-organismos devem ser tomadas, no intuito de encontrar biocidas com amplo espectro de ação. Uma possível alternativa para o controle de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes são os óleos essenciais e seus compostos, uma vez que sua ação antimicrobiana tem sido comprovada. Os objetivos, neste trabalho, foram avaliar a atividade antimicrobiana, a adaptação e a curva de morte termoquímica de *Staphylococcus aureus* GL 5674 e *Staphylococcus aureus* GL 8702, quando submetidas a uma concentração subletal de cinamaldeído (CND), e avaliar a capacidade destas bactérias de desenvolver adaptação ao estresse ácido e adaptação cruzada entre estresse ácido e CND. As concentrações mínimas bactericidas (CMB) de CND foram determinadas pela técnica da microdiluição em caldo, em microplacas de 96 cavidades. As concentrações finais de CND variaram de 0,05% a 2% (v/v). O pH mínimo inibitório e o mínimo de crescimento foram determinados com o auxílio do ácido láctico e em pH 6,0; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5 e 2,0. As bactérias foram padronizadas em 10^8 UFC/mL. Posteriormente, realizou-se a adaptação de *S. aureus* ao CND. Para avaliar essa adaptação, as células expostas às concentrações subletais de cinamaldeído foram submetidas às diferentes concentrações do mesmo composto (CMB/2; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2CMB) ao qual a cultura foi previamente exposta. As células de *S. aureus* foram classificadas como capazes de se adaptarem quando cresceram em placas após cultivo em presença do componente em concentrações maiores que a CMB. Em seguida, a capacidade adaptativa de *S. aureus* à CND e ao estresse ácido, bem como sua adaptação cruzada entre CND e estresse ácido, foi avaliada. Tanto para a avaliação de adaptação quanto de adaptação cruzada foram realizados cultivos de *S. aureus* em presença de CND e pH mínimo de crescimento, a 37 °C, por 6 horas. Foi realizada uma curva de morte termoquímica de *S. aureus* GL 5674, quando submetida à CBM de CND, a 37 °C e 7 °C, nos tempos de 5, 10, 20, 30 e 35 minutos. A CBM de *S. aureus* GL 5674 e a de *S. aureus* 8702 foram de 0,25% e 0,5%, respectivamente. Ambas as cepas se adaptaram à CND, crescendo em concentrações maiores que a CBM, quando foram previamente expostas a concentrações subletais de CND. O pH mínimo de crescimento e o mínimo inibitório foram de 4 e 3,5, para ambas as bactérias, as quais também apresentaram capacidade de adaptação ao estresse ácido. Os resultados obtidos demonstraram que a pré-exposição de *S. aureus* às concentrações subletais de CND e ao pH mínimo de crescimento promoveu a adaptação e a adaptação cruzada desta bactéria. A curva de morte mostrou que, quando *S. aureus* é submetida a uma CMB de CND a 7 °C, este composto não tem atividade antimicrobiana sobre esta bactéria. Quando *S. aureus* foi submetida à CND a 37 °C, em 35 minutos de contato, não foram detectadas células viáveis de *S. aureus* (redução de 7,653 log UFC/mL). Foi realizado também, neste trabalho, o perfil de proteínas de *S. aureus*, quando submetidas à concentração subletal de CND, sugerindo que ocorrem modificações no proteoma bacteriano.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Adaptação. Antimicrobiana.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a gram-positive, mesophilic, pathogenic bacterium capable of causing food toxin. Several species of *Staphylococcus*, including *S. aureus*, stand out for their ability to become resistant to large numbers of antibacterial drugs. Thereby, a growing interest in understanding the mechanisms involved in the adaptation of microbial cells to environmental conditions has been observed, since antimicrobial adaptation mechanisms contribute to resistance. New measures in the control of microorganisms must be taken in order to find biocides with a broad spectrum of action. A possible alternative for the control of pathogenic and / or deteriorating microorganisms are the essential oils and their compounds, since their antimicrobial action has been proven. This study's objective was to evaluate the antimicrobial activity, the adaptation and the thermochemical death curve of *Staphylococcus aureus* GL 5674 and *Staphylococcus aureus* GL 8702 when submitted to a sublethal concentration of cinnamaldehyde (CIN), and to evaluate the capacity of these bacteria of develop adaptation to acid stress and cross-matching between acid stress and CIN. The minimum bactericidal concentrations (MBC) of CIN were determined by the broth microdilution technique, in 96-well microplates. Final concentrations of CIN ranged from 0.05% to 2% (v / v). Minimum inhibitory pH and minimum growth were determined with the aid of lactic acid and pH 6.0; 5.0; 4.5; 4.0; 3.5; 3.0; 2.5 and 2.0. Bacteria were standardized at 10^8 UFC/mL. After, the adaptation of *S. aureus* to the CIN was performed. To evaluate this adaptation, the cells exposed to sublethal concentrations of cinnamaldehyde were submitted to different concentrations of the same compound (CMB / 2; CMB; 1.2CMB; 1.4CMB; 1.6CMB; 1.8CMB and 2CMB) at which culture was previously exposed. *S. aureus* cells were classified as capable of adapting when grown on plaques after culturing in the presence of the component at concentrations higher than CIN. Then, the adaptive capacity of *S. aureus* to CIN and acid stress, as well as their cross-adaptation between CIN and acid stress, was evaluated. For both adaptation and cross-adaptation evaluation cultures of *S. aureus* were performed in the presence of CIN and minimal growth pH at 37 ° C for 6 hours. A thermochemical death-time curve of *S. aureus* GL 5674, when submitted to MBC of CIN, at 37 ° C and 7 ° C, at times of 5, 10, 20, 30 and 35 minutes was performed. The MBC of *S. aureus* GL 5674 and *S. aureus* 8702 were 0.25% and 0.5%, respectively. Both strains adapted to CIN, growing at higher concentrations than MBC, when they were previously exposed to sublethal concentrations of CIN. The minimum growth and minimum inhibitory pH values were 4 and 3.5, for both bacteria, which also showed ability to adapt to acid stress. The results showed that the pre-exposure of *S. aureus* to the sublethal concentrations of CIN and the minimum pH of growth promoted the adaptation and cross-adaptation of this bacterium. The death-time curve showed that when *S. aureus* is submitted to a MBC of CIN at 7 ° C, this compound does not have antimicrobial activity on this bacterium. When *S. aureus* was submitted to CIN at 37 ° C in 35 minutes of contact, no viable *S. aureus* cells were detected (reduction of 7,653 log UFC/mL). In this study, the profile of *S. aureus* proteins, when submitted to the sublethal concentration of CIN, was also carried out, suggesting that modifications in the bacterial proteome occur.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Adaptation. Antimicrobial.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1.....	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> : características gerais do micro-organismo.....	12
2.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> : fatores de virulência.....	12
2.2	Fisiologia bacteriana: temperatura de crescimento e estresse ácido	17
2.3	Resistência dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos: adaptação e adaptação cruzada	19
2.4	Óleos essenciais e seus componentes	21
2.4.1	Cinamaldeído.....	23
2.4.2	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	24
2.5	Proteômica microbiana	25
	REFERÊNCIAS	27
	CAPÍTULO 2 Adaptação homóloga e heteróloga e inativação termoquímica de <i>Staphylococcus aureus</i> ao cinamaldeído	33
1	INTRODUÇÃO	33
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1	Componentes majoritários.....	35
2.2	Micro-organismos, padronização e preparo dos inóculos.....	35
2.3	Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) de cinamaldeído .	35
2.4	Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
2.5	Adaptação de <i>Staphylococcus aureus</i> ao cinamaldeído e ao pH ácido.....	36
2.5.1	Adaptação de <i>Staphylococcus aureus</i> ao cinamaldeído	36
2.5.2	Adaptação de <i>Staphylococcus aureus</i> ao pH ácido	37
2.6	Avaliação da adaptação de <i>Staphylococcus aureus</i> ao cinamaldeído e resposta à tolerância ácida	37
2.6.1	Cinamaldeído.....	37
2.6.2	Resposta de tolerância ácida	37
2.7	Adaptação cruzada	38
2.7.1	Avaliação da adaptação cruzada entre o cinamaldeído e estresse ácido	38
2.7.2	Avaliação da adaptação heteróloga entre estresse ácido e cinamaldeído	38
2.8	Curva de morte termoquímica.....	38
2.8.1	Células de <i>Staphylococcus aureus</i> não adaptadas.....	38
2.8.2	Células de <i>Staphylococcus aureus</i> GL 5674 adaptadas	39
2.9	Proteômica de <i>Staphylococcus aureus</i> submetido à concentração subletal de cinamaldeído	39
2.9.1	Extração das proteínas	39
2.9.2	Quantificação de proteínas.....	39
2.9.3	Focalização isoeletrica	40
2.9.4	Segunda dimensão	40
2.9.5	Deteccção das proteínas em gel.....	41
2.9.5.1	Coloração dos géis	41
2.10	Delineamento experimental estatístico	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1	Concentração mínima bactericida e adaptação de <i>S. aureus</i> GL 5674 e <i>S. aureus</i> GL 8702 ao cinamaldeído	43

3.2	Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório de <i>Staphylococcus aureus</i> e resposta a tolerância ácida	44
3.3	Adaptação cruzada	45
3.4	Proteômica de <i>Staphylococcus aureus</i> GL 5674 quando exposta a uma concentração subletal de cinamaldeído.....	47
3.5	Curva de morte termoquímica de <i>Staphylococcus aureus</i> GL 5674 não adaptado e adaptado ao cinamaldeído.....	49
4	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva, mesófila, patogênica, capaz de causar toxiose alimentar. É largamente distribuída na natureza, sendo habitante natural de humanos e animais.

Diversas espécies de *Staphylococcus*, incluindo *S. aureus*, destacam-se pela capacidade de se tornarem resistentes a grande número de drogas antibacterianas, devido, principalmente, ao uso frequente e indiscriminado de drogas antibacterianas e, também, aos mecanismos de transferência de resistência entre micro-organismos.

Com isso, crescente interesse pela compreensão dos mecanismos envolvidos na adaptação de células microbianas a condições ambientais tem sido constatado, visto que a resistência antimicrobiana é também problema de segurança alimentar, representando um risco direto quando o micro-organismo patogênico resistente se encontra no alimento ingerido ou indireto, quando a resistência é transmitida de uma bactéria comensal do alimento para uma bactéria patogênica ao homem (DOULGERAKI et al., 2017).

Na indústria de alimentos, a contaminação microbiana é reduzida pela aplicação de tratamentos físicos, tais como calor ou tratamentos químicos, e a utilização de ácidos orgânicos (BEGLEY; HILL, 2015). O efeito desses tratamentos também pode ser diminuído por uma “proteção cruzada” gerada pela exposição prévia de micro-organismos ao estresse subletal ou às concentrações subletais de um agente antimicrobiano (BIKELS-GOSHEN et al., 2010; CEBRIÁN et al., 2009). A exposição de bactérias a concentrações subletais de agente antimicrobianos tem levado a uma certa adaptação. A adaptação e a adaptação cruzada de bactérias têm sido muito estudadas por conferirem aos micro-organismos resistência a um fator de estresse diferente daquele ao qual foram submetidos anteriormente, tornando-se outro fator preocupante, no que diz respeito ao combate desses micro-organismos. De acordo com Álvarez-Ordóñez et al. (2008), a exposição a condições subletais de substâncias antimicrobianas pode resultar no desenvolvimento de aumento da tolerância aos mesmos fatores (homólogos) ou a agente de estresse de tolerância cruzada (heterólogos).

Novas medidas no controle de micro-organismos devem ser tomadas, no intuito de encontrar biocidas com amplo espectro de ação. Os óleos essenciais e seus componentes demonstram serem alternativas no controle de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes, uma vez que sua ação antimicrobiana é comprovada (BEHBAHANI et al.,

2018; DIAS et al., 2015; MIRANDA et al., 2016; NAZZARO et al., 2013). Contudo, pouco se sabe sobre a adaptação a concentrações subletais de óleos essenciais ou de seus constituintes.

A capacidade para crescer na presença de substâncias tóxicas poderia exigir modificações na expressão do gene. Quando as células são expostas a condições de estresse, elas podem mudar seu perfil proteico que pode contribuir para maior tolerância e sobrevivência das células. Isso pode aumentar a capacidade de *Staphylococcus aureus* sobreviver a processamentos de alimentos. Neste contexto, os objetivos, neste trabalho, foram avaliar a atividade antimicrobiana, a adaptação e a curva de morte termoquímica de *Staphylococcus aureus* GL 5674 e *Staphylococcus aureus* GL 8702, quando submetidas a uma concentração subletal de cinamaldeído e a avaliar a capacidade destas bactérias de desenvolver adaptação ao estresse ácido e adaptação cruzada entre estresse ácido e cinamaldeído.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Staphylococcus aureus*: características gerais do micro-organismo

A espécie mais importante do gênero *Staphylococcus* é a *Staphylococcus aureus* (BHUNIA, 2008), habitante natural de humanos e animais. *Staphylococcus aureus* são cocos gram-positivos (1 µm de diâmetro), imóveis, que aparecem microscopicamente como “cachos de uva” (BERGDOLL, 1990; CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005; KONEMAN et al., 2001; TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).

No Manual Bergy de Bacteriologia Definitiva, *Staphylococcus* tem sido classificado na família das Staphylococcaceae. A hibridização de DNA-RNA ribossomal e a análise comparativa de oligonucleotídeos do rRNA 16S demonstraram que os *Staphylococcus* formam um grupo coerente ao nível de gênero. *Staphylococcus* são diferenciados de outros membros próximos da família por seu baixo conteúdo de G + C no DNA, variando de 30 a 40 mol%. O gênero *Staphylococcus* foi, então, classificado em mais de 30 espécies e subespécies por análise bioquímica e por hibridização DNA-DNA. *Staphylococcus aureus* é a principal espécie do gênero *Staphylococcus* e é responsável por intoxicação alimentar. Outras espécies do gênero incluem *S. intermedius*, *S. chromogens*, *S. cohnii*, *S. caprae*, *S. caseolyticus*, *S. delphini*, *S. epidermidis*, *S. felis*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. succinus*, *S. warneri* e *S. xylosus*. A maioria deles produz enterotoxinas (BHUNIA, 2008).

