



**NATÁLIA JUBRAM ZENERATTO**

**ADAPTAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* AOS ESTRESSES  
QUÍMICOS: ÓLEOS ESSENCIAIS, ANTIBIÓTICOS E pH**

**LAVRAS - MG  
2019**

**NATÁLIA JUBRAM ZENERATTO**

**ADAPTAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* AOS ESTRESSES QUÍMICOS: ÓLEOS  
ESSENCIAIS, ANTIBIÓTICOS E pH**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2019**

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

Zeneratto, Natália Jubram.

Adaptação de *Staphylococcus aureus* aos estresses  
químicos: óleos essenciais, antibióticos e pH / Natália Jubram  
Zeneratto. - 2019.

48 p.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

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

Bibliografia.

1. Antimicrobiano natural. 2. Tolerância. 3. Patógeno. I.  
Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Título.

**NATÁLIA JUBRAM ZENERATTO**

**ADAPTAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* AOS ESTRESSES QUÍMICOS: ÓLEOS  
ESSENCIAIS, ANTIBIÓTICOS E pH**

**ADAPTATION OF *Staphylococcus aureus* TO CHEMICAL STRESSES:  
ESSENTIAL OILS, ANTIBIOTICS AND pH**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2019

Dra. Angélica Cristina de Souza

UFLA

Dra. Monique Suela Silva

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2019**

Dedico este trabalho aos meus pais, Dulce e Valdecir

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente meus pais, Valdecir e Dulce, por todo o esforço para que eu pudesse nesta etapa dos meus estudos, por me apoiarem incondicionalmente, por todo amor, carinho, apoio, compreensão e incentivo nas horas de cansaço.

Aos meus amados avós, pelo amor e carinho.

A toda minha família, tios e primos, que fazem parte da minha trajetória de vida e que mesmo distantes sempre torceram por mim.

À minha orientadora Roberta, uma excelente profissional e pessoa admirável, por me acolher no laboratório, pela confiança, delicadeza, dedicação e paciência na orientação.

A todos meus amigos do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos, obrigada pelo carinho, auxílio e agradável convívio durante esse tempo, em especial a Eliane, Heloísa, Jorge, Michelle, Mônica, Renner, Silas e Suemis pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos membros da banca, Angélica e Monique, pela disponibilidade em participar e pela valiosa colaboração com este trabalho.

Às minhas queridas amigas, Isabella, Giovanna, Thaís e Thaísa, pelos momentos inesquecíveis que vivemos ao longo desses anos.

Aos meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares (PPGMAC), pela convivência e conhecimentos compartilhados, em especial a Érica, Hebe, Ludmila, Nathieli, Raíssa e Marlon.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao PPGMAC pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao coordenador José Eduardo, a Ana Luiza e aos professores do PPGMAC pelos ensinamentos transmitidos.

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

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogênica, Gram-positiva, não produz esporos, capaz de se desenvolver em ampla faixa de temperatura e causar toxinfecção alimentar, é o agente de maior importância em infecções hospitalares. Pela elevada capacidade de resistência a antimicrobianos comerciais, alternativas a eles têm sido propostas, destacando-se aqueles de origem natural, principalmente os óleos essenciais (OE) e seus componentes majoritários. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de adaptação direta e cruzada de *S. aureus* aos OE, antibióticos e pH. Para isso determinou-se as concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais de canela, orégano, menta e lavanda sobre *S. aureus*, foram essas de 0,062; 0,25; 1,0 e 2,0 % (v/v), respectivamente. Em seguida as células bacterianas foram submetidas aos estresses subletais gerados pelos OE nas concentrações de 1/4CMB, 1/8CMB e 1/16CMB, por 6 e 24h. As células adaptadas foram expostas a diferentes concentrações de óleos essenciais e ao teste de sensibilidade a antibióticos (cefuroxima, cloranfenicol, norfloxacin, novobiocina, tetraciclina). Após a determinação dos pH mínimo inibitório e mínimo de crescimento, 4,5 e 5,0, respectivamente, *S. aureus* foi submetido ao estresse ácido (pH 5) por 6 e 24h. Em seguida as células foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antibióticos. Foi observada a adaptação direta de *S. aureus* apenas nas concentrações de 1/4 e 1/8 da CMB do óleo de canela, após 6h de exposição. O óleo de menta, após 6h de exposição ao estresse subletal e o óleo de orégano, em ambos tempos, levou a redução da sensibilidade das células aos OE. Já a pré-exposição das células por 24h só levou a adaptação direta no óleo de menta. A cepa não foi capaz de se adaptar ao OE de lavanda em nenhuma das concentrações subletais utilizadas. A adaptação cruzada entre OE e antibióticos foi dependente não apenas do óleo essencial e do antibiótico utilizados como também do tempo de exposição ao estresse. Observou-se o aumento da sensibilidade das células a novobiocina após pré-exposição a 1/4 CMB do óleo de canela, por 6h e 1/16 CMB do óleo de menta, por 24h. De modo geral, pode-se concluir que a cepa estudada apresentou capacidade de resposta aos estresses avaliados.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano natural. Tolerância. Patógeno.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a pathogenic Gram-positive bacterium that does not produce spores, which can develop in a wide temperature range and cause food toxoinfection, is the most important agent in hospital infections. Due to their high resistance to commercial antimicrobials, alternatives have been proposed, especially those of natural origin, mainly essential oils (EO) and their major components. The objective of this study was to evaluate the ability of direct adaptation and cross-adaptation of *S. aureus* to EO, antibiotics and pH. The minimum bactericidal concentrations (MBC) of the essential oils of cinnamon, oregano, peppermint and lavender on *S. aureus* were determined: 0.062; 0.25; 1.0 and 2.0% (v / v), respectively. Afterwards the bacterial cells were submitted to the sublethal stresses generated by EO at concentrations of 1/4 MBC, 1/8 MBC and 1/16 MBC, for 6 and 24h. The adapted cells were exposed to different concentrations of essential oils and the antibiotic sensitivity test (cefuroxime, chloramphenicol, norfloxacin, novobiocin, tetracycline). After determination of minimum inhibitory pH and minimum growth, 4.5 and 5.0, respectively, *S. aureus* was submitted to acid stress (pH 5) for 6 and 24h. The cells were then submitted to the antibiotic sensitivity test. The direct adaptation of *S. aureus* was observed only at concentrations of 1/4 and 1/8 of the MBC of cinnamon oil after 6h of exposure. Peppermint oil, after 6h exposure to sublethal stress and oregano oil, in both times, led to the reduction of the sensitivity of the cells to EO. The pre-exposure of the cells for 24 hours only led to direct adaptation in peppermint oil. The strain was not able to adapt to lavender EO at any of the sublethal concentrations used. The cross-adaptation between EO and antibiotics was dependent not only on the essential oil and antibiotic used but also on the time of exposure to stress. The increase in cell sensitivity to novobiocin after pre-exposure to 1/4 MBC of cinnamon oil for 6 hours and 1/16 MBC of peppermint oil was observed for 24 hours. In general, it can be concluded that the strain studied presented capacity to respond to the stresses evaluated.

**Key words:** Natural antimicrobial. Tolerance. Pathogen.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	12
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
2.2 Fatores estressores .....	13
2.2.1 Antibióticos .....	14
2.2.1.1 Cefuroxima .....	15
2.2.1.2 Cloranfenicol .....	16
2.2.1.3 Norfloxacino .....	16
2.2.1.4 Novobiocina .....	16
2.2.1.5 Tetraciclina .....	17
2.2.2 Fatores estressores: pH .....	17
2.3 Resposta ao estresse ou resposta adaptativa .....	17
2.3.1 Adaptação de <i>S. aureus</i> ao estresse .....	18
2.4 Óleos essenciais: antimicrobianos naturais .....	20
2.4.1 <i>Cinnamomum cassia</i> (canela cássia) .....	23
2.4.2 <i>Lavandula angustifolia</i> (Lavanda).....	23
2.4.3 <i>Mentha piperita</i> (Menta) .....	24
2.4.4 <i>Origanum vulgare</i> (Orégano) .....	25
2.5 Relação entre óleos essenciais e a resposta adaptativa.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1 Local de condução do experimento .....	27
3.2 Óleos Essenciais .....	27
3.3 Microrganismo, padronização e manutenção da cultura .....	28
3.4 Avaliação da sensibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> – GL 4384 aos antibióticos .....	28
3.5 Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	29
3.6 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório .....	29

3.7 Adaptação de <i>Staphylococcus aureus</i> aos óleos essenciais.....	29
3.8 Avaliação da adaptação de <i>Staphylococcus aureus</i> aos óleos essenciais.....	30
3.9 Avaliação da capacidade de adaptação cruzada de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
3.9.1 Avaliação da adaptação cruzada de <i>Staphylococcus aureus</i> entre óleos essenciais e antibióticos .....	30
3.9.2 Avaliação da adaptação cruzada de <i>Staphylococcus aureus</i> entre pH e antibióticos.....	31
4. RESULTADOS .....	32
4.1 Sensibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> aos antibióticos .....	32
4.2 Concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais para <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
4.2 pH mínimo inibitório e mínimo de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
4.3 Adaptação de <i>Staphylococcus aureus</i> aos óleos essenciais.....	34
4.5 Resultados da adaptação cruzada de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	36
4.5.1 Adaptação cruzada de <i>Staphylococcus aureus</i> entre óleos essenciais e antibióticos .....	36
4.5.2 Adaptação cruzada de <i>Staphylococcus aureus</i> entre pH e antibióticos.....	38
5. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41

## 1. INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogênica, gram-positiva não produtora de esporos, capaz de se desenvolver em ampla faixa de temperatura, pH e atividade de água sendo agente causal de infecções hospitalares e intoxicação de origem alimentar de grande importância. *S. aureus* é produtor de vários tipos de enterotoxinas denominadas enterotoxinas estafilocócicas, destacando-se as SEA, SEB, SEC, SED e SEE como as principais que, ao serem ingeridas causam principalmente náuseas, vômitos, câibras abdominais, diarreia, febre e sudorese.

Sua importância como causador de toxinfecções alimentares se destaca por suas enterotoxinas serem termoestáveis, não sendo eliminadas pelos tratamentos térmicos utilizados na indústria alimentícia; e na saúde, pelo constante aparecimento de cepas multirresistentes aos antibióticos utilizados, pelo menos três classes de antibióticos e ser o maior causador de infecções nosocomiais no mundo.

As bactérias possuem vários mecanismos fisiológicos e genéticos que podem lhes proporcionar condições de se manterem colonizando determinado nicho ecológico, mesmo esse apresentando variações estressantes, como a alteração da temperatura, do pH, da pressão osmótica, do potencial de oxidação-redução, presença de substâncias antimicrobianas, etc. Um desses mecanismos é conhecido como resposta ao estresse ou resposta adaptativa.

A resposta adaptativa confere aos microrganismos a habilidade de melhor resistir aos efeitos danosos do agente estressor quando são previamente expostos a ele em baixas concentrações. Nessa condição ocorrem mudanças fisiológicas temporárias que frequentemente resultam no aumento da tolerância àquele estresse (direta/homóloga) ou proteção cruzada (outro fator estressante - heteróloga).

A capacidade adaptativa às condições ambientais adversas das bactérias apresenta grande interesse tanto na área clínica quanto na segurança alimentar. Esse mecanismo é rapidamente ativado ao serem detectadas, pelas bactérias, pequenas alterações no ambiente (pH, temperatura, conservantes, sanificantes, etc.) desencadeando ajustes metabólicos, proteômicos e genômicos.

Devido à capacidade de *S. aureus* desenvolver adaptação direta e cruzada a vários fatores estressantes, e ao aumento da resistência da bactéria aos antibióticos disponíveis atualmente, novos agentes antimicrobianos têm sido propostos, dentre eles os óleos essenciais.

Os antimicrobianos de origem natural vêm ganhando força nos últimos anos, em destaque, os óleos essenciais e seus componentes majoritários que vêm sendo avaliados contra diversos microrganismos, com resultados promissores.

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, são misturas complexas de substâncias (fitocomplexo), e esta característica pode dificultar a adaptação do microrganismo, pois permite que o óleo aja de diferentes formas na célula bacteriana atingindo distintos sítios de ação. Com mecanismo de ação multialvos, supõe-se que as bactérias não consigam sobreviver a esses antimicrobianos, diferentemente aos antibióticos, possibilitando seu uso como alternativa a medicamentos utilizados atualmente. Da mesma forma, espera-se que as bactérias, mesmo submetidas a concentrações subletais desses antimicrobianos não consigam desenvolver adaptação direta ou cruzada, principalmente quando os óleos essenciais são utilizados como conservantes ou sanificantes na indústria de alimentos. A possibilidade de um antimicrobiano natural, seguro e eficaz é de grande interesse científico e industrial.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de *Staphylococcus aureus* - GL 4384 desenvolver adaptação direta aos óleos essenciais de canela, menta, lavanda e orégano, e adaptação cruzada entre óleo essencial e antibióticos e, pH e antibióticos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* pertencem à família Staphylococcaceae, apresentam-se em forma de cocos com cerca de 1 µm de diâmetro, em massas regulares, semelhantes a cachos de uva. São microrganismos gram-positivos, mesófilos, anaeróbios facultativos, produtores de coagulase e termonuclease. *S. aureus* é capaz de se desenvolver em ampla faixa de temperatura, variando de 7 °C a 48,5°C (com temperatura ótima de 37°C), pH entre 4 a 9,8 e não produzem esporos (BHUNIA, 2008). Considerando a atividade de água (Aw), os estafilococos são únicos, em sua capacidade de crescer em valores inferiores aos normalmente considerados mínimos para as bactérias não-halófilas, apresentando tolerância a concentrações entre 10% a 20% de cloreto de sódio, com valor mínimo de Aw de 0,83 (FERREIRA, 2003; PORTOCARRERO, 2002; TATINE, 1973).

O homem e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*. No homem a cavidade nasal é o principal nicho dos estafilococos, a partir do qual atinge tanto a epiderme quanto o ar, água e qualquer superfície ou objeto que entrar em contato com o homem (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Já nos animais, *S. aureus* é considerado o principal agente etiológico da mastite bovina (ROBERSON et al. apud BRITO; BRITO, 1997), fato que leva a constante contaminação de produtos de origem láctea. Apesar de fazer parte da microbiota humana, essa bactéria pode causar desde infecções simples, como espinhas, até doenças mais graves, como endocardite, meningite, septicemia entre outras (SANTOS et al., 2007)

*Staphylococcus aureus* possui vários fatores de virulência, como proteínas de adesão, enterotoxinas, superantígenos, hemolisinas formadoras de poros e proteases, que proporcionam a bactéria causar tanto infecções nos seres humanos e animais quanto toxinfecções alimentares, sendo essas associadas às enterotoxinas (BHUNIA, 2008).

Considerado um dos mais importantes agentes causais de toxiose alimentar no mundo, *S. aureus* sintetiza enterotoxinas denominadas de toxinas estafilocócicas (SE). Atualmente, 23 enterotoxinas foram identificadas, incluindo SEA, SEB, SEC, SED e SEE, sendo as mais comuns as SEA e SEB. Entretanto, a SEA é mais frequentemente envolvida em toxinoses alimentares causadas por estafilococos (WU et al., 2016).

As toxinoses estafilocócicas são provocadas pela ingestão do alimento contendo toxinas pré-formadas, que contém densidade populacional entre  $10^5$  a  $10^8$  UFC/g ou mL, ou acima (AKTAR et al., 1996; PARK et al., 1994).

As SEs são exotoxinas gastrointestinais que podem ser sintetizadas durante a fase logarítmica e, ou, na fase de desaceleração do crescimento. Apresentam elevada toxicidade, provocando os sintomas da toxinose em pequenas doses (nanogramas), são resistentes às condições que facilmente destroem as células vegetativas como o tratamento térmico e baixo pH e não são degradadas por enzimas proteolíticas, dessa forma, ao alcançarem o sistema digestório ainda estão ativas (BERGDOLL, 1990). Uma vez no sistema digestório, as SE estimulam o nervo vago que transmite um sinal ao centro do cérebro levando ao vômito. Além disso, as SEs são capazes de penetrar no revestimento intestinal e ativar respostas imunes locais e sistêmicas, liberando mediadores inflamatórios que também provocam a emese. Alterações inflamatórias também são observadas em várias regiões do trato gastrintestinal, com lesões mais severas no estômago e na parte superior do intestino delgado. A diarreia às vezes associada à toxinose pode ser devido à inibição da reabsorção de água e eletrólitos no intestino delgado (ARGUDÍN, MENDOZA, RODICIO, 2010).

Os principais sintomas, além da diarreia e emese são: câibras abdominais, febre e sudorese (BROOKS et al., 2000). O período de incubação pode variar, podendo ocorrer entre 30 minutos a 8 horas, sendo em média de 2 a 4 horas após a ingestão do alimento contaminado (BERGDOLL, 1990).

A importância de *S. aureus*, sob o ponto de vista da saúde pública, é corroborada por levantamentos epidemiológicos, relacionando-o também a infecções nosocomiais no mundo. Esse patógeno, além de causar infecções em órgãos e tecidos, estando envolvido na maioria dos casos de infecções hospitalares, também se destaca por ser uma das bactérias que mais rapidamente desenvolve multirresistência a antibióticos (SANTOS et al., 2007).

## **2.2 Fatores estressores**

Dada à importância do controle de microrganismos patogênicos tanto na indústria de alimentos quanto em ambientes hospitalares e higiene pessoal, a utilização de agentes antimicrobianos pelos seres humanos tem sido cada vez maior.

Na produção de alimentos, os antimicrobianos ganham destaque, com utilização desde o campo até a obtenção final dos produtos. São utilizados antibióticos no tratamento de patologias animais, agentes sanificantes no processo de higienização das indústrias e conservantes nos alimentos visando principalmente à segurança alimentar. Entretanto, essas substâncias são extensivamente utilizadas e por grande período de tempo. Além da utilização contínua dessas substâncias, o ambiente de processamento impõe aos microrganismos vários

outros estresses como temperatura, pH, pressão osmótica, potencial de oxidação-redução, dentre outros (CEBRIÁN, G. et al., 2010.). Essa pressão seletiva, imposta pelo ambiente de processamento e pelo próprio alimento, apresenta o revés de selecionar microrganismos que, ao sobreviverem aos fatores estressores, tornam-se um problema na segurança alimentar.