Staphylococcus aureus é um micro-organismo catalase positiva, aeróbio facultativo e cresce abundantemente sob condições aeróbicas. Ele fermenta manitol, faz coagulação do plasma de coelho, produz termonuclearese e é sensível para lisostafina. Também é tolerante ao sal (10%-15%) e relativamente resistente à secagem e ao calor (BHUNIA, 2008; JAY, 2005).

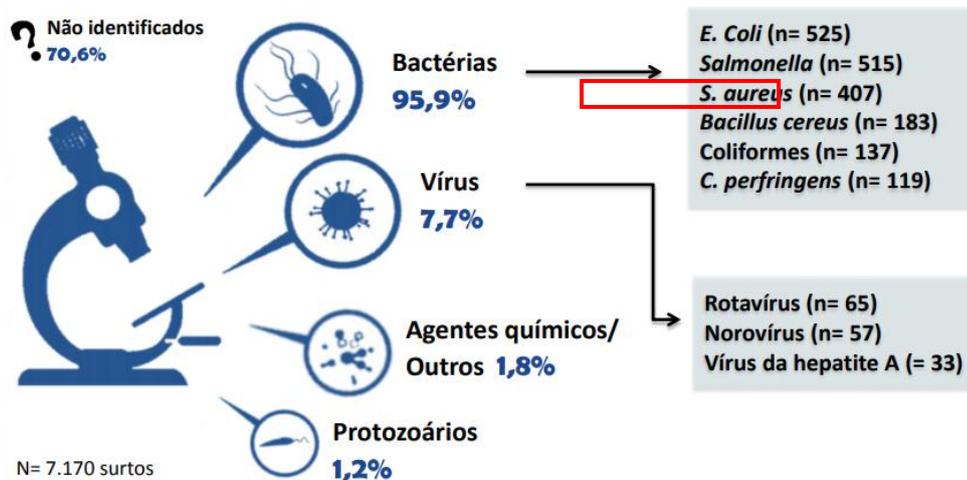
2.1.1 *Staphylococcus aureus*: fatores de virulência

Staphylococcus aureus representa riscos significativos para a saúde humana e causa preocupação no setor de alimentos (BHUNIA, 2008). É uma das bactérias gram-positivas mais patogênicas, devido aos seus fatores de virulência. A toxiose alimentar, provocada por *S. aureus*, é o resultado da ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas

estafilocócicas (EE), sendo a terceira maior causa de enfermidade transmitida por alimento no mundo (BALABAN; RASSOLY, 2000; BRONNER; MONTEIL; PRÉVOST, 2004).

O conceito de doença transmitida por alimento (DTA) é o de uma síndrome constituída por anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia relacionados à ingestão de alimento ou de água contaminada por diversos agentes etiológicos, dentre eles as bactérias. Surto é um episódio em que dois ou mais indivíduos apresentam os mesmos sintomas após ingestão de alimentos de mesma origem. Entre os anos de 2000 e 2015 ocorreram 10.666 surtos de DTA em todo o Brasil, em que 2.107.229 pessoas foram expostas e, destas, 209.240 ficaram doentes, acarretando em 155 óbitos. Dos agentes etiológicos encontrados nesse levantamento, 58,5% não foram identificados, 14,4% foram identificados como *Salmonella* spp 7,7% como *S. aureus*, 6,5% como *E. coli*, 3,1% como *B. cereus*, 2,1% como *C. perfringens* e 7,7% como demais agentes etiológicos (BRASIL, 2017).

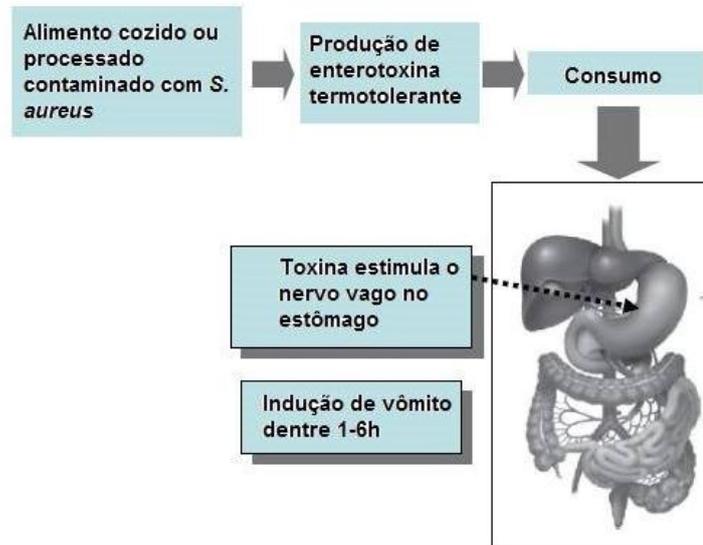
Figura 1 - Proporção de agentes etiológicos identificados em surtos de DTA, Brasil 2007-2017.



Fonte: Brasil (2017).

Após consumo de toxinas pré-formadas em alimentos contaminados, elas são absorvidas pelo estômago e causam gastroenterite típica, enquanto as bactérias passam através do intestino sem causar quaisquer efeitos adversos sobre o hospedeiro. As toxinas estimulam as terminações nervosas do nervo vago no revestimento estomacal e estimulam o centro medular do vômito, levando à violenta resposta emética (Figura 1) (BHUNIA, 2008).

Figura 2 - Mecanismo patogênico da intoxicação por enterotoxina de *S. aureus*.



Fonte: Bhunia (2008), adaptado.

A virulência de *S. aureus* depende de grande variedade de fatores, principalmente proteínas extracelulares, como enzimas e exotoxinas, que contribuem para o desencadeamento da doença. Cepas de *S. aureus* podem conter diferentes genes de virulência que codificam enterotoxinas estafilocócicas (SEs), leucocidinas, esfoliatinas, hemolisinas, toxinas da síndrome do choque tóxico 1 e alelos do gene acessório regulador (*agr*), sendo a presença ou a ausência desses genes essenciais para determinar o potencial de virulência das cepas (SPANU et al., 2012). Na Tabela 1 são apresentados os principais fatores de virulências e as enzimas produzidos por *S. aureus*.

A resistência a antibióticos apresenta importante papel entre os fatores contribuintes para a virulência de *S. aureus*. Cepas de *S. aureus* podem ser caracterizadas como resistentes a uma única ou a várias drogas, representando a principal ameaça para a saúde pública, como é o exemplo das cepas resistentes a metilina. (MRSA) (SPANU et al., 2012).

Tabela 1 - Fatores de virulência e enzimas produzidas por *Staphylococcus aureus*.

Fatores de virulência	Receptores
Adesinas	Porção Fc da IgG
Spa (proteína A)	
Bap (proteínas associadas a biofilme)	
Fpb (proteínas ligadas à fibronectina)	Fibronectina, fibrinogênio, elastina
ClfA (proteínas ligadas ao fibrinogênio)	Fibrinogênio
Cna (adesina de colágeno)	Colágeno
IsdA, IsdB, IsdC, IsdH (proteínas de superfície ligadas pelo ferro)	Hemoglobina, transferrina, hemina
Pis (proteína de parede sensível a plasmina)	Lipídeo celular denominado ganglioside GM
Atl (amidase autolisina)-ação bacteriolítica	
Enolase	
Ácido teicoico	Lamina Desconhecido – se liga a células epiteliais
Enterotoxinas (17)	
Enterotoxina estafilocócica SEA-SER Exceto SEF	Glicosfingolípido
Hemolisinas Formadoras de Poros	
Hemolisinas α β γ δ	Colesterol
Superantígenos	
TSTT (toxina da síndrome do choque térmico) Enterotoxinas Toxinas esfoliativas (A, B)	MHC classe II
Toxinas ribosilação	
Leucocidina Exotoxina pirogênica	
Proteases	
Metaloproteases Colagenase Endopeptidase Elastase	
Outras	
Nuclease Lisozima Fosfolipases Coagulase	

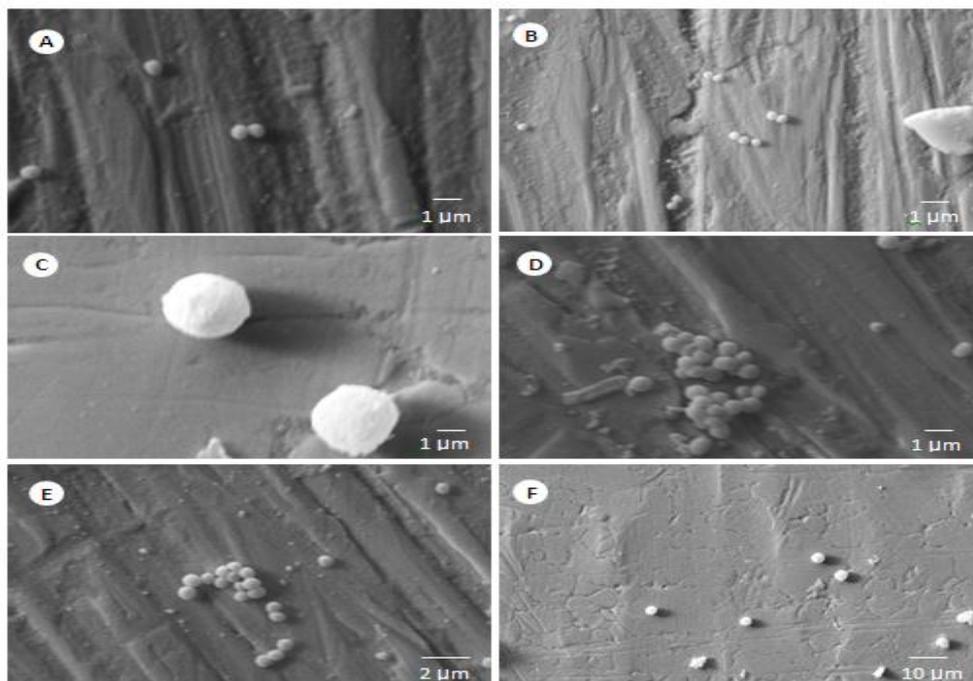
Fonte: Bhunia (2008).

Em 1960 foi descoberta uma droga do grupo das penicilinas, denominada meticilina, a primeira penicilina semissintética disponível em uso clínico. Porém, no início da década de 1970, começaram a aparecer, com muita rapidez, cepas de *S. aureus* com resistência à meticilina, identificadas pela sigla MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina em inglês), também resistentes aos demais betalactâmicos (cefalosporinas e outros) Tem-se que

resistência à meticilina é determinada por um gene cromossômico (*mecA*) da bactéria, o qual codifica para modificações no receptor do betalactâmico, estimulando a produção de uma proteína ligadora de penicilina (PPB2a) com baixa afinidade pelo antibiótico, resultando na resistência (SANTOS et al., 2007).

As proteínas de superfície associadas à parede celular expressas por *S. aureus* desempenham importante papel na virulência e na formação do biofilme. *S. aureus* forma biofilme fortemente sobre superfícies bióticas e abióticas, como o aço inoxidável (BOARI et al., 2009; MILLEZI, 2012). Quando presente em biofilme, fica ainda mais resistente e difícil de ser eliminada. Na Figura 2 mostra observam-se de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme de *S. aureus* em cupons de aço inoxidável, algumas bactérias isoladas e colônias.

Figura 3 - Eletromicrografias de varredura do biofilme de *Staphylococcus aureus* formado sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) a 37°C. (A, B, C, F) Bactérias isoladas. (D, E) Bactérias agregadas.



Fonte: Vale et al. (2014).

Staphylococcus aureus é um dos agentes etiológicos da mastite bovina. A mastite estafilocócica é bem conhecida nos rebanhos leiteiros, e as chances de contrair toxiose alimentar são grandes se o leite contaminado dessas vacas com mastite for consumido ou utilizado na fabricação de queijos, dentre outros produtos dele derivados. Há poucas dúvidas em relação ao fato de que diversas linhagens causadoras de mastite bovina são provenientes

de humanos. Toxiose alimentar estafilocócica é uma das mais comuns doenças veiculadas por alimentos no mundo inteiro (JAY, 2005).

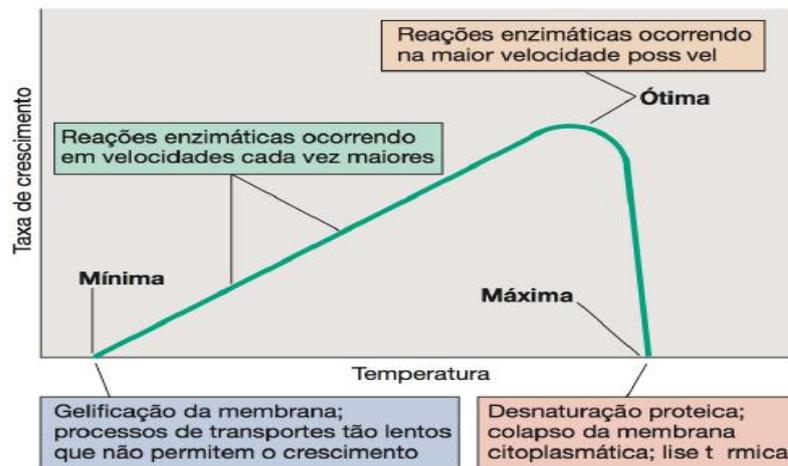
Spanu et al. (2012) realizaram um trabalho com os objetivos de realizar a caracterização dos fatores de virulência e estudar a variabilidade genética dos isolados de *S. aureus* de queijo produzido com leite cru de ovelha. Nesse trabalho, 81% dos isolados apresentaram o perfil de patogenicidade atribuível a “biovar animal”, enquanto 16% podem ser relacionados a “biovar humano”, permitindo, assim, estimar a origem mais provável de contaminação. Cem isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de queijo de fábricas artesanais foram analisados quanto à presença de genes que codificam enterotoxinas (*sea-see*), genes de proteínas semelhantes a enterotoxinas (*seh, sek, sel, sem, seo, sep*), leucocidinas, exfoliacinas, hemolisinas, toxina da síndrome do choque tóxico 1 (*tst*) e o alelo do gene acessório regulador (*agr*). Concentrações mínimas inibitórias (MICs) de nove agentes antimicrobianos e a presença de genes correspondentes que codificam para resistência antimicrobiana também foram investigadas.