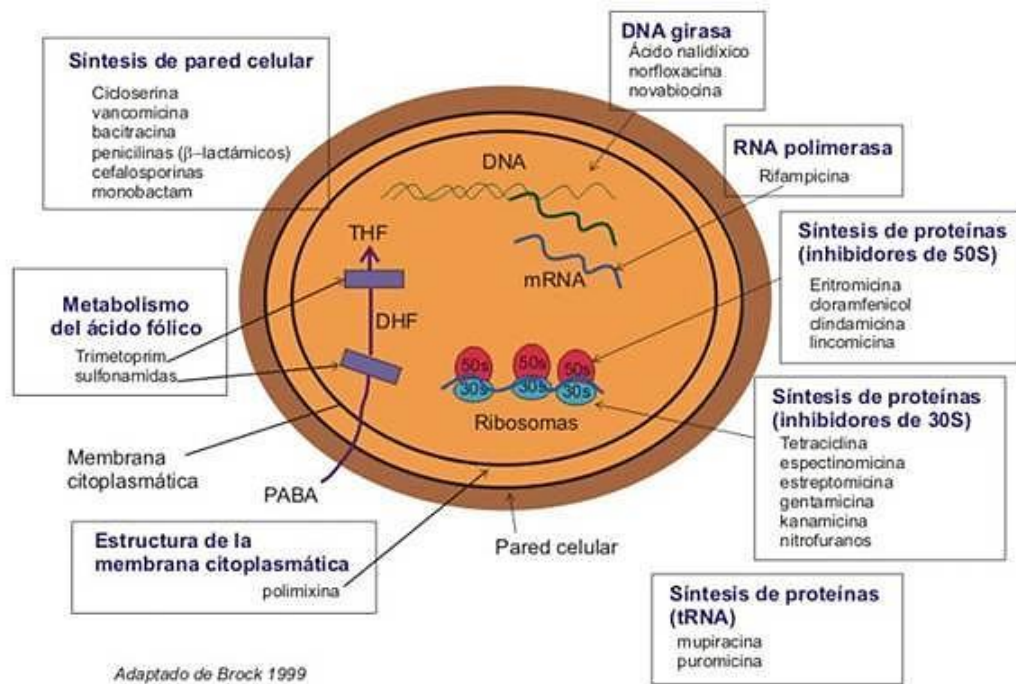
Várias são as intensidades dos fatores estressores aos quais as bactérias são expostas, sendo definidas como branda (estresse subletal que não resulta na perda da viabilidade celular), moderada (estresse que impede o crescimento causando danos celular) ou severa (letal) (YOUSEF; COURTNEY, 2003), sendo o nível do estressor extremamente importante, pois esse, juntamente com a capacidade da bactéria em se adaptar a ele irá “definir” sua permanência ou não na cadeia produtiva (WESCHE et al., 2009).

### **2.2.1 Antibióticos**

Dentre os vários fatores estressores, os antibióticos se destacam. Sua utilização se iniciou com a descoberta da penicilina, produzida por fungos do gênero *Penicillium*, por Alexander Fleming em 1928, fato que revolucionou a ciência e a medicina, pois uma das principais causas de mortalidade na época era por infecções bacterianas (FONTANA, 2006.).

Atualmente encontram-se disponíveis no mercado os antibióticos dos grupos das penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, carbapenema, macrolídeos, dentre outros, que atuam de diferentes formas sobre a célula bacteriana (Figura 1). Entretanto, seus mecanismos de ação são únicos, podendo atuar ou na síntese da parede celular, ou na de proteínas, ou inibindo a síntese de DNA, RNA ou ácido fólico.

Figura 1 – Mecanismos de ação dos antibióticos



Fonte: Adaptado de Brock, 1999

Os antibióticos são extremamente usados em todo o mundo salvando vidas e aumentando a produção de alimentos. Entretanto, seu uso contínuo, indiscriminado e de forma inadequada levaram ao rápido aparecimento de bactérias resistentes a uma ou a várias drogas. Dentre os microrganismos que rapidamente apresentaram cepas multirresistentes, *Staphylococcus aureus* se destaca. Essa bactéria foi uma das primeiras a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, mas, devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS et al., 2007).

### 2.2.1.1 Cefuroxima

A cefuroxima é um antimicrobiano  $\beta$ -lactâmicos que pertence à classe das cefalosporinas de segunda geração. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese da parede celular via inibição competitiva da enzima transpeptidase, responsável por realizar a transpeptização da parede celular, tornando-a fraca sendo conseguinte degradada (MADIGAN et al., 2008).



### 2. 2.1. 2 Cloranfenicol

O cloranfenicol foi por muitos anos o único fármaco eficaz no tratamento das salmoneloses, inclusive *Salmonella Typhi*. É ativo contra bactérias gram-negativas e gram-positivas e a grande parte dos microrganismos anaeróbios. Ele tem a capacidade de se ligar à subunidade 50S do ribossomo, inibindo a síntese proteica da bactéria, tendo, assim, ação bacteriostática. Entretanto, pode ter ação bactericida contra algumas espécies como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*, através de mecanismo ainda não bem elucidado. A resistência a esse antimicrobiano pode ser adquirida através de plasmídeos ou alterações de permeabilidade à droga. Frequentemente, a resistência é determinada pela produção de uma enzima, acetil-transferase ou nitrorredutase, que inativa o composto (ANVISA).

### 2. 2.1.3 Norfloxacino

O norfloxacino pertence à classe das fluoroquinolonas de segunda geração. Seu mecanismo de ação inibe a DNA topoisomerase, a DNA girase e outras enzimas bacterianas, impedindo a replicação e a transcrição do DNA (RANG HP et al., 2011).

É uma droga usada para tratar infecções no trato urinário, diarreia causada por infecções bacterianas, mas é pouco eficaz frente aos microrganismos anaeróbios. A resistência pode ocorrer, principalmente, por uma alteração na enzima DNA girase, que passa a não sofrer ação da droga (ANVISA).

### 2. 2.1.4 Novobiocina

A novobiocina, também conhecida como albamicina ou catomicina, foi relatada pela primeira vez em 1950, sendo licenciada para uso clínico dez anos mais tarde. É um antibiótico de aminocumarina produzido pelo actinomiceto *Streptomyces niveus*, que recentemente foi identificado como um sinónimo de *S. spheroides*, pertencente a ordem Actinobacteria. As aminocumarinas são inibidores da DNA girase, atuam como competidores da reação de ATPase catalisada por GyrB. A novobiocina possui uma eficácia maior que a fluoroquinilonas, que também atuam na DNA girase. Esse antibiótico é indicado para combater estafilococos, em especial, *Staphylococcus epidermidis*. (BURLISON. et al. 2006).

### **2. 2.1.5 Tetraciclina**

Antimicrobiano de amplo espectro de ação, incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativas aeróbias e anaeróbias, espiroquetas, riquetsias, micoplasma, clamídias e até alguns protozoários. Primariamente seu mecanismo de ação é bacteriostático, quando em concentrações terapêuticas. As tetraciclinas entram na célula por difusão, em um processo dependente de gasto de energia. Ligam-se, de maneira reversível, à porção 30S do ribossomo, bloqueando a ligação do RNA transportador, o que impede a síntese proteica. O principal mecanismo de resistência microbiana é por diminuição da acumulação da droga no interior da célula. A utilização veterinária desse antimicrobiano tem sido apontada como a principal responsável pela resistência microbiana a esta droga (ANVISA).

Microrganismos suscetíveis à tetraciclina são considerados sensíveis também a doxiciclina e minociclina. Porém, microrganismos que são intermediários ou resistentes à tetraciclina podem ser suscetíveis a doxiciclina ou minociclina, ou a ambas (NCCLS, 2018).

### **2.2.2 Fatores estressores: pH**

A acidez do meio, muitas vezes, evita a colonização microbiana indesejável. Dessa forma, a indústria alimentícia utiliza-se da acidificação dos alimentos para conservá-los, já que as bactérias patogênicas costumam se multiplicar melhor em valores de pH neutro, em torno de 7,0. Para isso são utilizados acidulantes como: ácido cítrico, láctico, acético e outros, a fim de evitar a deterioração do alimento ou atenuar os tratamentos térmicos (JAY, 2005)

Em alimentos pouco ácidos há uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias patogênicas, fungos filamentosos e levedura. Já em alimentos mais ácidos a microbiota é mais restrita, e é mais provável que haja bolores, leveduras e bactérias lácticas ou acéticas (HOFFMANN, 2001).

Porém alguns microrganismos possuem a capacidade de desenvolverem adaptação contra o estresse ácido quando expostos a concentrações subletais (POIMENIDOU et al., 2016).

### **2.3 Resposta ao estresse ou resposta adaptativa**

A resposta adaptativa, ou adaptação celular ocorre quando as células bacterianas são submetidas a condições de estresse subletal brandas a moderadas, com a adaptação transiente das células, sendo observadas mudanças fisiológicas que levam ao aumento de tolerância àquele estresse (adaptação homóloga) (WESCHE et al., 2009).

Outra capacidade das bactérias é o desenvolvimento da adaptação cruzada ou heteróloga, onde, ao serem submetidas ao estresse subletal de determinado estressor, as bactérias também apresentam maior tolerância a outro fator estressor. Esse fato é bem conhecido na indústria de alimentos onde os microrganismos desenvolvem a adaptação cruzada entre diferentes agentes sanificantes (CHAPMAN, 2003).

A resposta ao estresse, ou resposta adaptativa, é um fenômeno que tanto as bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas expressam e tem ajudado na sobrevivência de patógenos causadores de toxinfecções alimentares nos alimentos bem como nos ambientes de processamento. A adaptação microbiana, resposta ao estresse sofrido pelos microrganismos, a agentes antimicrobianos e desinfetantes tem sido relatada nos últimos anos (AGUIAR et al., 2015; SOUZA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017). A capacidade adaptativa dos microrganismos tem levado a preocupação não somente no ambiente hospitalar como também da indústria alimentícia.

Apesar dos diversos métodos desenvolvidos para reduzir a contaminação microbiana nos alimentos durante o processamento nas indústrias, as bactérias desenvolvem mecanismos de resposta às condições adversas de crescimento (YOON et al., 2015). O estresse utilizado de forma subletal induz o condicionamento do microrganismo ao fator estressor, tornando-o fisiologicamente mais tolerante a maiores níveis desse estresse ou desenvolvendo uma proteção cruzada a outros estressores (HWANG et al., 2014; SMIGIC et al., 2009).