2.2 Fisiologia bacteriana: temperatura de crescimento e estresse ácido

Provavelmente, o fator ambiental que mais afeta o crescimento e a sobrevivência dos micro-organismos é a temperatura (MADIGAN et al., 2016). Cada organismo tem uma temperatura mínima, máxima e ótima na qual seu crescimento pode ocorrer, as quais são conhecidas como temperaturas cardeais (Fig. 3) e são, na maioria das vezes, característica individual de cada micro-organismos, embora sejam influenciadas por outros fatores ambientais, como pH, disponibilidade de nutrientes e atividade de água (ADAMS; MOSS, 2008).

Staphylococcus aureus é uma bactéria tipicamente mesófila, com temperatura ótima de crescimento de 37 °C e pode apresentar crescimento na faixa de temperatura que varia de 7 °C a 48 °C.

Figura 3 - Efeito da temperatura na taxa de crescimento e as consequências moleculares para a célula. As três temperaturas cardiais variam nos diferentes organismos.



Fonte: Madigan et al. (2016).

O crescimento de *S. aureus* ocorre de forma otimizada em valores de pH de 6-7, com o mínimo e limites máximos de 4,0 e 9,8-10,0, respectivamente (ADAMS; MOSS, 2008).

A acidificação é considerada uma barreira de controle do crescimento de micro-organismos no processamento de alimentos, visto que patógenos de origem alimentar se multiplicam melhor em valores de pH neutro (SMIGIC et al., 2009).

O estresse ácido é um efeito combinado entre baixos pH e ácidos fracos (orgânicos) que, em sua forma não protonada, podem difundir-se para dentro da célula e dissociarem-se. Consequentemente, o baixo pH intracelular resulta na inibição de várias enzimas citoplasmáticas essenciais. Como resposta, os micro-organismos têm estratégias induzíveis de sobrevivência ao ácido que incluem um fator alternativo sigma (σ), uma proteína de choque ácido e proteínas FUR, que regulam de forma coordenada grande variedade de processos, incluindo o metabolismo do ferro (FORSYTHE, 2002).

Dubal et al. (2004) avaliaram a eficiência de ácidos orgânicos sobre *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. typhimurium* inoculados em carne de cabra/ovelha e analisados após diferentes períodos de estocagem em temperatura de refrigeração. A partir dos dados obtidos, verificou-se que a utilização do ácido lático a 2% e da combinação de 1,5% de ácido acético com 1,5% de ácido propiônico diminuiu as contagens de bactérias viáveis na carne em 0,52 e 1,16 log, respectivamente e também inibiu a multiplicação dos patógenos durante os diferentes dias de estocagem da carne. Isto resultou num aumento da durabilidade correspondente a 5 dias, quando comparado ao das carnes não tratadas com ácidos (controle).

Sihto et al. (2016) constataram que o estresse osmótico e o estresse ácido têm efeito no crescimento de *S. aureus*, com um prolongamento da fase lag e diminuição das densidades celulares máximas alcançadas no final da fase estacionária. Além disso, o estresse osmótico aumentou ligeiramente taxa de crescimento de *S. aureus* e levou à diminuição da expressão de enterotoxina estafilocócica D na fase estacionária tardia.

Na indústria de alimentos, a carga microbiana é reduzida pela aplicação de tratamentos físicos, tais como calor ou tratamentos químicos, como o ácido (BEGLEY; HILL, 2015). O efeito desses tratamentos também pode ser diminuído por uma “proteção cruzada” gerada pela exposição prévia de micro-organismos ao estresse subletal ou às concentrações subletais de um agente antimicrobiano (BIKELS-GOSHEN et al., 2010; CEBRIÁN et al., 2009).

2.3 Resistência dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos: adaptação e adaptação cruzada

A resistência antimicrobiana é definida como a resistência de micro-organismos 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, pode ter levado ao estado atual dessa crise de resistência antimicrobiana. O uso inadequado de antibióticos compreende uma série de definições, que variam de prescrever antibióticos desnecessariamente até a dose ou a 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 micro-organismos, facilitando o aparecimento e a disseminação da resistência por meio do 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 por meio 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 micro-organismos por muitos anos (FAIR; TOR, 2014). A evidência sugere que os elementos de resistência

identificados no DNA bacteriano podem ser rastreados há milhares de anos, mesmo antes da introdução da penicilina (HWANG; GUMS, 2016; FAIR; TOR, 2014).

A resistência através da penicilinase bacteriana foi identificada, indicando que os micro-organismos, provavelmente, têm propensão intrínseca para a resistência armazenada dentro do seu genoma (DAVIES; DAVIES, 2010). Na Tabela 2 são fornecidos outros exemplos em que ocorreu emergência de resistência em dois anos após a introdução do antibiótico. Os mecanismos patológicos de resistência referem-se ao processo bacteriano natural de desenvolvimento de resistência a antimicrobianos e inclui uma variedade de mecanismos, incluindo transmissão de material genético, adaptação microbiana e pressão seletiva por excesso de antibiótico (HWANG; GUMS, 2016; VENTOLA, 2015).

Tabela 2 - Cronograma de introdução de antibióticos e resistência identificada.

Antibiótico	Ano de introdução	Identificação do ano de resistência	Resistência bacteriana identificada
Penicilina	1943	1940	<i>Staphylococcus</i>
Meticilina	1960	1962	<i>Staphylococcus</i>
Ceftazidime	1985	1987	Enterobacteriaceae
Levofloxacin	1996	1996	<i>Pneumococcus</i>
Linezolid	2000	2001	<i>Staphylococcus</i>
Ceftaroline	2010	2011	<i>Staphylococcus</i>

Fonte: Hwang e Gums (2016).

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 et al., 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 o crescimento do micro-organismo condicionado ao estresse, tornando-o fisiologicamente mais tolerante em níveis aumentados ou proteção cruzada a outros estressores (HWANG et al., 2014; SMIGIC et al., 2009).

A resistência antimicrobiana é um problema de segurança alimentar, representando risco direto, quando o micro-organismo patogênico resistente se encontra no alimento ingerido ou indireto, 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 são os aspectos-chave para a prevenção e o controle da resistência antimicrobiana (GUARDABASSI; KRUSE, 2008).

Novas medidas no controle de micro-organismos devem ser tomadas, no 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 demonstram ser uma alternativa no controle de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes, uma vez que sua ação antimicrobiana tem sido comprovada (BEHBAHANI et al., 2018; DIAS et al., 2015; MIRANDA et al., 2016; NAZZARO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012).

2.4 Óleos essenciais e seus componentes

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

Uma discussão de longa data em fisiologia vegetal é se os chamados metabólitos secundários são apenas perdas, ou se têm papel no incremento da adaptação das plantas. A hipótese coevolucionária, como apresentado por Fraenkel, Erlich e outros desde a década de 1960 (EHRlich; RAVEN, 1964; FRAENKEL, 1959), propõe que a relação planta-animal é um fator fundamental para o aumento da biodiversidade, tanto de insetos quanto de plantas (FÜRSTENBERG-HÄGG; ZAGROBELNY, 2013) e que os metabólitos secundários são parte de um sistema químico de defesa que permite que as plantas se defendam contra predadores, forçando-os a se adaptarem a esses químicos e se tornarem especialistas, em um cabo de guerra químico-evolucionário. Esta hipótese não se sustenta nessa primeira formulação porque é inconsistente com o fato de que, dentre os metabólitos secundários, existe grande e inesperado número de moléculas intimamente relacionadas ou análogas com muito pouca atividade biomolecular (GUILLET; DURST, 2004; HARBORNE; WILLIAMS, 2001).

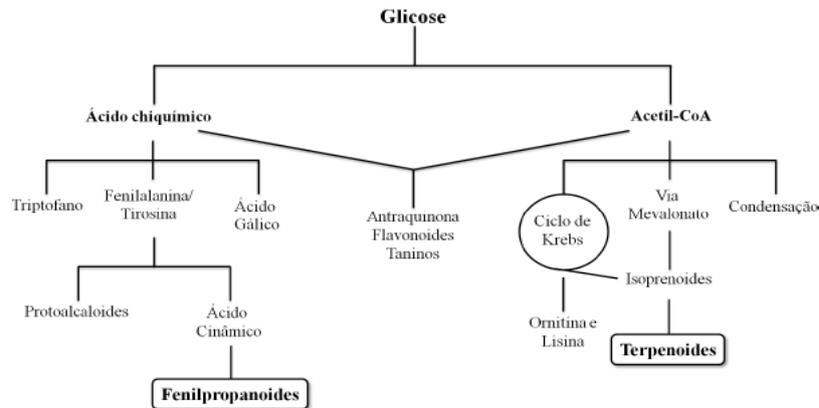
Novas hipóteses, como as de “blindagem” e a de “metabolismo silencioso”, propuseram que a vantagem adaptativa para plantas reside não em possuir uma molécula específica, mas na disponibilidade de muitos compostos que podem ser desafiados pela evolução (FIRN; JONES, 2003, 2000; LEWINSOHN; GIJZEN, 2009). De fato, parece que as plantas com maior diversidade química apresentam melhores defesas que aquelas com diversidade mais limitada (WAR et al., 2012). Um grupo particular de metabólitos secundários são os voláteis, compreendidos, principalmente, por terpenoides, mas também por fenilpropanoides e nitrogênio, e compostos contendo enxofre. Apesar de descrito como um grupo heterogêneo de compostos, o termo “óleos essenciais” tem sido utilizado atualmente para definir as moléculas extraídas de plantas. Para definir os metabólitos secundários voláteis quando estes estão no organismo vivo, o termo voláteis das plantas é preferido (SHARIFI-RAD et al., 2017).

As plantas apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou, mesmo, espécies. O conjunto de compostos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a formação e a eliminação desses compostos durante o seu crescimento, sendo esse equilíbrio influenciado por fatores genéticos e ambientais, como luz, temperatura, tipo de solo e água, os quais são variáveis. Eles são comumente concentrados em uma região em particular da planta e, quando ocorrem em várias partes dela, apresentam diferentes perfis de composição (CALO et al., 2015; OUSSALAH et al., 2007).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem ser divididos em três grupos, terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Porém, todos eles originam-se do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato, conforme demonstrado na Figura 4.

Quando em mistura, os compostos apresentam-se em diferentes concentrações, porém, geralmente, um, dois ou três deles são encontrados em proporções maiores, sendo denominados de compostos majoritários. Apesar da complexidade da composição, os constituintes dos óleos voláteis pertencem de forma quase exclusiva a duas séries, caracterizadas por suas origens biossintéticas distintas, que são a série terpênica e a série, muito menos frequente, dos fenilpropanoides (BANDONI; CZEPAK, 2008; CARDOSO et al., 2001).

Figura 4 - Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários.

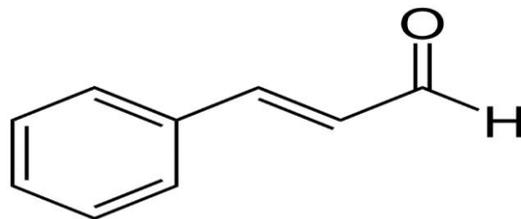


Fonte: Simões et al. (2007).

2.4.1 Cinamaldeído

Cinamaldeído (3-fenil-2-propenal) é um dos compostos mais abundantes existentes no óleo essencial de canela (SHAH; DAVIDSON; ZHONG, 2012). Como se observa na Figura 5, ele apresenta grande atividade antimicrobiana contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos (OTONI et al., 2014; SHEN et al., 2015). Este é um aldeído aromático hidrofóbico que foi aprovado pelo Comitê de Peritos FAO/OMS em aditivos alimentares (JECFA) para uso como agente aromatizante. Ele pode ser aplicado amplamente em material de preservação de alimentos como um ingrediente antimicrobiano seguro (BALAGUER et al., 2013).

Figura 5 - Estrutura molecular de cinamaldeído.



Fonte: Burt (2004).

Singh et al. (2007) determinaram que o óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* apresenta 13 componentes, sendo (E)-cinamaldeído (97,7%) o majoritário, seguido de β -cadineno (0,9%), β -copaeno e (0,8%) e β -amorfeno (0,5%).

Visvalingam, Palaniappan e Holley (2017) avaliaram a capacidade do cinamaldeído de aumentar a susceptibilidade de *E. coli* a diferentes antibióticos e chegaram à conclusão de que o cinamaldeído pode ser utilizado em combinação (de forma sinérgica) com vários antibióticos para aumentar a suscetibilidade de cepas de *E. coli* resistente a medicamentos.

No trabalho de Andrade et al. (2012), o óleo essencial de canela foi o mais efetivo na inibição do crescimento bacteriano. Esse resultado pode estar relacionado com a presença do componente majoritário aldeído cinâmico em elevada concentração (77,72%).

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

Oliveira et al. (2012) verificaram que o óleo essencial de *C. cassia*, bem como seu constituinte majoritário cinamaldeído, apresentou efeito antibacteriano contra os biofilmes monoespécie e multiespécie de *L. monocytogenes* e EPEC na presença de alto conteúdo de matéria orgânica representada por leite integral reconstituído. O efeito das soluções de óleo essencial e de cinamaldeído não diferiu do apresentado pelos sanitizantes químicos peróxido de hidrogênio e quaternário de amônio, e se mostrou superior ao do hipoclorito de sódio.

No trabalho de Budri (2014), o óleo essencial de canela e seu composto majoritário cinamaldeído apresentaram concentração inibitória mínima de, respectivamente, 0,243 mg.mL⁻¹ e 0,1987 mg.mL⁻¹, contra *Staphylococcus aureus*. Além disso, o cinamaldeído reduziu significativamente a capacidade de produção de biofilme do *S. aureus*, tanto em superfícies de poliestireno (69,6%) quanto em superfície de aço inox (44,9%). Pela significativa redução da produção de biofilme, em baixa concentração, esta substância pode ser considerada como princípio ativo na produção de sanitizantes.