### **2.3.1 Adaptação de *S. aureus* ao estresse**

*Staphylococcus aureus* tem como uma de suas principais características a capacidade de se adaptar e/ou adquirir resistência aos agentes antimicrobianos com uma certa rapidez. Isso se deve, além do uso indiscriminado, das prescrições nem sempre criteriosas e das falhas na continuidade dos tratamentos com antibióticos, a capacidade dessa bactéria em se adaptar a ambientes não tão favoráveis, com mudanças de temperatura, pH, disponibilidade de água e até nutrientes. Experimentos demonstraram que *S. aureus* pode sobreviver mais de 1 mês em plásticos, roupas e outros tecidos utilizados em hospitais e mais de 1 ano em embalagens descartáveis de luvas, gazes e outros. (NEELY; MALEY, 2000; DIETZE, B. et al., 2001)

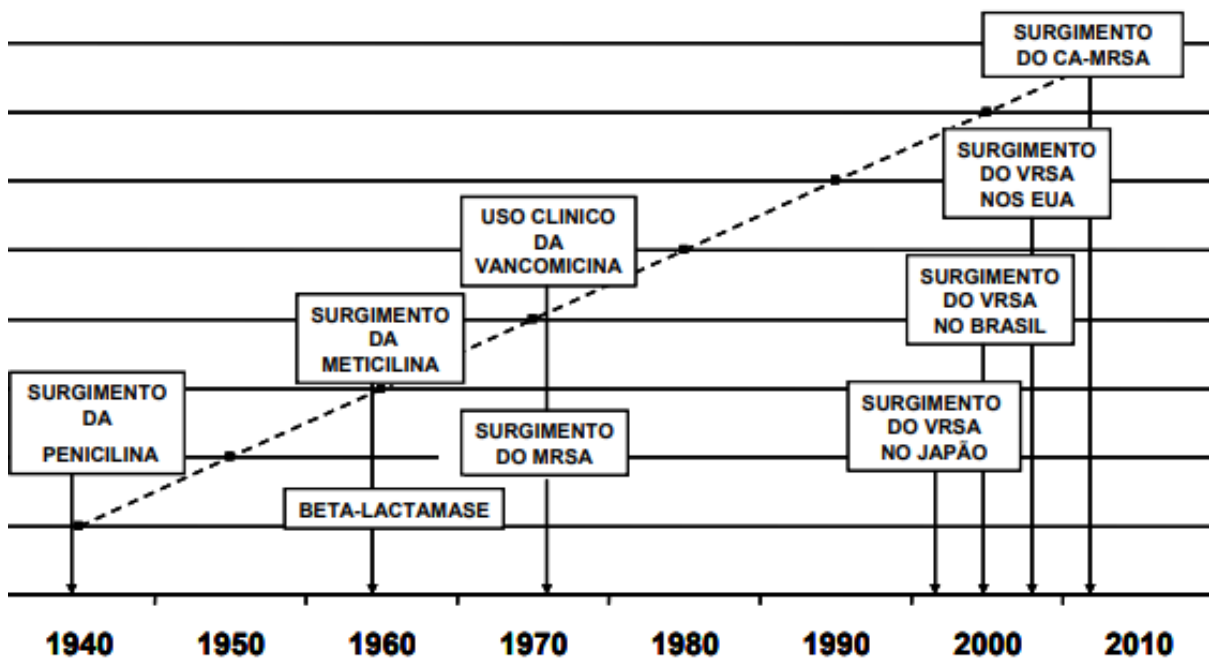
Quando, no início da década de 40, começou a utilização e comercialização da penicilina, todas as bactérias do gênero *Staphylococcus* eram susceptíveis a esse antibiótico, entretanto, alguns poucos anos mais tarde começaram a surgir cepas resistentes. Novos medicamentos foram lançados na época com o intuito de combater esses microrganismos,

como a eritromicina, tetraciclina e aminoglicosídeos, isso resultou, já na década de 50, o surgimento de bactérias multirresistentes (ITO et al., 2003).

Em 1960 foi lançada a meticilina, uma penicilina sintética, dessa vez parecia que o problema havia sido solucionado, já que este medicamento era eficiente contra as cepas multirresistentes. Mas apenas um ano depois, Jevons et al. (1961) isolou uma cepa resistente a nova droga. Rapidamente as cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) ocuparam os ambientes hospitalares e foi necessário o uso de outro medicamento para combater essas infecções, à vancomicina, eficiente no tratamento contra MRSA. Porém em 1997, no Japão, Hiramatsu et al., isolou a primeira cepa de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA). No Brasil, no município de Queimados - RJ, as primeiras cepas VRSA foram encontradas em 2000. Nos anos seguintes EUA, Reino Unido, Alemanha e França também relataram cepas resistentes (SANTOS et al., 2007).

A Figura 2 apresenta, no tempo, a rápida evolução na aquisição de resistência de cepas de *S. aureus* em todo o mundo.

Figura 2 - Surgimento de alguns antibióticos e cepas resistentes de *S. aureus* nos séculos XX e XXI



MRSA: resistente a meticilina; CA-MRSA: resistente a meticilina e oxacilina; VRSA: resistente à vancomicina

Fonte: Santos et al. (2007)

O estudo realizado por Karatzas et al. (2007) encontrou cepas de *S. aureus* barotolerantes através de um tratamento em que células bacterianas foram expostas a pressão hidrostática elevada (400 Mpa) durante 30 min. a maior parte dessas cepas apresentou uma termo tolerância maior e reduziu a resistência aos antibióticos, quando comparadas a cepa selvagem.

Cebrián et al. (2010) demonstrou a capacidade de *S. aureus* aumentar sua tolerância ácida após ter passado por um estresse ácido subletal (adaptação direta), mas também mostrou um aumento na resistência ao calor e ao peróxido de hidrogênio (adaptação cruzada). Este estudo também mostrou que *S. aureus* foi capaz de desenvolver respostas adaptativas após ser exposto a alcalinos, baixas concentrações de peróxido de hidrogênio e choque térmico, resultando adaptações diretas (homólogas).

Para contornar as mudanças ambientais, as bactérias costumam possuir diversos fatores sigma ( $\sigma$ ), que regulam a expressão de diferentes e específicos genes capazes de gerar uma resposta adaptativa. Entretanto, *S. aureus* parece possuir apenas dois fatores sigma:  $\sigma^A$  e  $\sigma^B$  (CLEMENTS; FOSTER., 1999). Em bactérias gram-positivas, as respostas ao estresse são coordenadas pelo fator sigma alternativo  $\sigma^B$  (WU et al., 1996.) Esse regulador demonstrara estar envolvidos na tolerância a valores de baixo pH, osmolaridade, temperatura, antibióticos, etanol e falta de nutrientes (KULLIK; GIACHINO, 1997; CHAN; FOSTER., 1998)

## 2.4 Óleos essenciais: antimicrobianos naturais

De acordo com a Organização Internacional de Normalização de Óleos essenciais (ISO 9235, 2013), óleo essencial é o produto obtido através de matéria prima vegetal, por destilação com vapor de água, destilação seca, hidrodestilação e processos mecânicos (expressão).

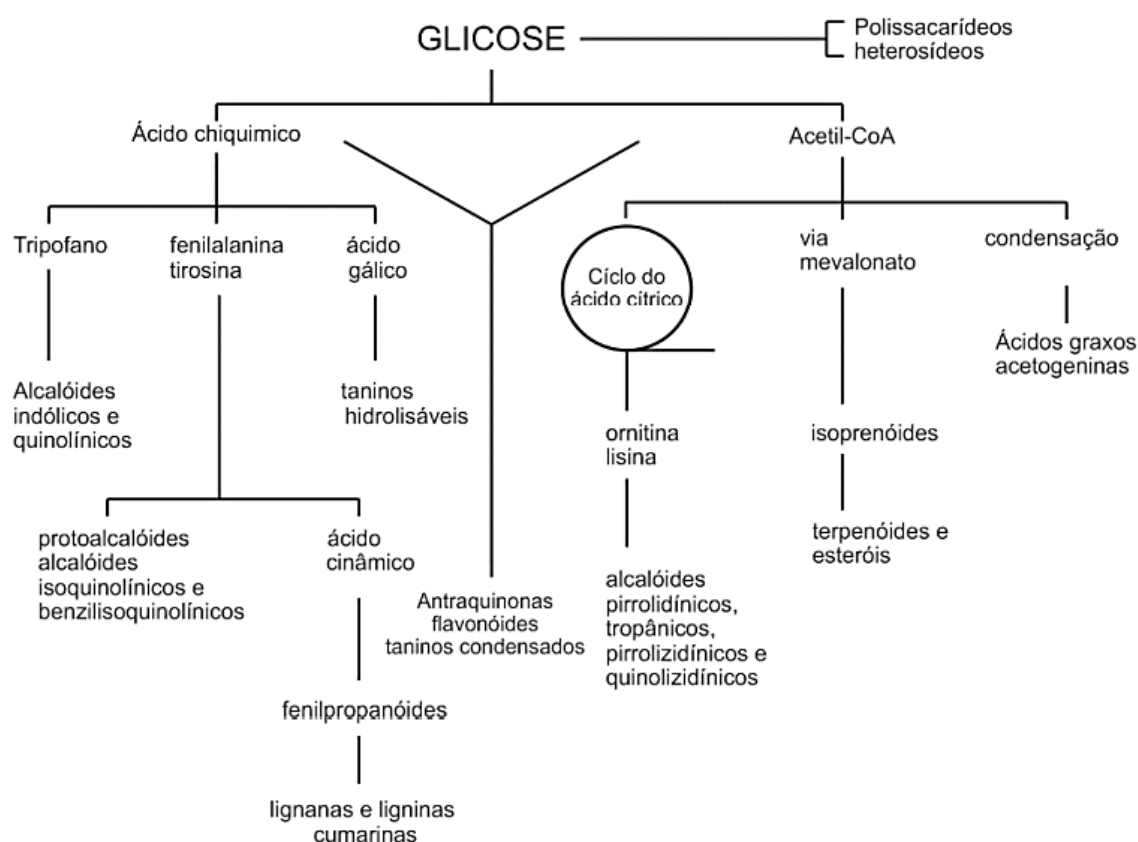
Nos vegetais, o metabolismo pode ser dividido em primário e secundário (SIMÕES et al., 2007). O metabolismo primário é responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais das plantas. Já o metabolismo secundário produz uma variedade de compostos orgânicos, que apresentam diversas atividades biológicas e possuem potencial para serem utilizados na produção de fármacos, cosméticos, inseticidas, fungicidas e bactericidas (PEREIRA et al., 2008).

Os óleos essenciais são produtos de vias metabólicas secundárias das plantas (Figura 3) e podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, encontrados em tecidos vivos de plantas, que podem estar concentrados nas flores, folhas, cascas, rizomas e sementes de diferentes plantas (ARAÚJO, 1995). A

intensidade e a composição variam de acordo com fatores ambientais e o estágio de desenvolvimento da planta (OUSSALAH et al., 2007).

Os óleos essenciais são associados as funções de sobrevivência do vegetal, incluindo a proteção contra herbivoria e microrganismos (Siqui et al., 2000). Eles possuem uma composição química diversa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (Gonçalves et al., 2003; Silva et al., 2003).

Figura 3 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: Santos (2000)

Os óleos essenciais são compostos por mistura de componentes em diferentes concentrações, porém, geralmente um, dois ou três deles são encontrados em proporções maiores, os componentes majoritários.

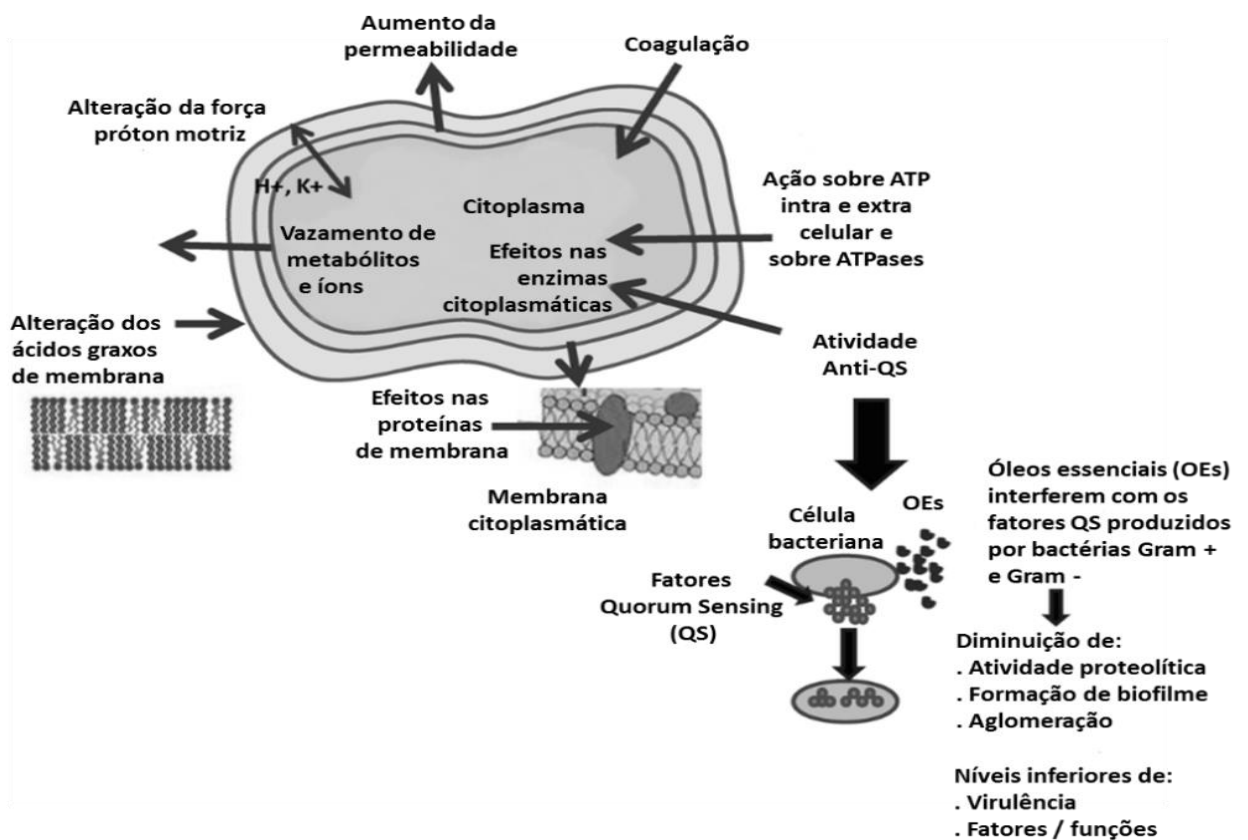
Tem-se o conhecimento de cerca de 3.000 óleos essenciais, destes, 300 são importantes nas indústrias de alimentos, agrônômica, farmacêuticas saneamento, perfumes e cosméticos (BAKKALI et al.,2008), sendo bem conhecida sua capacidade de estender a vida útil de

alimentos processados por inibição do crescimento de bactérias de origem alimentar (KIM et al., 1995; SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998).

Dentre as várias utilidades dos óleos essenciais, a ação antimicrobiana tem sido uma das mais estudadas. Em decorrência aos problemas de resistência microbiológica a antibióticos e desinfetantes tradicionais (ANDRADE et al., 2012). Seu modo de ação nos diferentes microrganismos está associado aos seus compostos. Bakkali et al. (2008) afirmam que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída principalmente aos seus compostos majoritários.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais não pode ser atribuída a um único mecanismo de ação devido à grande variedade de substâncias (BURT, 2004). Como pode ser observado na Figura 4, estes mecanismos incluem modificações químicas na membrana celular, citoplasma, enzimas e proteínas.

Figura 4 - Sítios de ação dos óleos essenciais sobre células bacterianas.



Fonte: Adaptado de Nazzaro et al. (2013).

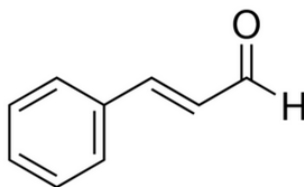
### 2.4.1 *Cinnamomum cassia* (canela cássia)

Pertencente à família das Lauráceas, as duas espécies mais utilizadas são a *Cinnamomum Zeylanicum* Nees (pau de canela) mais usada no Ocidente e a *Cinnamomum Cassia* (canela da china ou canela cássia) mais utilizada no Oriente. Ambas apresentam características terapêuticas bastante similares (Cunha et al, 2006), usando-se de ambas as folhas, os rebentos, a casca e o óleo essencial.

Segundo Cunha et al. (2006) a composição química das canelas inclui substâncias como o Aldeído Cinâmico ou Cinamaldeído (Figura 5), responsável pelo aroma e sabor intensos e pelas propriedades antifúngicas, o Cineol, que tem propriedades antiespasmódicas, secretolíticas e antifúngicas (Schuls et al, 2002) e o Cariofileno que possui grande potencial anti-inflamatório e forte ação antisséptica (Cunha et al, 2004)

O estudo realizado por SOUZA (2015) demonstrou que os óleos essenciais de *C. cassia*, *C. camphora*, *Litsea cubeba* apresentaram atividade antimicrobiana sobre biofilmes de *S. aureus* ATCC 5674 e *S. aureus* GL8702, e a combinação desses óleos apresentaram resultados promissores para serem utilizados como sanificantes e ou conservantes nas indústrias de alimentos.

Figura 5 – Estrutura química do Cinamaldeído

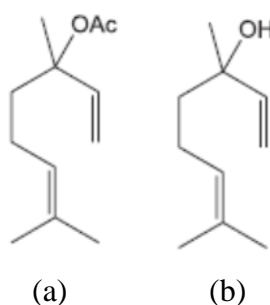


### 2.4.2 *Lavandula angustifolia* (Lavanda)

A espécie *Lavandula angustifolia* faz parte da família Lamiaceae, conhecida popularmente por lavanda ou alfazema. É nativa do continente europeu e uma das plantas mais utilizadas na produção de perfumes e cosméticos, por suas propriedades cicatrizantes e antissépticas. Seu óleo essencial, composto majoritariamente por linalol e acetato de linalila (Figura 6), já é reconhecido a muito tempo na aromaterapia, para tratamentos de ansiedade, insônia, estresse, sedativo (SUGAWARA et al., 1998), anticonvulsivo (ELISABETSKY; BRUM; SOUZA, 1999) e antinociceptivo (VENÂNCIO, 2006), é um dos óleos mais distribuídos no mundo. Há também estudos quanto sua atividade antimicrobiana, esta mais associada ao composto linalol.



Figura 6 – Estrutura química do Acetato de linalila (a) e linalol (b)



### 2.4.3 *Mentha piperita* (Menta)

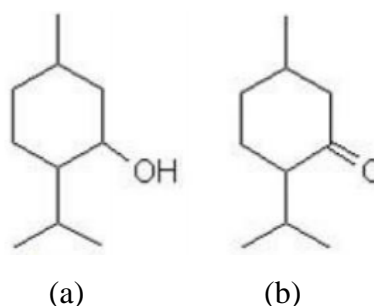
*Mentha piperita* faz parte da família Lamiaceae, popularmente é conhecida como menta ou hortelã-pimenta, possui com ação medicinal já relatada e é reconhecida, principalmente, pelo sabor característico e aroma refrescante (HABER et al., 2005).

O óleo essencial de *M. piperita* produz substâncias como mentol, mentona e mentofurano (Figura 7), compostos de grande importância na indústria cosmética e farmacêutica, por possuir uma elevada atividade antibacteriana (IMAI et al., 2001). Alves et al. (2011) mostraram a atividade antibacteriana do óleo sobre *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *S. salivarius* (ATCC 7073) e *S. mitis* (ATCC 903) com Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 0,625; 0,312 e 1,25 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

No estudo de RASOOLI et al. (2008), *M. piperita* apresentou atividade inibitória frente ao biofilme formado por *S. mutans*, sendo essa atividade superior ao anti-séptico químico clorexidina, tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, apresentou Concentração Bactericida Mínima (6000 ppm) inferior à clorexidina (8000 ppm), sobre o mesmo microrganismo.

Outro estudo realizado por TRAJANO et al., (2009) demonstrou que o óleo essencial de menta foi eficaz na inibição de crescimento de *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *S. aureus* (ATCC 6538), *Salmonella enterica* (ATCC 6017) e *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610).