2.4.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais depende da sua composição química e da quantidade dos seus componentes individuais. Muitos dos compostos antimicrobianos são expressos constitutivamente pelas plantas e outros podem ser sintetizados como mecanismos de autodefesa em resposta a patógenos (NAZARRO et al., 2013).

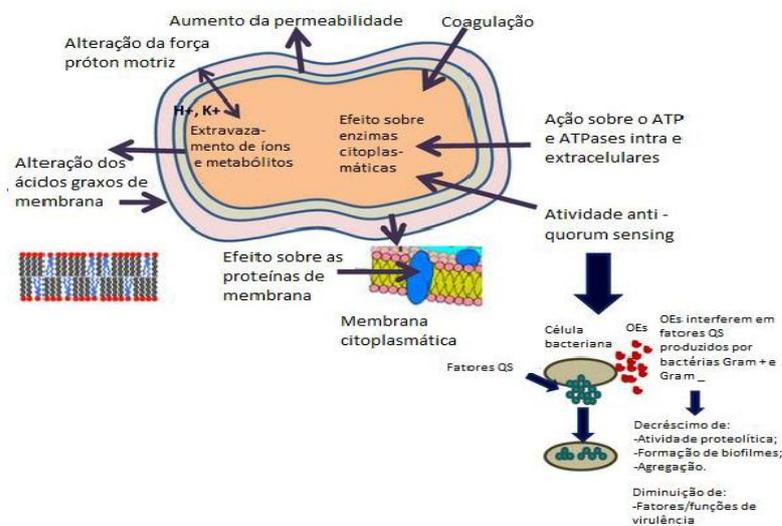
Em virtude da grande variedade de moléculas presentes, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais não pode ser atribuída a um único mecanismo. Em vez disso, diferentes mecanismos bioquímicos e estruturais estão envolvidos em locais múltiplos no interior e na superfície da célula (BURT, 2004). Estes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

membrana celular, citoplasma, enzimas e proteínas, e podem alterar completamente a conformação da célula microbiana (CARSON; MEE; RILEY, 2002; NAZZARO et al., 2013).

Como são tipicamente lipofílicos, os óleos essenciais se acumulam na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, conferindo característica de permeabilidade (BAKKALI et al., 2008; SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994). A permeabilidade das membranas celulares é dependente da sua composição e da hidrofobicidade dos solutos que a atravessam (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994). O caráter hidrofóbico dos óleos essenciais provoca alteração na estrutura do envelope celular, e os compostos fenólicos, como timol, carvacrol e eugenol, diminuem a fluidez e alteram o perfil lipídico da membrana celular bacteriana (PASQUA et al., 2007).

Na Figura 5 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 evento separado, mas, em vez disso, pode ser uma consequência das outras atividades (NAZZARO et al., 2013).

Figura 6 - Mecanismo de ação dos óleos essenciais (OEs) na célula microbiana.



Fonte: Nazzaro et al. (2013).

2.5 Proteômica microbiana

O termo proteoma se origina das palavras proteínas e genoma. O proteoma representa todas as proteínas codificadas pelo genoma de um organismo. Proteômica é definida como o teor de proteína total de uma célula ou de um organismo e seu estudo leva ao entendimento da estrutura, da função e das interações das proteínas do organismo (MISHRA; BLOBEL, 2010).

O proteoma de um organismo reflete o conjunto de proteínas expressas por esse organismo em determinada situação, não é estático e pode modificar-se, dependendo das condições e dos estímulos a que esse organismo está exposto. O proteoma reflete a expressão das proteínas que influenciam mais diretamente a bioquímica e o funcionamento celular (LEHNINGER et al., 2007; MISHRA; BLOBEL, 2010). Quando as células são expostas a condições de estresse, elas podem mudar seu perfil proteico, e isso pode contribuir para a maior sobrevivência e resistência das células.

A análise proteômica de *S. aureus* auxilia na identificação de seus mecanismos de adaptação quando exposto a algum tipo de estresse, podendo-se assim, relacionar proteínas expressas em resposta a um mecanismo de sobrevivência da célula a ação de um determinado fator de estresse. Di Pasqua et al. (2010), em seu trabalho com *Samonella* sp., observaram que a expressão das proteínas da bactéria foi significativamente alterada quando elas foram submetidas à concentração subletal de timol. Muitas das proteínas que tiveram seu perfil modificado eram de reparação celular, denominadas chaperonas.

A análise do proteoma de *S. aureus* exposto a concentrações subletais de vancomicina mostrou que a bactéria foi capaz de se adaptar ao antimicrobiano, levando à mudança na expressão de proteínas, como o aumento específico de proteínas da síntese de aminoácidos essenciais para a síntese dos peptidoglicanos e o decréscimo da maior parte das proteínas com função relacionada com a virulência (HESSLING et al., 2013). No mesmo trabalho foi observada influência sobre as metas de regulação do sistema de dois componentes VraSR como o principal sistema de regulação conhecido para o estresse da parede celular, bem como para reguladores globais como SigB e SaeR.

Por meio da análise proteômica, é possível identificar o perfil de proteínas que são produzidas pelo micro-organismo estudado. Dessa maneira, as análises proteômicas são uma importante chave no entendimento dos mecanismos de adaptação aos antimicrobianos e agentes estressantes dos micro-organismos em âmbito molecular.

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.
- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 3rd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008. 463 p.
- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, p. 212-219, 2008.
- AMALARADJOU, M. A. R.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of transcinna maldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 74, n. 2, p. 200-208, 2011.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum Zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALABAN, N.; RASOOLVY, A. *Staphylococcal Enterotoxin*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, p. 1-10, 2000.
- BALAGUER, M. P. et al. Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 166, n. 3, p. 369-377, Sept. 2013.
- BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: Ed. UFES, 2008. 623 p.
- BEGLEY, M.; HILL, C. Stress adaptation in foodborne pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 6, p. 191-210, 2015.
- 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**, Basel, v. 114, p. 449-452, 2018.
- BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 91-100, 1990.
- BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. New York: Spring Science Business, 2008. 276 p. (Food Science Text Series).

- BIKELS-GOSHEN, T. et al. Staphylococcal strains adapted to epigallocatechin gallate (EGCG) show reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin, increased heat tolerance, and altered cell morphology. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 138, n. 1/2, p. 26-31, 2010.
- BOARI, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **SVS/SINAN: surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017>>. Acesso em: 31 maio 2018.
- 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, 2015.
- BRONNER, S.; MONTEIL, H.; PRÉVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 28, p. 183-200, 2004.
- BUDRI, P. E. **Efeito dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum zeylanicum* e seus compostos majoritários na produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica**. 2014. 58 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.
- 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, 2015.
- CARDOSO, M. G. et al. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral, química e medicinal**. Lavras: Ed. UFLA, 2001. v. 1, 81 p. (Textos Acadêmicos).
- CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.
- CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 9, n. 1, p. 70-76, 2005.
- CEBRIÁN, G. et al. Role of the alternative sigma factor σ_B on *Staphylococcus aureus* resistance to stresses of relevance to food preservation. **Journal of Applied Microbiology**, Newark, v. 107, n. 1, p. 187-196, 2009.

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

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

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

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

DOULGERAKI, A. I. et al. Methicillin-resistant food-related *Staphylococcus aureus*: a review of current knowledge and biofilm formation for future studies and applications. **Research in Microbiology**, Paris, v. 168, n. 1, p. 1-15, 2017.

DUBAL, Z. B. et al. Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. **Meat Science**, Barking, v. 66, n. 4, p. 817-821, 2004.

EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, Lawrence, v. 18, n. 4, p. 586-608, 1964.

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

FIRN, R. D.; JONES, C. G. The evolution of secondary metabolism: a unifying model. **Molecular Microbiology**, Washington, v. 37, n. 5, p. 989-994, 2000.

FIRN, R. D.; JONES, C. G. Natural products—a simple model to explain chemical diversity. **Natural Product Reports**, London, v. 20, n. 4, p. 382-391, 2003.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRAENKEL, G. S. The raison d'être of secondary plant substances. **Science**, New York, v. 129, p. 1466-1470, 1959.

FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant defense against insect herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, Columbia, v. 14, n. 5, p. 10242-10297, 2013.

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**. Oxford: Blackwell, 2008. p. 1-12.

GUILLET, J. T. A. G.; DURST, T. Phytochemical diversity of insect defenses in tropical and temperate plant families. **Advances in Insect Chemical Ecology**, Cambridge, v. 24, p. 56-77, 2004.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Reports**, London, v. 18, n. 3, p. 310-333, 2001.

HESSLING, B. et al. Global proteome analysis of vancomycin stress in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 303, n. 8, p. 624-634, 2013.

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

HWANG, C. et al. The influence of acid stress on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on cooked ham. **Food Control**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 245-250, Mar. 2014.

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

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica, 2001. 1466 p.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance: the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LEHNINGER, A. et al. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M. Phytochemical diversity: the sounds of silent metabolism. **Plant Science**, Shannon, v. 176, n. 2, p. 161-169, 2009.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MILLEZI, A. F. **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2012. 112 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

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.

MISHRA, N. C.; BLOBEL, G. **Introduction to proteomics: principles and applications**. New York: Wiley, 2010. 200 p.

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

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.

OTONI, C. G. et al. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 41, p. 188-194, 2014.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* present in bologna and ham. **Journal of Food Protection**, Guildford, v. 70, n. 4, p. 901-908, Apr. 2007.

PASQUA, R. D. et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 4863-4870, 2007.

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

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.

SHAH, B.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Nanocapsular dispersion of thymol for enhanced dispersibility and increased antimicrobial effectiveness against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in model food systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 23, p. 8448-8453, Dec. 2012.

SHARIFI-RAD, J. et al. Biological activities of essential oils: from plant chemoeology to traditional healing systems. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 1, p. 55-70, 2017.

SHEN, S. et al. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**, Guildford, v. 47, p. 196-202, 2015.

SIHTO, H. M. et al. Growth behavior and temporal enterotoxin D expression of *Staphylococcus aureus* strains under glucose and lactic acid stress. **Food Control**, Guildford, v. 62, p. 69-73, 2016.

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

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007. 1104 p.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZEER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2004. p. 403-434.

SINGH, G. et al. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 1650-1661, 2007.

- SMIGIC, N. et al. Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 with lactic acid, neutralized electrolyzed oxidizing water and chlorine dioxide followed by growth under sub-optimal conditions of temperature, pH and modified atmosphere. **Food Microbiology**, Cambridge, v. 26, p. 629-637, 2009.
- SPANU, V. et al. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 153, n. 1/2, p. 53-57, 2012.
- TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia: Staphylococcus aureus**. São Paulo: Atheneu, 2005.
- VALE, L. A. et al. Formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* em diferentes superfícies. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 22., 2013, Lavras. **Anais...** Lavras: Ed. UFLA, 2014. 1 CD-ROM.
- VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, Washington, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.
- VISVALINGAM, J.; PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. In vitro enhancement of antibiotic susceptibility of drug resistant *Escherichia coli* by cinnamaldehyde. **Food Control**, Guildford, v. 79, p. 288-291, 2017.
- WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.
- 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. 6, p. 3500-3505, 2004.

CAPÍTULO 2

Adaptação homóloga e heteróloga e inativação termoquímica de *Staphylococcus aureus* ao cinamaldeído

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva, mesófila, patogênica, capaz de causar toxiose alimentar. É largamente distribuída na natureza, sendo habitante natural de humanos e animais.

Diversas espécies de *Staphylococcus*, incluindo *S. aureus*, destacam-se pela capacidade de se tornarem resistentes a grande número de drogas antibacterianas, devido, principalmente, ao uso frequente e indiscriminado dessas drogas e, também, aos mecanismos de transferência de resistência entre micro-organismos.

Com isso, crescente interesse pela compreensão dos mecanismos envolvidos na adaptação de células microbianas a condições ambientais têm sido constatado, visto que a resistência antimicrobiana é também problema de segurança alimentar, representando um risco direto quando o micro-organismo patogênico resistente se encontra no alimento ingerido ou indireto, quando a resistência é transmitida de uma bactéria comensal do alimento para uma bactéria patogênica ao homem (DOULGERAKI et al., 2017).

Na indústria de alimentos, a contaminação microbiana é reduzida pela aplicação de tratamentos físicos, tais como calor ou tratamentos químicos, como utilização de ácidos orgânicos (BEGLEY; HILL, 2015). O efeito desses tratamentos também pode ser diminuído por uma “proteção cruzada” gerada pela exposição prévia de micro-organismos ao estresse subletal ou às concentrações subletais de um agente antimicrobiano (BIKELS-GOSHEN et al., 2010; CEBRIÁN et al., 2009). A exposição de bactérias a concentrações subletais de agente antimicrobianos tem levado a uma certa adaptação. A adaptação e a adaptação cruzada de bactérias têm sido muito estudadas por conferirem aos micro-organismos resistência a um fator de estresse diferente daquele submetido anteriormente, tornando-se outro fator preocupante, no que diz respeito ao combate desses micro-organismos. De acordo com Álvarez-Ordóñez et al. (2008), a exposição a condições subletais de substâncias antimicrobianas pode resultar no desenvolvimento de aumento da tolerância aos mesmos fatores (homólogos) ou a agente de estresse de tolerância cruzada (heterólogos).

Novas medidas no controle de micro-organismos devem ser tomadas, no intuito de encontrar biocidas com amplo espectro de ação. Os óleos essenciais e seus componentes demonstraram serem alternativas no controle de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes, uma vez que sua ação antimicrobiana é comprovada (BEHBAHANI et al., 2018; DIAS et al., 2015; MIRANDA et al., 2016; NAZZARO et al., 2013). Contudo, pouco se sabe sobre a adaptação a concentrações subletais de óleos essenciais ou de seus constituintes.