Figura 7 - Estrutura química do Mentol (a) e Mentona (b)



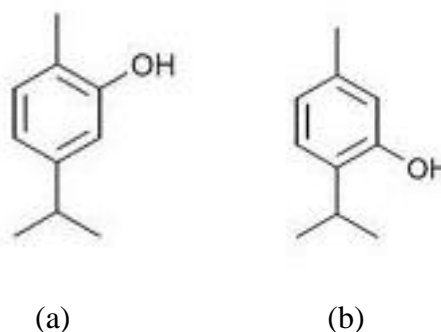
#### 2.4.4 *Origanum vulgare* (Orégano)

A espécie *Origanum vulgare* é uma planta aromática e condimentar pertencente à família Lamiaceae e dentre seus nomes populares estão orégano, manjerona-silvestre ou manjerona-rasteira. É uma planta herbácea, rasteira ou decumbente (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997). É originária da Europa e Ásia, sendo utilizada há muitos anos na culinária mundial. O óleo essencial tem apresentado resultados significativos na inibição do crescimento de bactérias, fungos e síntese de metabólitos microbianos (BAYDAR et al., 2004; NOSTRO et al., 2004).

O carvacrol e o timol (Figura 8) são os principais compostos presentes no óleo essencial de orégano e representam cerca de 70 a 80% da composição do mesmo (ADAM et al., 1998). Para algumas cepas de microrganismo que já adquiriram resistência aos desinfetantes químicos, o óleo essencial de orégano tem sido utilizado para controlar microrganismo em produtos alimentícios (GOULD, 1996)

Um estudo realizado por Mendonça (2004) demonstrou que a ação do orégano sobre cepas de *S. aureus* foi menor que a do cravo-da-índia, que age mais fortemente na inibição do crescimento microbiano em menores concentrações. Esse resultado também já foi descrito por ZAIKA (1988). Quando comparado ao óleo essencial de pimenta do reino, o óleo de orégano foi mais eficaz em inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* (0,5%) enquanto o óleo de pimenta do reino só afetou o crescimento dessa bactéria a partir da concentração de 1% (ALARCÓN, 2007).

Figura 8 - Estrutura química do Carvacrol (a) e Timol (b)



### 2.5 Relação entre óleos essenciais e a resposta adaptativa

Os antimicrobianos naturais têm se mostrado uma alternativa promissora aos antibióticos convencionais, entretanto, em alguns casos, quando utilizadas concentrações subletais destes compostos, os microrganismos podem desenvolver uma adaptação cruzada. Estudos demonstram que pode ocorrer uma adaptação a estes produtos ou até uma adaptação cruzada entre outros agentes microbianos (BIKELS- GOSHEN, LANDAU, SAGUY E SHAPIRA, 2010; FONG & WANG, 2016).

Os microrganismos são capazes de aumentar a expressão de proteínas de resposta ao estresse, reparando as proteínas danificadas quando submetidos a concentrações subletais de óleos essenciais ou outros compostos antimicrobianos. Contudo, quando a concentração de agentes antimicrobianos naturais é mais elevada, esta resposta é incapaz de prevenir a morte celular (BURT et al., 2007; LAMBERT et al., 2001).

Um estudo realizado por Zago et al. (2009) demonstrou uma interação positiva entre alguns antibióticos e óleos essenciais, linhagens de *Staphylococcus aureus* tiveram sua sensibilidade melhorada quando expostas as drogas gentamicina, cefalotina e cefepime em conjunto com os óleos essenciais de capim cidreira (*Cymbopogon citratus* (DC.)) e hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.). Kalily et al (2017) evidenciou que a exposição de uma cepa de *Salmonella enterica* a seriadas concentrações subletais de linalol foi suficiente para aumentar a resiliência do microrganismo não só ao linalol como também conferiu adaptação cruzada ao óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e a alguns antibióticos (trimetoprim, sulfametoxazol, piperacilina, cloranfenicol e tetraciclina).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de condução do experimento

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

#### 3.2 Óleos Essenciais

Foram utilizados os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* (canela), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Mentha piperita* (menta) e *Origanum vulgare* (orégano) adquiridos da empresa FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande, São Paulo, Brasil), cujos componentes majoritários, de acordo com o fabricante, são descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Composição e teor dos principais componentes dos óleos essenciais.

Espécie	Nome comum	Principais Componentes	Teor (%)
<i>Cinnamomum cassia</i>	Canela	Aldeído cinâmico	81,0
		Cumarina	3,0
		Benzaldeído	3,0
		Álcool cinâmico	3,0
		Estireno	3,0
<i>Lavandula angustifolia</i>	Lavanda	Linalol	34,0
		Acetato de linalila	38,0
<i>Mentha piperita</i>	Menta	l-mentol	32,0
		Mentona	28,0
		Acetato de mentila	5,0
		Eucaliptol	5,0
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Carvacrol	70,0

### 3.3 Microrganismo, padronização e manutenção da cultura

Foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* GL 4384, obtida na Coleção de Cultura da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, Minas Gerais.

A cultura estoque foi mantida em meio de congelamento (glicerol - 15 mL; peptona bacteriológica - 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL) em freezer durante o desenvolvimento do trabalho.

O inóculo foi padronizado em  $10^8$  UFC/mL, por meio da elaboração da curva de crescimento, transferindo-se alíquotas de 1 mL da cultura estoque para tubos contendo 5 mL de caldo triptona de soja (TSB) e incubação a  $37^\circ\text{C}/24$  h; o desenvolvimento do microrganismo foi acompanhado pela leitura da absorvância (D.O. 600nm) e contagem de células viáveis por plaqueamento em ágar triptona de soja (TSA) após 24h de incubação a  $37^\circ\text{C}$ .

### 3.4 Avaliação da sensibilidade de *Staphylococcus aureus* – GL 4384 aos antibióticos

Foi utilizada a técnica de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão, CLSI M100-S21 (NCLS, 2011) com modificações. Os antibióticos utilizados foram cefuroxina (30mcg); cloranfenicol (30mcg), norfloxacin (10mcg), novobiocina (30mcg), tetraciclina (30mcg). Em placas de Petri contendo TSA foram inoculadas alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de suspensão padronizada a  $10^8$  UFC/mL da cepa. Após inoculação, os discos de antibióticos foram depositados sobre a superfície do ágar e as placas incubadas a  $37^\circ\text{C}/24$ h. Após esse período os halos de inibição foram mensurados com paquímetro digital.

*Staphylococcus aureus* foi classificado quanto a sua sensibilidade aos antibióticos como resistente, intermediário ou sensível, de acordo com o tamanho do halo formado. Para tanto foram utilizados os valores de referência definidos pelo CLSI, suplemento M100-S21 (2011), expostos na tabela 2.

Tabela 2 – Sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antibióticos e média dos halos (mm).

<b>Antibiótico</b>	<b>Sensível</b>	<b>Intermediário</b>	<b>Resistente</b>
<b>Cefuroxima (30mcg)</b>	18 ou mais	15-17	14 ou menos
<b>Cloranfenicol (30mcg)</b>	18 ou mais	13-17	12 ou menos
<b>Norfloxacin (10mcg)</b>	17 ou mais	13-16	12 ou menos
<b>Novobiocina (30mcg)</b>	22 ou mais	18-21	17 ou menos
<b>Tetraciclina (30mcg)</b>	19 ou mais	15-18	14 ou menos

### **3.5 Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais sobre *Staphylococcus aureus***

A concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais foi determinada utilizando a técnica de microdiluição em placas de poliestireno de 96 cavidades de acordo com o CLSI - M07 (CLSI, 2018), com modificações. Os óleos essenciais foram diluídos em TSB acrescido de 0,5% (v/v) de Tween 80. Foram avaliadas as concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,03 e 0,015 % (v/v). Alíquotas de 100 µL de meio contendo os óleos foram adicionadas em cada uma das cavidades da microplaca e inoculadas de 10 µL de cultura padronizada, as microplacas foram incubadas a 37°C/24 horas. Após esse período, foi realizado o plaqueamento das culturas em TSA e incubadas a 37°C/24h. O controle foi realizado em TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e 10 µL de inóculo padronizado. As CMB dos óleos essenciais foram as menores concentrações de óleos essenciais na qual não foi observado crescimento em placas após a incubação. O experimento foi realizado em triplicata e três repetições.

### **3.6 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório**

A influência do pH no crescimento de *Staphylococcus aureus* – GL 4384 foi avaliada em microplaca de poliestireno de 96 cavidades. Alíquotas de 100 µL das soluções de TSB, com pH ajustado previamente com ácido láctico (96%) foram adicionadas as cavidades acrescidas de 10 µL da cultura padronizada. Foram avaliados os pH de 6,0; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5 e 2,0. A microplaca foi incubada a 37°C/24 horas. Após esse período, foi realizado o plaqueamento em microgota em placas de TSA e incubadas a 37°C/24h. O pH mínimo inibitório foi definido como o menor valor capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, e o pH mínimo de crescimento, aquele imediatamente acima ao pH mínimo inibitório

### **3.7 Adaptação de *Staphylococcus aureus* aos óleos essenciais**

Células de *Staphylococcus aureus* – GL 4384 foram expostas a doses subletais dos óleos essenciais de canela, lavanda, menta e orégano. Foram utilizadas as concentrações equivalentes a CMB/4, CMB/8 e CMB/16 (SANTOS et al., 2018), com adaptações. Em frascos contendo 36 mL de TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 foi adicionado o óleo essencial na concentração subletal adequada. Após homogeneização, alíquotas de 4 mL de inóculo padronizado foram adicionadas ao meio e os frascos incubados a 37°C/ 6h e 24h. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 21.380 x g/10 min As células adaptadas foram lavadas três vezes com solução

salina (0,85%, m/v), ressuspendidas em TSB e padronizadas em cerca de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> para posterior utilização.

### **3.8 Avaliação da adaptação de *Staphylococcus aureus* aos óleos essenciais**

As células adaptadas e padronizadas foram expostas a diferentes concentrações do mesmo óleo essencial utilizado para sua adaptação nas concentrações de 1/2 CMB; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2CMB. Os óleos essenciais foram diluídos em TSB adicionado de Tween 80 (0,5%, v/v). Alíquotas de 100 µL das soluções antimicrobianas foram adicionadas nas cavidades das microplacas e 10 µL da cultura padronizada foram inoculados. As microplacas foram incubadas a 37°C/24h. Após esse período, alíquotas de 10 µL de cada cultura foram plaqueadas em TSA e incubadas a 37°C/24h.

A bactéria foi classificada como capaz de se adaptar quando foi observado o crescimento em placas após seu cultivo em presença dos óleos em concentrações iguais ou superiores a CMB.

### **3.9 Avaliação da capacidade de adaptação cruzada de *Staphylococcus aureus***

#### **3.9.1 Avaliação da adaptação cruzada de *Staphylococcus aureus* entre óleos essenciais e antibióticos**

Células de *Staphylococcus aureus* - GL 4384 adaptadas a concentrações subletais dos óleos essenciais de canela cássia, menta e orégano, por 6 e 24h, foram submetidas a um novo teste de sensibilidade a antibióticos. Foram utilizados os antibióticos cefuroxina (30mcg); cloranfenicol (30mcg), norfloxacin (10mcg), novobiocina (30mcg), tetraciclina (30mcg). Foi utilizada a técnica de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão (NCLS, 2018) com modificações. Em placas de Petri contendo TSA foram inoculadas alíquotas de 100 µL de suspensão padronizada da cultura previamente adaptada. Após inoculação, os discos de antibióticos foram depositados sobre a superfície do ágar e as placas foram incubadas a 37°C/24h. Após esse período os halos de inibição foram mensurados com auxílio de paquímetro digital. Um controle foi realizado, no qual as células foram pré-cultivadas em TSB adicionado de 0,5% de Tween 80, sem adição de óleos essenciais. A cepa que anteriormente foi classificada como sensível ou intermediária aos antibióticos e passou a ser resistente, ou então, classificada como sensível e passou a intermediária foi considerada como capaz de desenvolver adaptação cruzada.

### **3.9.2 Avaliação da adaptação cruzada de *Staphylococcus aureus* entre pH e antibióticos**

A adaptação das células de *Staphylococcus aureus* – GL 4384 ao pH foi realizada em meio com pH mínimo de crescimento. Em tubos tipo Falcon contendo 18 mL de TSB com pH 5,0, ajustado com ácido láctico (85%, P.A.), foram inoculados 2 mL de inóculo padronizado e incubados a 37°C/6h e 24h. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 21.380 x g/10 min. As células adaptadas foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%, m/v), ressuspensas em TSB e padronizadas em cerca de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida a cultura foi submetida ao teste de sensibilidade aos antibióticos: cefuroxina (30mcg); cloranfenicol (30mcg), norfloxacin (10mcg), novobiocina (30mcg), tetraciclina (30mcg). Foi utilizada a técnica de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão (CLSI, 2018) com modificações. Em placas de Petri contendo TSA foram inoculadas alíquotas de 100 µL de suspensão padronizada das células adaptadas. Após inoculação os discos de antibióticos foram depositados sobre a superfície do ágar e as placas incubadas a 37°C/24h. Após esse período, os halos de inibição foram mensurados com auxílio de paquímetro digital. Um controle foi realizado, no qual as células foram pré-cultivadas em TSB, sem alteração do pH. Os resultados foram comparados com os valores encontrados no teste de sensibilidade das células não adaptadas.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antibióticos

A tabela 3 apresenta os resultados do perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antibióticos cefuroxima, cloranfenicol, norfloxacina, novobiocina e tetraciclina, bem como os valores do halo de inibição (mm).

A cepa foi sensível a três antibióticos utilizados no experimento, cloranfenicol, norfloxacina e tetraciclina. Enquanto pra cefuroxima e novobiocina foi resistente e intermediário, respectivamente.

A resistência bacteriana aos antibióticos tem sido atribuída a alguns mecanismos herdados e não herdados geneticamente (LEVIN; ROZEN, 2006). Por apresentar boa capacidade de adaptação e resistência aos antimicrobianos, *Staphylococcus aureus* tornou-se uma das espécies de maior importância hospitalar. Mostrando-se resistente a diversas classes de antibióticos ao longo dos anos (SANTOS et al., 2007).

Tabela 3 - Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* GL 4384 a antibióticos de diferentes classes.

Antibiótico	Conc. (µg)	Halo de inibição (mm)	Classificação
Cefuroxima	30	12,76 ± 3,25	Resistente
Cloranfenicol	30	21,84 ± 1,62	Sensível
Norfloxacina	10	19,39 ± 2,27	Sensível
Novobiocina	30	21,48 ± 1,69	Intermediário
Tetraciclina	30	25,56 ± 1,22	Sensível

### 4.2 Concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais para *Staphylococcus aureus*

As CMB dos óleos essenciais de canela, orégano, menta e lavanda sobre *Staphylococcus aureus* – GL 4384 foram de 0,062; 0,25; 1,0 e 2,0 % (v/v), respectivamente. Estes resultados se assemelham aos encontrados na literatura para outras cepas de *S. aureus*.

Beraldo et al. (2013) determinaram a concentração mínima inibitória (CMI) de 0,04% utilizando o óleo de *Cinnamomum cassia* aplicado a uma cepa de *S. aureus* (ATCC 14458), o composto majoritário do óleo também era o cinamaldeído (67,58%). Neste estudo, o óleo essencial de canela foi mais eficiente na inibição microbiana que o hipoclorito de sódio, um sanitizante comumente usada na indústria, que teve uma CMI > 0,2%.

Testes de realizados por Huang et al. (2014), utilizando óleo de *C. cassia*, com concentração de 68,52% de cinamaldeído, apontaram para *S. aureus* uma CMI e CMB de 2,5 e 5 mg/mL (equivalente a 0,25 e 0,5%), respectivamente. Eles também identificaram um aumento da permeabilidade da membrana após a exposição ao óleo, resultando no extravasamento do conteúdo intracelular.

O estudo realizado por Souza (2015) avaliou a reação de duas cepas de *S. aureus* aos óleos essenciais de *C. cassia* e orégano, e constatou que elas responderam de maneira diferente. A cepa GL 5674 apresentou para o óleo de canela cássia uma CMB de 0,3125% e a cepa ATCC 8702 a CMB foi 2,5%. Enquanto para o óleo de orégano as cepas apresentaram CMB de 5% e 2,5%, respectivamente.

Zago et al. (2009) testou como antimicrobiano o óleo essencial de menta em *S. aureus* e *E. coli*, as CMI encontradas foram de 0,280% e 1,240%, respectivamente.

As diferenças nas concentrações mínimas bactericidas encontradas para cada óleo essencial neste estudo, deve-se as diferentes composições desses óleos, bem como seus compostos majoritários. Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura complexa de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

A característica lipofílica dos óleos essenciais permite a interação com os lipídeos da membrana celular do microrganismo, afetando sua permeabilidade e acarretando alterações na estrutura celular (BAKKALI et al., 2008; COSTA et al., 2011).

A ação bactericida pode ter sido ocasionada por inúmeros mecanismos de ação. Já que os óleos essenciais atuam de diversas maneiras na célula bacteriana, incluindo a destruição da parede celular e da membrana plasmática, a destruição das proteínas de membrana, perturbações no fluxo de elétrons e no transporte ativo, além da coagulação do conteúdo celular (BURT, 2004; CARSON; MEE; RILEY, 2002).

#### **4.2 pH mínimo inibitório e mínimo de crescimento de *Staphylococcus aureus***

O pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório foram, 5,0 e 4,5, respectivamente, para a cepa de *Staphylococcus aureus* - GL 4384. Estes resultados corroboram com os dados encontrados na literatura para *Staphylococcus aureus* (BHUNIA, 2008).

Geralmente, para o crescimento e sobrevivência, as células bacterianas requerem valores de pH entre 4 e 8, mas costumam se multiplicar melhor em pH neutro (WHEELER; HURDMAN; PITT, 1991).

A indústria alimentícia utiliza de ácidos orgânicos como forma de controlar microrganismos indesejáveis. O ácido lático é um deles, capaz de promover a redução do pH

intracelular por produzir íons de hidrogênio. Diferentemente dos ácidos fortes, os ácidos orgânicos não se dissociam por completo, por essa razão apresentam maior inibição, quando comparados com a dos ácidos fortes, que agem somente no exterior da célula (ITA; HUTKINS, 1991).

### 4.3 Adaptação de *Staphylococcus aureus* aos óleos essenciais

Embora as análises iniciais tenham incluído o óleo essencial de lavanda, não foi possível a recuperação das células após cultivo em presença das as concentrações subletais do óleo. O mesmo fato ocorreu com os óleos essenciais de menta e orégano nas concentrações de estresse subletal de CMB/4 e CMB/8, em ambos os tempos de cultivo (6 e 24h). Estes resultados indicam que não houve adaptação direta para o óleo de lavanda e para os óleos de menta e orégano nas concentrações subletais de CMB/4 e CMB/8.

Dessa forma, os experimentos foram conduzidos com os óleos essenciais de canela nas concentrações de 1/4; 1/8 e 1/16 CMB e os óleos de menta e orégano na concentração de 1/16 CMB.

A exposição de microrganismos a concentrações subletais de agentes antimicrobianos pode resultar no aumento da tolerância aos mesmos, ou a outros agentes, caracterizando a tolerância cruzada (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2008). Neste estudo, a exposição das células bacterianas a concentrações subletais dos óleos essenciais, em alguns casos, fez com que essas se tornassem mais tolerantes quando expostas posteriormente ao mesmo óleo em maior concentração. A tabela 4 apresenta os resultados da capacidade de adaptação de *Staphylococcus aureus* aos óleos essenciais de canela, menta e orégano.