A capacidade para crescer na presença de substâncias tóxicas poderia exigir modificações na expressão do gene. Quando as células são expostas a condições de estresse, elas podem mudar seu perfil proteico e isso contribui para sua maior tolerância e sobrevivência. Isso pode aumentar a capacidade de *Staphylococcus aureus* sobreviver a processamentos de alimentos. Neste contexto, os objetivos, neste trabalho, foram avaliar a atividade antimicrobiana, a adaptação e a curva de morte termoquímica de *Staphylococcus aureus* GL 5674 e *Staphylococcus aureus* GL 8702, quando submetidos a uma concentração subletal de cinamaldeído e avaliar a capacidade destas bactérias de desenvolver adaptação ao estresse ácido e adaptação cruzada entre estresse ácido e cinamaldeído.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, localizado no Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Biotecnologia Florestal, no Departamento de Ciências Florestais, ambos da Universidade Federal de Lavras.

2.1 Componentes majoritários

O componente majoritário cinamaldeído (93% de pureza) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

2.2 Micro-organismos, padronização e preparo dos inóculos

Foram utilizadas as cepas *Staphylococcus aureus* GL 5674 e *Staphylococcus aureus* GL 8702, m adquiridas da coleção de cultura da Embrapa Gado de Leite. em Juiz de Fora, MG.

As culturas estoque foram mantidas congeladas em meio de congelamento (glicerol, 15 mL; peptona bacteriológica, 0,5 g; extrato de levedura, 0,3 g; NaCl, 0,5 g e água destilada, 100 mL), durante o desenvolvimento do trabalho.

As cepas foram reativadas transferindo-se alíquotas de 10 µL das culturas estoque para tubos contendo 10 mL de caldo triptona de soja (TSB) e incubação, a 37 °C/24h. Os inóculos foram padronizados em cerca de 10⁸ UFC/mL, por meio da elaboração de curva de crescimento; o desenvolvimento dos micro-organismos foi acompanhado pela leitura da absorbância (D.O. 600 nm) e contagem de células viáveis por plaqueamento em ágar triptona de soja (TSA). As placas foram incubadas a 37 °C/24h.

2.3 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) de cinamaldeído

A concentração mínima bactericida do componente majoritário foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de microdiluição de 96 cavidades de poliestireno, de acordo com Oliveira et al. (2010). Foram utilizadas as concentrações de cinamaldeído de 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00% (v/v). As soluções foram elaboradas em TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 (TW). Após a adição de

200 µL de solução nas cavidades, alíquotas de 10 µL das culturas padronizadas foram inoculadas.

Foram realizadas três repetições em triplicata, com dois controles para o composto testado, sendo o controle negativo, contendo TSB+TW e diferentes concentrações do composto e o controle positivo, contendo TSB+TW e inóculo. As placas foram vedadas e incubadas, a 37 °C/ 24h. Após incubação, 10 µL das culturas de cada cavidade foram plaqueados em TSA, empregando-se a técnica de migrogota e incubados, a 37 °C/ 24h. A menor concentração de cinamaldeído que promoveu a ausência de crescimento em placa foi denominada de CMB.

2.4 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório de *Staphylococcus aureus*

A influência do pH no crescimento de *S. aureus* foi avaliada em microplacas de poliestireno de 96 cavidades. Em cada cavidade foram dispensados 150 µL de caldo TSB, com pH previamente ajustado com ácido láctico (98%) e inoculados 10 µL das culturas padronizadas. Foram avaliados os pH de 6,0; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5 e 2,0. As microplacas foram incubadas a 37 °C/24h, com posterior plaqueamento em TSA, empregando-se a técnica de microgota. O pH mínimo inibitório foi definido, por meio de avaliação visual, como o menor valor capaz de inibir, completamente, o crescimento bacteriano e o pH mínimo de crescimento, aquele imediatamente acima ao pH mínimo inibitório.

2.5 Adaptação de *Staphylococcus aureus* ao cinamaldeído e ao pH ácido

2.5.1 Adaptação de *Staphylococcus aureus* ao cinamaldeído

As células de *S. aureus* foram expostas a concentrações subletais de cinamaldeído. As doses subletais foram determinadas com base nas CMB equivalentes a CMB/8 e CMB/16. Em tubos tipo Falcon contendo 40 mL de TSB+TW foi adicionado o inóculo na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹. Os tubos foram incubados a 37 °C/6h. Após a incubação foi adicionado o cinamaldeído em concentração subletal. Os tubos foram novamente incubados, a 37 °C/ 12h e, após esse período, as culturas foram centrifugadas a 5.000 xg/5 min e as células adaptadas, lavadas três vezes com solução salina, ressuspensas em TSB e padronizadas em torno de

10^8 UFC mL⁻¹, de acordo com a escala Mc Farland, para posterior utilização. Foi realizado também o plaqueamento em meio TSA para confirmar a concentração.

2.5.2 Adaptação de *Staphylococcus aureus* ao pH ácido

As células de *S. aureus* foram expostas ao pH mínimo de crescimento de cada bactéria. Em tubos tipo Falcon contendo 18 mL de TSB com pH mínimo de crescimento de cada cultura, ajustado com ácido láctico, foram inoculados 2 mL de inóculo padronizado e incubados, a 37 °C/6h. Após esse período, as culturas foram centrifugadas (5.000 g/5min) e as células adaptadas, lavadas três vezes com solução salina, ressuspensas em TSB e padronizadas em torno de 10^8 UFC mL⁻¹, de acordo com a escala Mc Farland, para posterior utilização. Foi realizado também o plaqueamento em meio TSA para confirmar a concentração.

2.6 Avaliação da adaptação de *Staphylococcus aureus* ao cinamaldeído e resposta à tolerância ácida

2.6.1 Cinamaldeído

As células expostas às concentrações subletais de cinamaldeído foram inoculadas em meio contendo diferentes concentrações do mesmo composto (CMB/2; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2CMB) ao qual a cultura foi previamente exposta. O ensaio foi realizado em microplacas como descrito no item 2.3. Após incubação a 37 °C/24h, alíquotas de 10 µL foram retiradas das cavidades e plaqueadas em TSA e incubadas a 37 °C/24h. As células de *S. aureus* foram classificadas como capazes de se adaptarem quando cresceram em placas após cultivo em presença do componente em concentrações iguais ou maiores que a CMB. Células de *S. aureus* não adaptadas foram utilizadas como controle.

2.6.2 Resposta de tolerância ácida

As células adaptadas ao pH mínimo de crescimento foram ressuspensas em TSB e as suspensões padronizadas em 10^8 UFC mL⁻¹. Alíquotas de 10 µL das suspensões foram dispensadas nos poços das microplacas contendo TSB com diferentes pH, ajustados com ácido láctico (98%). Avaliaram-se os pH de 6,0; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5 e 2,0. As placas

foram incubadas a 37 °C/ 24h. Após incubação, foi realizado o plaqueamento em TSA, empregando-se a técnica de microgota, seguindo-se incubação, a 37 °C/24h. Considerou-se a capacidade das células de *S. aureus* desenvolver tolerância ácida quando houve crescimento em pH inferior ao pH mínimo de crescimento. Células não adaptadas foram utilizadas como controle.

2.7 Adaptação cruzada

2.7.1 Avaliação da adaptação cruzada entre o cinamaldeído e estresse ácido

Após serem expostas à concentração subletal (1/16) de cinamaldeído, alíquotas de 10 µL das culturas padronizadas foram inoculadas nos poços das microplacas contendo 150 µL de TSB com pH previamente ajustado para 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 6, com ácido láctico (98%) e incubadas, a 37 °C/24h. Após esse período, realizou-se o plaqueamento em TSA. Considerou-se a capacidade de *S. aureus* desenvolver adaptação cruzada pelo crescimento em placa após exposição ao pH abaixo do mínimo de crescimento.

2.7.2 Avaliação da adaptação heteróloga entre estresse ácido e cinamaldeído

Após serem expostas ao pH ácido, alíquotas de 10 µL das culturas de *S. aureus* padronizadas foram inoculadas nos micropoços contendo 150 µL de TSB+TW e de cinamaldeído, nas concentrações de CMB/2, CMB, 1,2CMB, 1,4CMB, 1,6CMB, 1,8CMB e 2CMB (v/v) e incubadas a 37 °C/24h. O crescimento da cultura foi avaliado pelo plaqueamento em TSA e incubação a 37 °C/ 24h. Considerou-se a capacidade de *S. aureus* desenvolver adaptação cruzada quando as células se multiplicaram em presença de cinamaldeído em concentração igual ou superior à CMB.

2.8 Curva de morte termoquímica

2.8.1 Células de *Staphylococcus aureus* não adaptadas

A influência de cinamaldeído e da temperatura sobre o tempo de inativação de *S. aureus* GL 5674 foi avaliada empregando-se o teste de diluição (ANDRADE; MACEDO, 1996). Foram preparadas soluções contendo cinamaldeído, valores selecionados com base na

CMB, em TSB+TW. Alíquotas de 1 mL da cultura padronizada foram transferidas para tubos contendo 9 mL das diferentes soluções. Após 5, 10, 20, 30 e 35 minutos de exposição a 7 °C e 37 °C, a viabilidade das células foi avaliada por plaqueamento de 10 µL das soluções em TSA e incubação a 37 °C/24h. Um controle contendo os micro-organismos em TSB+TW foi realizado.

2.8.2 Células de *Staphylococcus aureus* GL 5674 adaptadas

As células de *S. aureus* GL 5674 adaptadas à concentração subletal de cinamaldeído de CMB/16 foram utilizadas. As células adaptadas e padronizadas foram inoculadas em soluções de cinamaldeído nas concentrações equivalentes à CMB e incubadas a 37 °C. Alíquotas de 10 µL de cada solução foram transferidas para placas contendo TSA, após 5, 10, 20 e 35 minutos de incubação. As placas foram incubadas a 37 °C/24h. Um controle contendo as células adaptadas do micro-organismo em TSB+TW foi realizado.

2.9 Proteômica de *Staphylococcus aureus* submetido à concentração subletal de cinamaldeído

2.9.1 Extração das proteínas

Staphylococcus aureus GL 5674 foi cultivado em 40 mL de TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 (v/v) em tubos tipo falcon contendo concentração subletal de cinamaldeído CMB/16. Após o cultivo, os tubos foram centrifugados, a 5000 rpm, por 10 minutos, para posterior extração de proteínas. A extração das proteínas foi feita com a utilização do kit GE Healthcare ilustra triplePrep, seguindo as orientações do fabricante. Foi realizado um controle contendo somente o micro-organismo em meio TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 (v/v).

2.9.2 Quantificação de proteínas

Para a quantificação de proteína total foram retiradas alíquotas dos extratos de cada tratamento e a determinação foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando-se albumina bovina (BSA) como padrão.

2.9.3 Focalização isoeétrica

As proteínas foram separadas por focalização isoeétrica (IEF), usando gel em fita com 13 cm de comprimento, com pH imobilizado entre 4 e 7 (ImmobilineDrystrips – AmershamBiosciences). As fitas para IEF foram reidratadas no suporte de reidratação individual em canaletas (ReswellingTray –AmershamBioscience), por 15 horas, à temperatura ambiente, em tampão de reidratação composto por tiureia/ureia, contendo ureia 7M, Tiureia 2M, 1% (v/v) de IPG Buffer (AmershamBioscience), 2,2% (v/v) de reagente destreak, 2% CHAPS (p/v), DDT (2,8 mg/ml) e traços de azul de bromofenol. O volume final de 250 μ L de tampão contendo 200 μ g de proteína foi aplicado nas canaletas e, após o período de reidratação, as fitas foram levadas ao focalizador isoeétrico EttanIPGphor3 (GE Healthcare), posicionadas nas canaletas e imersas em óleo mineral para eletroforese (AmershamBioscience).

A IEF foi realizada em quatro fases: a 500V por 1 hora, 1.000 V por 1 hora, 8.000 V por 2 horas e 30 minutos e 8.000 V por 30 minutos. Ao final, as fitas foram armazenadas em tubos, a -80 °C, até o início da eletroforese na segunda dimensão. Imediatamente antes da eletroforese na segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em uma solução contendo ureia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), Trizma base 75 mM, pH 8,8, acrescido, no primeiro passo, DTT 65 mM, por 15 minutos, o segundo passo, por 10 minutos e, finalmente, com iodoacetamida 0,2 M (sem DTT), por 15 minutos, sob movimentos oscilatórios constantes.

2.9.4 Segunda dimensão

As fitas de gel equilibradas foram colocadas no topo de um gel de poliacrilamida vertical de 12% (v/v) de solução acrilamida/BisAcrilamida, 0,3M de Trizma-base pH 8,8, 0,08% (v/v) de persulfato de amônio e 0,04% (v/v) TEMED. As tiras de gel foram seladas com agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (p/v) contendo 0,1% (p/v) de SDS, Trizma base 25 mM, glicina 192 mM e traços de azul de bromofenol. Os géis permaneceram em repouso por 5 minutos para a solidificação da agarose, seguido da adição do tampão de corrida. A eletroforese foi realizada, a 20 °C, em tampão contendo 0,1% (p/v) de SDS, glicina 192 mM e Trizma-base 25 mM, por 15 minutos, inicialmente a 200 mA e 80 V e, posteriormente, por 4,0 horas a 200 mA e 200V, numa cuba SE600, de acordo com as instruções do fabricante. Para cada condição foram corridos três géis contendo proteínas de extrações independentes.

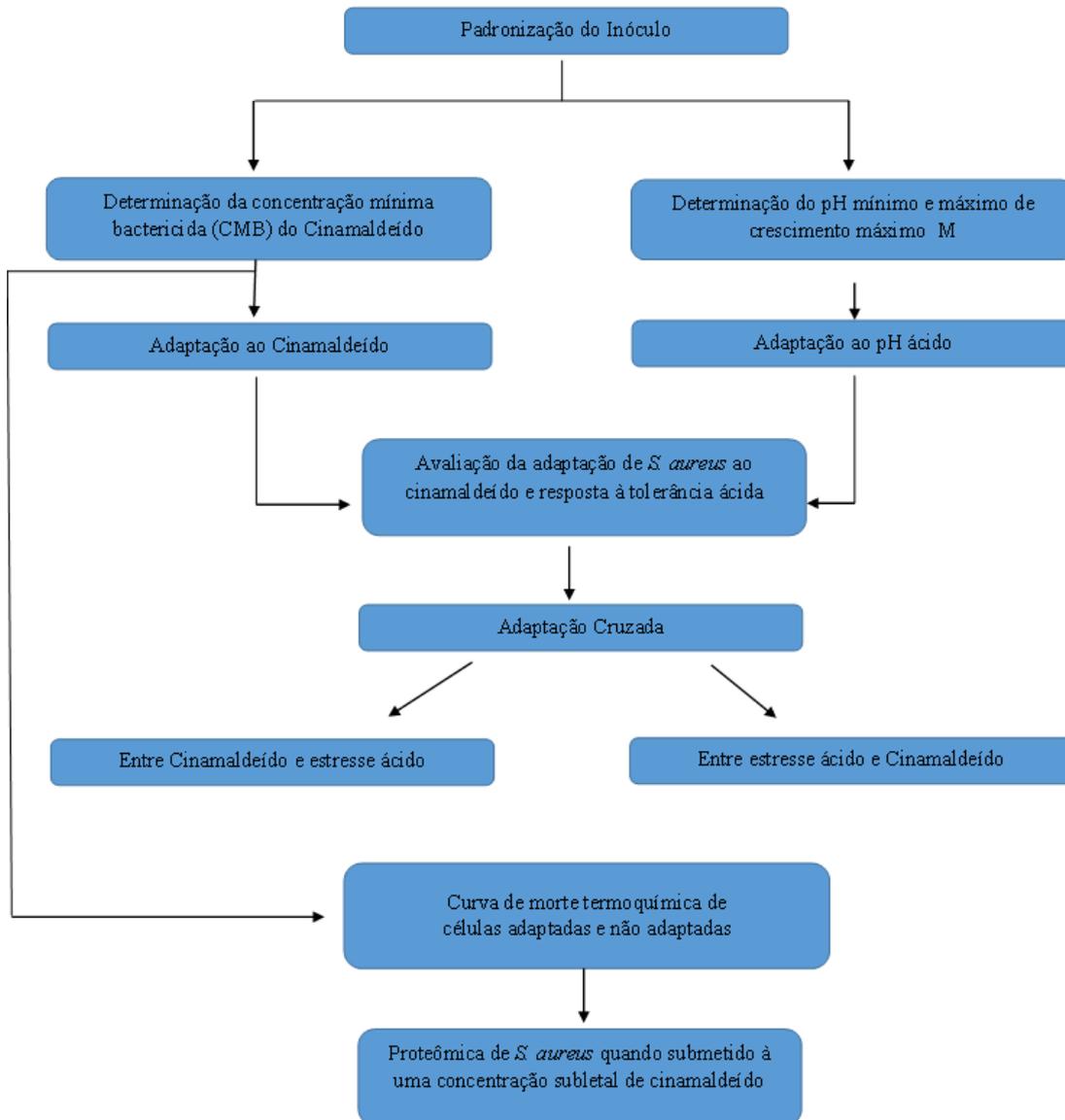
2.9.5 Detecção das proteínas em gel

2.9.5.1 Coloração dos géis

Os géis foram, inicialmente, colocados, por 30 minutos, em solução de fixação contendo 7% (v/v) de ácido acético, 40% (v/v) de metanol. Em seguida, os géis foram transferidos para a solução de coloração contendo quatro partes da solução com 0,1% (p/v) de Commassie Brilliant Blue G-250, 1,6% (v/v) ácido fosfórico e 12% (p/v) de sulfato de amônio e 20 % (v/v) de metanol. Os géis foram mantidos na solução de coloração por cinco dias. Ao fim desse período, os géis foram neutralizados, por 3 minutos, em solução de descoloração contendo 1,2% (p/v) de Tris-Base, pH 6,5 aferido com ácido ortofosfórico. Posteriormente, foram lavados em solução contendo 40% (v/v) de metanol, por 1 minuto e armazenados em solução contendo 20% (p/v) de sulfato de amônio.

Um fluxograma da metodologia utilizada neste trabalho pode ser visto a seguir.

Fluxograma referente à metodologia utilizada neste trabalho.



Fonte: Da autora (2018).

2.10 Delineamento experimental estatístico

Foi realizada uma análise estatística da curva de morte termoquímica de *S. aureus* GL 5674 a 37 °C e a 7 °C. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com três repetições, em esquema fatorial. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software Sisvar versão 4.6.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentração mínima bactericida e adaptação de *S. aureus* GL 5674 e *S. aureus* GL 8702 ao cinamaldeído

As CMB de cinamaldeído para *S. aureus* GL 5674 e *S. aureus* 8702 foram, respectivamente, de 0,25% e 0,5%.

As cepas de *S. aureus* GL 5674 e GL 8702 foram previamente cultivadas em presença de cinamaldeído nas concentrações de 0,03125% e 0,0625%, respectivamente, correspondentes a 1/8 das CMB determinadas para cada cepa. Elas também foram submetidas ao estresse subletal causado por seu cultivo em presença de 1/16 da CMB de cinamaldeído (0,015625% para GL 5674 e 0,03125% para GL 8702). Tanto *S. aureus* GL5674 quanto *S. aureus* GL 8702 foram capazes de desenvolver adaptação homóloga ao cinamaldeído, sendo capazes de crescer nas CMB determinadas anteriormente. Entretanto, nenhuma das cepas cresceu em concentrações maiores que a CMB (1,2 CMB, 1,4 CMB, 1,6 CMB, 1,8 CMB e 2 CMB). Essa adaptação ocorreu de forma semelhante para ambas as concentrações subletais utilizadas (1/8 e 1/16 CMB) para as duas cepas. A adaptação de ambas as cepas de *S. aureus* ao cinamaldeído sugere aumento de tolerância destas bactérias ao cinamaldeído, quando este não é utilizado na concentração correta.

A adaptação de *S. aureus* pode ter ocorrido por diversos fatores. Um deles seria o mecanismo das diversas modificações que os compostos podem causar no metabolismo celular e síntese de proteínas associadas ao estresse, como ocorreu com *Salmonella* Thompson, após seu cultivo em concentração subletal de timol. *Salmonella* Thompson, após ser tratada com concentração subletal de timol, apresentou grande variação na expressão de proteínas, alterando também diferentes vias do metabolismo celular. Muitas proteínas foram superproduzidas, outras tiveram sua produção reduzida drasticamente com mudanças significativas das suas classes funcionais. Diferentes proteínas chaperonas foram superproduzidas, bem como aquelas associadas ao mecanismo de proteção ao estresse térmico (DI PASQUA et al., 2010).

Ultee et al. (2000), estudando o cultivo de *Bacillus cereus* em presença de concentrações subletais de carvacrol, constataram que o carvacrol promoveu a diminuição da fluidez da membrana citoplasmática devido a alterações na constituição dos ácidos graxos. Além disso, observou-se que o composto, embora tenha alterado a composição da membrana, não foi metabolizado.

Ao contrário do que ocorreu neste trabalho, Luz et al. (2013), avaliando a tolerância de *S. aureus* frente ao óleo essencial de orégano e seu composto majoritário carvacrol, verificaram que esta bactéria não foi capaz de se adaptar a concentrações subletais desses antimicrobianos.

As condições que os micro-organismos enfrentam durante o processamento de alimentos podem conduzir para o desenvolvimento de respostas adaptativas fisiologicamente, e o desenvolvimento de tolerância após a exposição a fatores de estresse que são capazes de causar lesão subletal para as células microbianas (LUZ et al., 2012). Pode-se dizer que a exposição subletal a determinadas condições ambientais e substâncias antimicrobianas pode resultar no aumento da tolerância aos mesmos agentes de estresse ou tolerância cruzada a agentes de estresse distintos (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2008).

A tolerância pode ser adquirida por meio de mutação genética ou ser conferida por condições ambientais (BRAUNER et al., 2016; MCDERMOTT, 1958). Por exemplo, condições de estresse durante o crescimento demonstraram aumentar a tolerância a várias classes de antibióticos. Esta tolerância foi explorada por Lederberg e Zinder (1948), para isolar mutantes auxotróficos, pois apenas os auxotróficos que não estão em fase de crescimento são capazes de sobreviver quando uma população bacteriana mutagenizada é exposta à penicilina na ausência de um aminoácido. Um estado não crescente que leva à tolerância também pode ser induzido pelo próprio antibiótico. Essa tolerância induzida por exposição subsequente a drogas protege as bactérias da atividade letal do antibiótico (BRAUNER et al., 2016).

3.2 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório de *Staphylococcus aureus* e resposta a tolerância ácida

O pH mínimo de crescimento e o mínimo inibitório para *S. aureus* GL 5674 e *S. aureus* GL 8702 foram de 4 e 3,5, para ambas as cepas, respectivamente. Quando células de *S. aureus* foram submetidas ao estresse ácido, observou-se a capacidade das cepas de desenvolver tolerância ácida, tendo o pH mínimo inibitório para a cepa GL 5674 passado para 2,5 e para 3,0, para a cepa GL 8702.

As células de *S. aureus* são inativadas rapidamente em pH 2, contudo, desenvolvem resistência, se adaptadas, primeiro, por meio de uma via mediada por sigB (CHAMPOMIER-VERGES et al., 2001). Isso leva à indução de sodA. Um mutante sodA demonstra aumento da sensibilidade ao ácido, sugerindo que o estresse ácido, por sua vez, leva ao estresse oxidativo

(CLEMENTS; FOSTER, 1999). Isso é significativo quando se consideram os papéis combinados de baixo pH e estresse oxidativo. Segundo Chan e Foster (1998), *S. aureus* adquire resistência ácida quando pré-incubado ao pH subletal de 4, antes de sua exposição ao pH 2, sendo essa resposta adaptativa mediada via fator sigma B. Em 10 isolados mutantes de *S. aureus*, seis foram mais sensíveis ao pH 2, comparados à cepa selvagem, sendo que dois deles tinham mutações em genes que codificam homólogos de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase e sintase de heme A, respectivamente, o que pareceu resultar em diminuição da viabilidade, independentemente do estresse. Os outros mutantes não tinham *sodA*, que foi discutido acima; *RpoE*, que parece desempenhar papel regulador na fase estacionária; uma proteína de função desconhecida e *UmuC*. *UmuC* desempenha papel na resposta SOS em *B. subtilis*, isto é, a resposta induzida em resposta a dano ao DNA, novamente demonstrando a importância do sistemas de reparo de DNA na resposta ao baixo pH (COTTER; HILL, 2003; WATSON; ANTONIO; FOSTER, 1998).

Em geral, para crescimento e sobrevivência, as bactérias requerem valores de pH que estão entre 4 e 8 (WHEELER; HURDMAN; PITT, 1991). No entanto, os micro-organismos podem sobreviver em condições de baixo pH e, embora o crescimento seja inibido, as células ainda podem estar metabolicamente ativas. Os requisitos de energia de um micro-organismo em ambiente de baixo pH são maiores que a energia necessária em valores ideais de pH. Isso ocorre porque a bomba de prótons que requer energia está em uso, com prótons sendo bombeados para fora da célula. Em ambientes com pH alto, os prótons podem ser bombeados para dentro da célula. Se o pH não for equilibrado, a célula é incapaz de sintetizar os componentes celulares normais e também de se dividir e crescer (BEALES, 2004; BOOTH; KROLL, 1989; BROWN; BOOTH, 1991).

3.3 Adaptação cruzada

Conforme apresentado na Tabela 1, *S. aureus* 5674 e *S. aureus* 8702 apresentaram capacidade de adaptação cruzada por crescerem em pH inferior ao mínimo de crescimento (4,0). *S. aureus* GL5674 tornou-se capaz de crescer em pH 3,0, após exposição à concentração subletal de cinamaldeído. Já *S. aureus* 8702 mostrou capacidade de crescimento em pH 3,5. Esses resultados demonstram a capacidade de ambas as cepas tornarem-se mais tolerantes, após serem expostas à concentração subletal de cinamaldeído.

Tabela 1 - Adaptação cruzada de *Staphylococcus aureus* GL 5674 e GL 8702 ao pH, após pré-exposição ao estresse subletal CMB/16 de cinamaldeído.

Cepa	Estresse subletal de cinamaldeído %	Estresse letal pH	
		Mínimo de crescimento	Mínimo inibitório
GL 5674	0,0156	3,0	2,5
GL 8702	0,03125	3,5	3,0

Fonte: Da autora (2018).

Nas Tabelas 3 e 4 encontram-se os resultados de adaptação cruzada das cepas de *S. aureus* ao cinamaldeído, após exposição ao pH mínimo de crescimento. Observa-se que ambas as cepas cresceram em concentrações maiores que a CMB de cinamaldeído (0,25% para GL 5675 e 0,5% para GL 8702), a qual era previamente susceptível, sendo as novas CMB de 0,35% (1,4 x CMB) para *S. aureus* GL 5675 e de 0,6% (1,2 x CMB) para *S. aureus* GL 8702.]

Tabela 2 - Avaliação do crescimento de *Staphylococcus aureus* GL 5674 sobre diferentes concentrações de cinamaldeído após ter sofrido estresse subletal.

Resistência ao fator letal	Estresse subletal pH mínimo de crescimento
2CMB	(-)
1,8CMB	(-)
1,6CMB	(-)
1,4CMB	(+)
1,2CMB	(+)
CMB*	(+)
CMB/2	(+)

*CMB = 0,25 % para *S. aureus* GL 5674

Fonte: Da autora (2018).

Tabela 3 - Avaliação do crescimento de *Staphylococcus aureus* GL 8702 sobre diferentes concentrações de cinamaldeído após ter sofrido estresse subletal.

Resistência ao fator letal	Estresse subletal pH mínimo de crescimento
2CMB	(-)
1,8CMB	(-)
1,6CMB	(-)
1,4CMB	(-)
1,2CMB	(+)
CMB*	(+)
CMB/2	(+)

*CMB = 0,5% para *S. aureus* 8702

Fonte: Da autora (2018).

Com base no conceito de adaptação cruzada, segundo o qual o micro-organismo torna-se resistente a determinado fator de estresse após ter sido exposto a outro agente estressor, observa-se a ocorrência da indução de tolerância cruzada em *S. aureus* GL 5675 e *S. aureus* GL8702. É importante destacar que, apesar de *S. aureus* 5674 ser mais susceptível ao cinamaldeído (CMB de 0,25%), esta cepa apresentou maior pré disposição a desenvolver tolerância em situações estressantes.

Alguns relatos de adaptação e capacidade de adaptação cruzada para óleos essenciais e seus principais componentes podem ser encontrados na literatura. Essas descrições examinaram as capacidades de adaptação e/ou adaptação cruzada de *L. monocytogenes* ATCC 19117 ao carvacrol e eugenol (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015), de *Salmonella* Senftenberg ao linalol e ao óleo de manjerição (KALILY et al., 2017), de *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para *Origanum vulgare*, *Melaleuca alternifolia*, *Cinnamomum cassia* e *Thymus vulgaris* (MELO et al., 2015) e de *Staphylococcus aureus* (em duas das quatro estirpes testadas) ao carvacrol (NOSTRO et al., 2017).

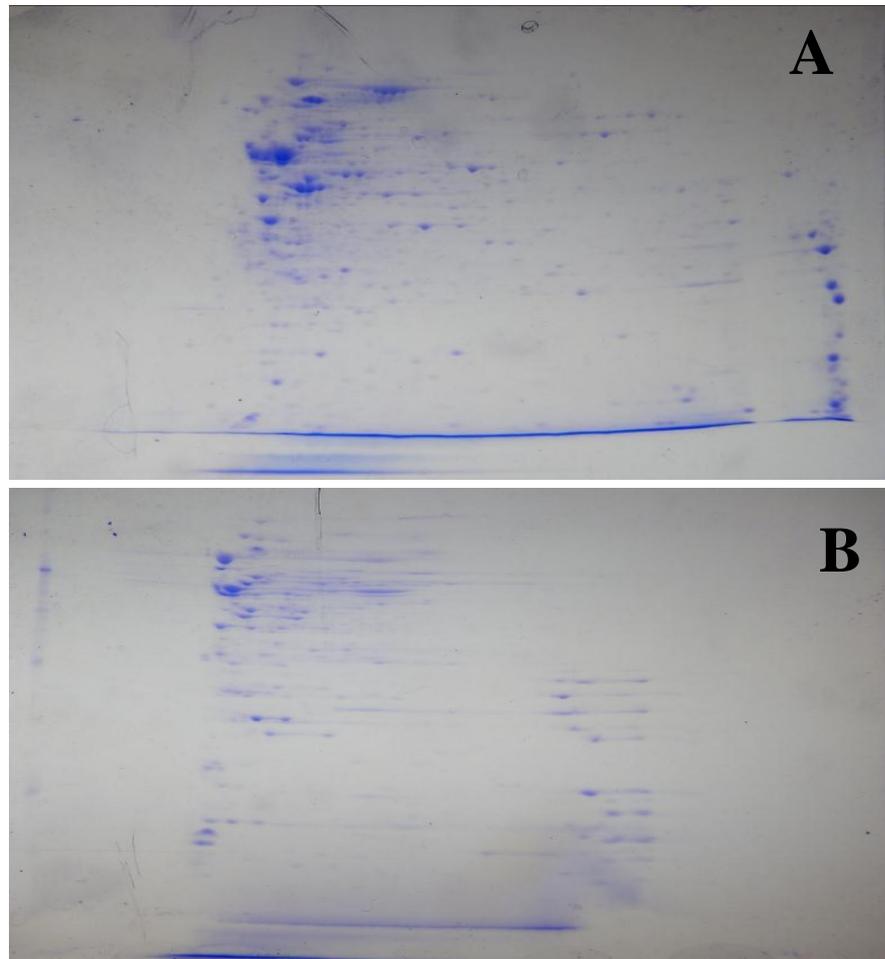
A adaptação sofrida pela exposição ao estresse leva a mudanças na expressão global de grande número de componentes celulares. Da mesma forma, a adaptação cruzada da bactéria exposta a diferentes estresses ambientais pode ser conferida pela ação de vários mecanismos metabólicos que parecem ser ativados pelos diferentes estresses (SONI et al., 2011). Geralmente, quando as bactérias são expostas ao estresse induzido por substâncias tóxicas ocorre o aumento na síntese das proteínas de estresse ou HSPs. Essas proteínas (HSPs) pertencem às famílias das chaperonas, tendo papel importante na montagem de polipeptídeos recém-sintetizados, em sua conformação nativa e no dobramento e reparação das proteínas do citosol (DI PASQUA et al., 2010).

3.4 Proteômica de *Staphylococcus aureus* GL 5674 quando exposta a uma concentração subletal de cinamaldeído

A cepa *Staphylococcus aureus* GL 5674 foi selecionada para dar continuidade ao trabalho, em vista dos resultados até aqui obtidos.

Diferenças de vários spots de proteínas com maior ou menor níveis de expressão, quando *S. aureus* foi submetida a uma concentração subletal de cinamaldeído, podem ser notadas visivelmente nas imagens da Figura 1, ressaltando a ideia de que, ao serem expostas a concentrações subletais de antimicrobianos, ocorrem modificações no proteoma bacteriano.

Figura 1 - Perfil total de proteínas celulares extraídas de células de *Staphylococcus aureus* GL 5674 (A) não expostas à concentração subletal de cinamaldeído e (B) submetidas ao estresse subletal.



Fonte: Da autora (2018).

Estudos fisiológicos para *S. aureus* baseados em gel-2D foram publicados compreendendo experimentos de “privação”, como, por exemplo, a limitação de glicose (KOHLER et al., 2003, 2005; SEIDL et al., 2009), a influência do estado anaeróbico na fisiologia estafilocócica (FUCHS et al., 2007) e o impacto de estresse oxidativo sobre *S. aureus* (HOCHGRÄFE et al., 2008; WOLF et al., 2008). Estes estudos baseados em técnicas proteômicas são perfeitamente adequados para refletir alterações em todo metabolismo, pela visualização das principais rotas metabólicas em um ensaio centrado em uma única proteína (OTTO et al., 2014). Análises proteômicas do estado fisiológico das células, e de células crescendo sob cenários relacionados à infecção, tais como formação e crescimento de biofilmes, podem ser utilizadas para apontar as diferenças entre células de *S. aureus* de crescimento planctônico e células de *S. aureus* formadoras de biofilmes (RESCH et al., 2006).

Conforme demonstrado por Siroli et al. (2015), ao serem expostas a diferentes concentrações subletais de óleos essenciais de tomilho e orégano, bem como carvacrol, timol, trans-2-hexenal e citral, as bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis* modificaram o perfil de proteínas relacionadas à biossíntese de ácidos graxos, por ter ocorrido aumento de ácidos graxos insaturados. Os mesmos autores complementam que essa mudança no perfil de ácidos graxos pode contribuir para a compreensão dos mecanismos de resposta ao estresse utilizados por diferentes microrganismos patogênicos frequentemente envolvidos em doenças transmitidas por alimentos em relação à exposição a concentrações subletais de antimicrobianos naturais, o que pode ter acontecido neste trabalho.

Di Pasqua et al. (2006) também verificaram que, ao serem expostos a concentrações subletais de antimicrobianos, os microrganismos alteram o perfil proteico relacionado à composição de ácidos graxos de membrana, aumentando a concentração de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, como um mecanismo adaptativo das células na presença de uma concentração subletal de composto antimicrobiano em resposta a uma condição de estresse. Os autores adicionaram soluções metanólicas de timol, carvacrol, limoneno, cinamaldeído e eugenol ao meio de crescimento de *S. aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas fluorescens*, *Brochothrix thermosphacta* e *E. coli* O157: H7, e verificaram que a concentração de ácidos graxos insaturados aumentou mais quando as células cresceram na presença de limoneno e cinamaldeído. Em ambos os casos, o aumento líquido resultou na diminuição da concentração de ácido palmítico (C16) e aumento na proporção linoléídica (C18), docosanoico (C22), e concentrações de ácido eicosapentaenoico (C20). Além disso, cinamaldeído também levou ao aumento da concentração de ácido palmitoleico (C16).

Um minucioso entendimento da fisiologia básica sob diferentes condições de estresse é uma chave valiosa para entender as adaptações fisiológicas básicas de determinado patógeno. Técnicas proteômicas ainda têm alto potencial para descobrir “alvos-chave” para terapias antimicrobianas (OTTO et al., 2014).

3.5 Curva de morte termoquímica de *Staphylococcus aureus* GL 5674 não adaptado e adaptado ao cinamaldeído

Avaliando-se a sensibilidade de *S. aureus* ao cinamaldeído associada à temperatura e ao tempo de inativação da bactéria, foi observada influência significativa da temperatura (Figura 2A).

Figura 2 - Curva de morte termoquímica de (A) *S. aureus* exposto à concentração mínima bactericida 0,25% (CMB) de cinamaldeído a 37 °C e 7 °C; (B) *S. aureus* exposto a 0,25% (CMB) e 0,375% (1,5 x CMB) de cinamaldeído a 7 °C; (C) *S. aureus* adaptado e exposto à CMB de cinamaldeído a 37 °C e (D) *S. aureus* adaptado e não adaptado, e exposto à CMB de cinamadeído, 0,25% a 37 °C. (Continua)

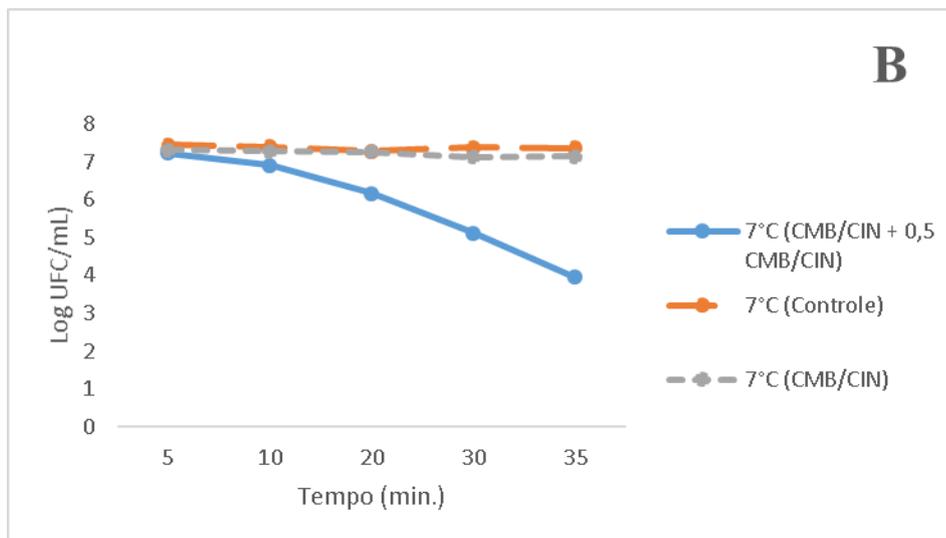
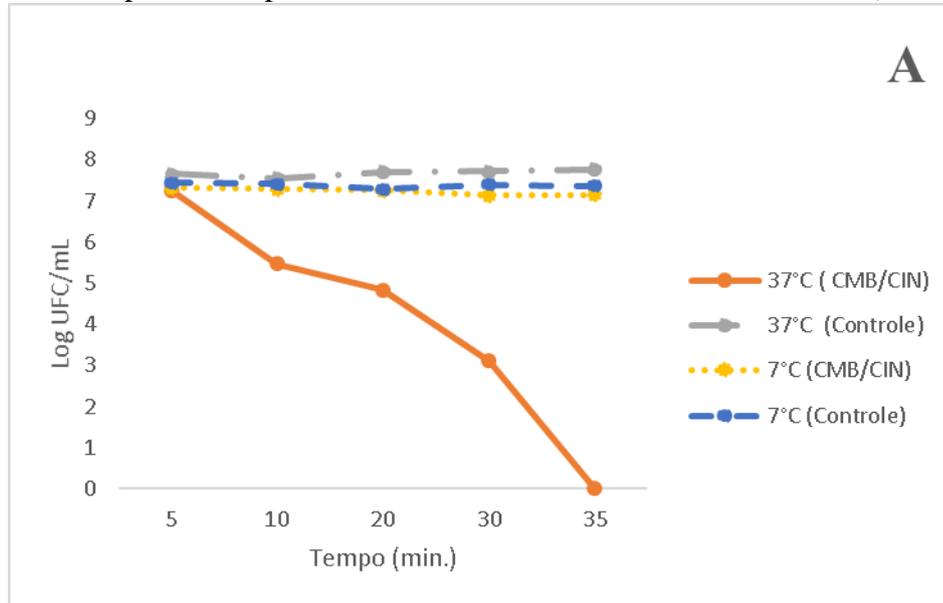
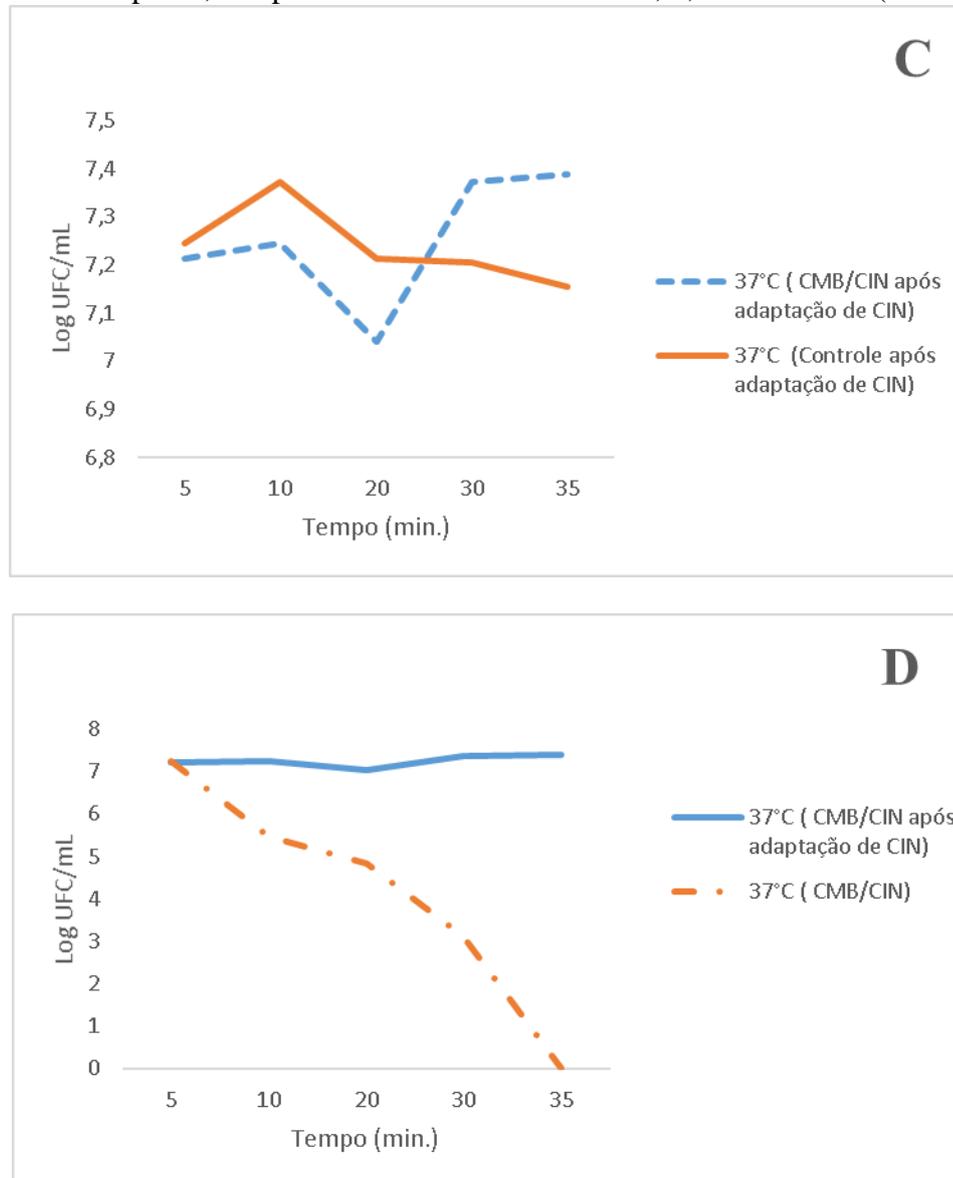


Figura 2 - Curva de morte termoquímica de (A) *S. aureus* exposto à concentração mínima bactericida 0,25%, (CMB) de cinamaldeído a 37 °C e 7 °C; (B) *S. aureus* exposto a 0,25% (CMB) e 0,375% (1,5 x CMB) de cinamaldeído a 7 °C; (C) *S. aureus* adaptado e exposto à CMB de cinamaldeído a 37 °C e (D) *S. aureus* adaptado e não adaptado, e exposto à CMB de cinamaldeído, 0,25% a 37 °C. (Conclusão)



Fonte: Da autora (2018).

Quando *S. aureus* GL 5674 foi submetido à CMB de cinamaldeído a 37 °C, após 5 minutos de contato, o número de células viáveis foi de 7,255 log UFC/mL. Já com 10 minutos, este número passou para 5,477 log UFC/mL, ocorrendo uma redução de 1,778 log UFC/mL. Esta redução foi aumentando ao longo do tempo e, após 35 minutos de contato, não foram detectadas células viáveis de *S. aureus* (redução de 7,653 log UFC/mL).

Entretanto, quando as células foram incubadas a 7 °C, a CMB de cinamaldeído não foi suficiente para eliminar a bactéria (Figura 2A). Pode-se observar que, dentre os 35 minutos

avaliados, o número de células viáveis de *S. aureus* se manteve entre 7,31 log UFC/ mL e 7,14 log UFC/mL, não havendo diferença significativa do controle. A temperatura de refrigeração de certa forma inviabilizou a ação antibacteriana do cinamaldeído.

Uma concentração maior que a CMB de cinamaldeído sobre *S. aureus* 5674, 0,375% (1,5 x CMB), foi testada a 7 °C (Figura 2B). Com isso, pode-se observar que, após 10 minutos de contato, o número de células viáveis de *S. aureus* começou a reduzir em relação ao controle e, com 20 minutos de contato, ocorreu uma redução de 1,271 log UFC/mL. Aos 35 minutos de contato, ocorreu redução de 3,493 log UFC/mL de células viáveis de *S. aureus*. Assim, pode-se concluir que, em baixas temperaturas, concentrações maiores que a CMB de cinamaldeído a 37 °C devem ser utilizadas para eliminar as células de *S. aureus*.

A curva de morte termoquímica a 37 °C após adaptação ao cinamaldeído de *S. aureus* GL 5674 foi realizada (Figura 2C). Observa-se que, nos primeiros 10 minutos de contato, houve redução de 0,127 log UFC/mL de células viáveis, em relação ao controle. Após 20 minutos de contato é notório que as células adaptadas começaram a se multiplicar, chegando a 7,389 log UFC/mL e, com isso, o cinamaldeído não foi capaz de eliminar *S. aureus* após 35 minutos de contato. Comparando a curva de morte termoquímica de *S. aureus* que sofreu adaptação ao cinamaldeído e a de *S. aureus*, que não foi submetida à adaptação, é nítida a redução do número de células viáveis, 7,255 log UFC/mL, dessa bactéria (Figura 2D), após 35 minutos de contato a 37 °C.

Para que a célula funcione normalmente, a membrana citoplasmática precisa ser altamente fluida, para que as proteínas da membrana possam continuar a bombear íons, absorver nutrientes e realizar a respiração (BEALES, 2004; BERRY; FOEGEDING, 1997; MADIGAN et al., 2016). Com isso, é essencial que os lipídios da membrana estejam no estado líquido cristalino, tendo mais fluidez. Quando a temperatura de crescimento de um micro-organismo é reduzida, alguns dos componentes normalmente fluidos tornam-se semelhantes a gel, o que impede que as proteínas funcionem normalmente. Portanto, para que esses componentes permaneçam fluidos, várias mudanças no padrão de ácidos graxos devem ocorrer. Salienta-se também que um importante mecanismo de ação dos óleos essenciais e de seus compostos consiste na modificação do perfil lipídico da membrana plasmática (BURT, 2004; DI PASQUA et al., 2010; NAZZARO et al., 2013). A não ação antimicrobiana do cinamaldeído a 7 °C (Figura 2B) pode ter ocorrido devido à alteração do estado físico da membrana plasmática, uma vez que *S. aureus* é uma bactéria mesofílica. Dessa forma, a baixa temperatura diminui a fluidez da membrana e, conseqüentemente, sua permeabilidade, diminuindo ou impossibilitando a ação do cinamaldeído.

A temperatura de determinada substância é a medida da velocidade de movimentação de suas moléculas (NELSON; COX, 2014). Dessa maneira, quanto menor a temperatura, menor a sua taxa de difusão, o que poderia prejudicar a penetração do composto através da membrana plasmática, justificando também a menor ação do cinamaldeído em baixa temperatura.

Pereira et al. (2014) avaliaram a sensibilidade de *S. aureus* a soluções sanificantes dos óleos essenciais de cardamomo e tomilho, e verificaram que, após 30 minutos de desinfecção com o óleo essencial de cardamomo, houve uma redução significativa de 4,29 log UFC/ mL do número de células de *S. aureus*, semelhante ao que ocorreu neste trabalho. Já para a solução contendo o óleo de tomilho, células viáveis não foram detectadas após 10 minutos, ocorrendo uma redução de 6,97 log UFC/mL. Esse trabalho foi realizado a 25 °C e 40 °C e não teve diferença significativa da temperatura.

Dessa forma, observou-se, neste trabalho, o que foi colocado por Burt (2004), ou seja, que a eficácia de um óleo essencial ou de seus componentes depende do pH da solução, da temperatura de tratamento e das concentrações e do tipo de componentes ativos.

É importante ressaltar a utilização correta e consciente dos antimicrobianos em geral sobre os micro-organismos, visto que eles podem desenvolver tolerância ou selecionar bactérias resistentes, dificultando, assim, o controle de bactérias patogênicas que podem colocar em risco a saúde pública.

4 CONCLUSÃO

Cinamaldeído apresentou CMB de 0,25% e de 0,5%, para *S. aureus* GL 5674 e *S. aureus* GL 8702, respectivamente, comprovando o potencial do cinamaldeído, composto majoritário do óleo essencial de canela, como um agente antibacteriano.

S. aureus GL 5674 e *S. aureus* GL 8702 desenvolveram tolerância quando foram submetidas a concentrações subletais de cinamaldeído. Quando cinamaldeído foi testado a 7 °C, este composto apresentou baixa atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* GL 5674, sendo necessárias concentrações maiores que a CMB de cinamaldeído.

S. aureus GL 5674 e *S. aureus* GL 8702 foram capazes de desenvolver tolerância ácida e foram capazes de desenvolver adaptação cruzada entre cinamaldeído e estresse ácido.

Os resultados até aqui obtidos da proteômica de *Staphylococcus aureus* GL 5674 são promissores para a identificação da mudança do perfil de proteína quando esta bactéria foi submetida a uma concentração subletal de cinamaldeído.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, p. 212-219, 2008.
- ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 165 p.
- BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 3, p. 1-20, 2004.
- BEGLEY, M.; HILL, C. Stress adaptation in foodborne pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 6, p. 191-210, 2015.
- 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**, London, v. 114, p. 449-452, 2018.
- BERRY, E. D.; FOEGEDING, P. M. Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 12, p. 1583-1594, 1997.
- BIKELS-GOSHEN, T. et al. Staphylococcal strains adapted to epigallocatechin gallate (EGCG) show reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin, increased heat tolerance, and altered cell morphology. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 138, n. 1/2, p. 26-31, 2010.
- BOOTH, I. R.; KROLL, R. G. The preservation of foods by low pH. In: GOULD, G. W. (Ed.). **Mechanisms of action of food preservation procedures**. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 119-160.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, Burnt Mill, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- 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.
- BROWN, M. H.; BOOTH, I. R. Acidulants and low pH. In: RUSSELL, N. J.; GOULD, G. W. (Ed.). **Food preservatives**. Glasgow: Blackie, 1991. p. 22-43.
- 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.
- CEBRIÁN, G. et al. Role of the alternative sigma factor σ_B on *Staphylococcus aureus* resistance to stresses of relevance to food preservation. **Journal of Applied Microbiology**, Newark, v. 107, n. 1, p. 187-196, 2009.

- CHAMPOMIER-VERGES, M. C. et al. Lactobacillus sakei: recent developments and future prospects. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, n. 10, p. 839-848, Dec. 2001.
- CHAN, P. F.; FOSTER, S. J. The role of environmental factors in the regulation of virulence-determinant expression in *Staphylococcus aureus* 8325-4. **Microbiology**, London, v. 144, n. 9, p. 2469-2479, 1998.
- CLEMENTS, M. O.; FOSTER, S. J.. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 7, p. 458-462, 1999.
- COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 3, p. 429-453, 2003.
- DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 2745-2749, 2006.
- DI PASQUA, R. et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, Bloxham, v. 10, p. 1040-1049, 2010.
- DIAS, N. A. A. et al. Antimicrobial activity of essential oils on *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 35, p. 466-472, Mar. 2015.
- DOULGERAKI, A. I. et al. Methicillin-resistant food-related *Staphylococcus aureus*: a review of current knowledge and biofilm formation for future studies and applications. **Research in Microbiology**, Paris, v. 168, n. 1, p. 1-15, 2017.
- FUCHS, S. et al. Anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 11, p. 4275-4289, 2007.
- HOCHGRÄFE, F. et al. Nitric oxide stress induces different responses but mediates comparable protein thiol protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, p. 4997-5008, 2008.
- 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, 2017.
- KOHLER, C. et al. Physiological characterization of a heme-deficient mutant of *Staphylococcus aureus* by a proteomic approach. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 6928-6937, 2003.
- KOHLER, C. et al. Proteome analyses of *Staphylococcus aureus* in growing and non-growing cells: a physiological approach. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 295, n. 8, p. 547-565, 2005.

LEDERBERG, J.; ZINDER, N. Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 70, p. 4267-4268, 1948.

LUZ, I. S. et al. Evidence for no acquisition of tolerance in *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p. 5021-5024, 2012.

LUZ, I. S. et al. Lack of induction of direct protection or cross protection in *Staphylococcus aureus* by sublethal concentrations of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol in a meat-based medium. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 195, n. 8, p. 587-593, 2013.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MCDERMOTT, W. Microbial persistence. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 30, n. 4, p. 257, 1958.

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.

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.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

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

OLIVEIRA, M. M. et al. Desinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 549-553, Apr. 2010.

OTTO, A. et al. The *Staphylococcus aureus* proteome. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 304, n. 2, p. 110-120, 2014.

PEREIRA, A. de A. et al. Thermochemical inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Enteritidis by essential oils. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 11, p. 2022-2028, 2014.

RESCH, A. et al. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. **Proteomics**, Bloxham, v. 6, p. 1867-1877, 2006.

SEIDL, K. et al. Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiology**, London, v. 9, p. 95, 2009.

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, n. 1, p. 185-192, Sept. 2015.

SONI, J. et al. Predictive data mining for medical diagnosis: an overview of heart disease prediction. **International Journal of Computer Applications**, New York, v. 17, n. 8, p. 43-48, 2011.

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, 2015.

ULTEE, A. et al. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 174, n. 4, p. 233-238, 2000.

WATSON, S. P.; ANTONIO, M.; FOSTER, S. J. Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* starvation-induced, stationary-phase mutants defective in survival or recovery. **Microbiology**, London, v. 144, p. 3159-3169, 1998.

WHEELER, K. A.; HURDMAN, B. F.; PITT, J. I. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 141-150, 1991.

WOLF, C. et al. Proteomic analysis of antioxidant strategies of *Staphylococcus aureus*: diverse responses to different oxidants. **Proteomics**, Bloxham, v. 8, p. 3139-3153, 2008.