Tabela 4 – Capacidade da adaptação de *Staphylococcus aureus* aos óleos essenciais de canela, menta e orégano após pré-exposição por 6 e 24h a concentrações subletais dos óleos essenciais.

Óleos Essenciais	CMB (%)	Estresse subletal (CMB/n)	Conc. (%)	Conc. letal (%)	
				6h	24h
Canela	0,062	1/4	0,0155	0,0744*	0,062
Canela	0,062	1/8	0,0076	0,0744*	0,062
Canela	0,062	1/16	0,0039	0,062	0,062
Menta	1	1/16	0,0625	<0,5**	1,4*
Orégano	0,25	1/16	0,0156	<0,125**	0,125**

\* valor MAIOR do que a CMB inicial; \*\* valor MENOR do que a CMB inicial

Houve a adaptação ao óleo de canela após a exposição as concentrações subletais de 1/4 e 1/8 de sua CMB por 6h, com o aumento da CMB de 0,062% para 0,0744%, entretanto não foi observada resposta adaptativa para os outros tratamentos com esse óleo.

As células expostas ao óleo de menta na concentração de 1/16 CMB, responderam de forma diferente ao estresse para cada tempo de adaptação, primeiro com aumento da sensibilidade das células ao óleo essencial após a exposição a sua concentração subletal no período de 6h, a CMB que anteriormente era 1% passou para <0,5%. E houve a adaptação ao óleo de menta após 24h, onde a CMB passou de 1% para 1,4%. Já para o óleo essencial de orégano, as células não desenvolveram adaptação, tornando-se mais sensíveis aos óleos, a CMB caiu de 0,25% para <0,125%.

Devido a ampla variedade na composição química dos óleos essenciais, acredita-se que a ação antimicrobiana destes compostos esteja relacionada a mais de um mecanismo e em diferentes sítios na célula microbiana (SESSOU; FAROUGOU; SOHOUNHLOUÉ, 2012). Esse fato pode ter dificultado a adaptação da cepa de *Staphylococcus aureus* as concentrações subletais dos óleos essenciais, já que para a maioria dos testes realizados, como pode-se observar na tabela 4, não ocorreu adaptação das células.

Estudos já demonstram que alguns sanificantes, utilizados também pela indústria de alimentos, podem contribuir para o surgimento de microrganismos resistentes por causar uma pressão seletiva na população após exposição contínua ao produto (LANGSRUD et al., 2003).

Entre as respostas adaptativas dos microrganismos ao estresse então alterações tanto na estrutura quanto na fisiologia da célula. Alguns aspectos destas respostas são os mecanismos de detecção, a caracterização de sistemas defensivos celulares, como a ação de proteínas reguladoras (por exemplo, RpoS), a indução dos sistemas homeostáticos e de reparação, a síntese de proteínas de resposta, especialmente da composição de ácidos graxos e propriedades físicas da membrana (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015).

Assim como nesse estudo, Luz et al. (2013) observando a tolerância de *S. aureus* ao óleo essencial de orégano e ao carvacrol, verificaram que o microrganismo não foi capaz de se adaptar a concentrações subletais desses antimicrobianos.

## **4.5 Resultados da adaptação cruzada de *Staphylococcus aureus***

### **4.5.1 Adaptação cruzada de *Staphylococcus aureus* entre óleos essenciais e antibióticos**

*Staphylococcus aureus* apresentou adaptação cruzada entre óleos essenciais e antibióticos em alguns dos tratamentos realizados neste estudo, tendo sua classificação de sensibilidade aos antibióticos alterada, exceto para a cefuroxima, na qual não houve alteração quanto à sensibilidade da bactéria, permaneceu resistente a todos os testes a qual foi submetida. Os resultados quando a adaptação cruzada entre os óleos essenciais (canela, menta e orégano) e antibióticos estão apresentados na tabela 5.

O estresse subletal causado pelo óleo essencial de canela na concentração de 1/4 CMB foi o que mais promoveu adaptação cruzada, sendo observado diminuição da sensibilidade de *S. aureus* em maior número de antibióticos no total. O estresse subletal (1/4 CMB) do óleo de canela, em ambos os tempos de adaptação (6 e 24h), levou a adaptação cruzada de *S. aureus* para o cloranfenicol e norfloxacina, tendo sua sensibilidade alterada de sensível para intermediária. Para a tetraciclina, após 6h de adaptação, *S. aureus* não mostrou alteração quanto a sua sensibilidade ao antibiótico, porém após 24h, as células passaram de sensível para intermediária. O comportamento da bactéria em relação a novobiocina e, foi dependente do tempo de adaptação, se tornando mais sensível ao fármaco após 6h de adaptação, passou da categoria intermediária para sensível e sem alteração da sensibilidade ao antibiótico após 24h de adaptação. O estresse subletal do óleo de canela nas menores concentrações (1/8 e 1/16 CMB) não promoveu adaptação cruzada de *S. aureus* após 24h de pré-exposição ao óleo. Contudo, após 6h de pré-exposição ao óleo na concentração de 1/8 CMB, ocorreu adaptação cruzada para norfloxacina e tetraciclina, *S. aureus* passou de sensível a intermediário para ambos antibióticos. E na concentração de 1/16 CMB só foi observada adaptação cruzada para tetraciclina.

A pré-exposição ao óleo essencial de menta em concentração de 1/16 CMB, nos tempos de 6 e 24h, não gerou adaptação cruzada aos antibióticos. Porém, promoveu o aumento da sensibilidade de *S. aureus* a novobiocina, da categoria intermediária para sensível, após 24h de pré-exposição ao estresse subletal (1/16CMB).

Em resposta ao estresse subletal (1/16CMB) gerado pelo óleo de orégano, *S. aureus* apresentou adaptação cruzada ao cloranfenicol para ambos os tempos de pré-exposição ao óleo, passando de sensível para intermediária a sua classificação, o mesmo ocorreu para norfloxacina, mas apenas após 6h de pré-exposição ao óleo de orégano.

Tabela 5 - Capacidade de adaptação cruzada de *Staphylococcus aureus* GL 4384 com pré-exposição ao estresse subletal promovido por óleos essenciais e subsequente estresse causa por antibióticos

Agente estressor	Estresse subletal (CMB/n)	Conc. (%)	Agente estressor	Halo inibição (mm)/classificação			
				Adaptação (h)			
				6h		24h	
Canela	1/4	0,0155	Cefuroxima	10,87±0,62	R	0	R
			Cloranfenicol	16,87±1,23	INT**	18,37±1,22	INT**
			Norfloxacin	15,14±0,55	INT**	16,83±1,62	INT**
			Novobiocina	22,65±0,35	S*	21,95±1,99	INT
			Tetraciclina	19,51±2,07	S	20,46±1,90	INT**
	1/8	0,0076	Cefuroxima	0	R	0	R
			Cloranfenicol	18,88±0,58	S	19,47±1,25	S
			Norfloxacin	16,77±0,91	INT**	19,36±1,77	S
			Novobiocina	20,02±0,71	INT	21,36±1,31	INT
			Tetraciclina	18,65±0,89	INT**	21,28±1,03	S
	1/16	0,0039	Cefuroxima	0	R	0	R
			Cloranfenicol	18,05±1,06	S	22,04±0,77	S
			Norfloxacin	17,55±0,74	S	21,20±0,78	S
			Novobiocina	21,17±0,86	INT	21,76±0,45	INT
			Tetraciclina	17,14±1,00	INT**	19,09±0,82	S
Menta	1/16	0,0625	Cefuroxima	0	R	7,54±0,69	R
			Cloranfenicol	22,51±1,03	S	18,16±0,69	S
			Norfloxacin	21,49±0,51	S	18,37±0,75	S
			Novobiocina	19,84±1,15	INT	23,36±1,01	S*
			Tetraciclina	17,68±0,33	S	21,58±0,06	S
Orégano	1/16	0,0156	Cefuroxima	7,76±1,05	R	10,18±0,72	R
			Cloranfenicol	17,04±1,53	INT**	17,60±1,03	INT**
			Norfloxacin	14,90±0,77	INT**	17,09±0,68	S
			Novobiocina	20,37±2,03	INT	20,59±0,71	INT
			Tetraciclina	19,44±2,37	S	22,47±0,55	S

\*aumentou a sensibilidade ao antibiótico; \*\* reduziu a sensibilidade ao antibiótico; R: Resistente; S: Sensível; INT: Intermediário

A adaptação cruzada pode ocorrer quando agentes antimicrobianos distintos, utilizados simultaneamente, têm o mesmo alvo na célula microbiana (CHAPMAN, 2003).

Quando o microrganismo é exposto a uma situação de estresse ocorre o aumento na síntese das proteínas de estresse ou HSPs. Essas proteínas pertencem às famílias das chaperonas, e desempenham um papel importante na montagem de polipeptídeos recém-sintetizados, em sua conformação nativa e também no dobramento e reparação das proteínas do citosol (DI PASQUA et al., 2010).

Zago et al. (2009) isolou de humanos linhagens de *S. aureus* e *E. coli* e verificou a ocorrência de sinergismo entre óleos essenciais e antibióticos. As células de *S. aureus* se mostraram-se mais suscetíveis à interferência dos óleos sobre antibióticos testados, ocorreu

sinergismo em 54% dos tratamentos. Enquanto para *E. coli* só ocorreu sinergismo em 10,4% dos tratamentos. Para *S. aureus*, os fármacos gentamicina, cefalotina e cefepime apresentaram um aumento de sensibilidade quando expostas aos óleos de menta e capim cidreira. Da mesma forma aconteceu neste estudo com o óleo de menta e o antibiótico novobiocina.

O estudo realizado por Oliveira et al. (2006), mostrou que as bactérias Gram-positivas selecionadas para os testes (*S. aureus* e *S. epidermis*) foram mais susceptíveis a sofrerem interações entre os antibióticos e óleos essenciais quando comparadas as Gram-negativas. Uma explicação possível para este resultado, é o fato de as bactérias Gram-negativas possuírem uma membrana externa formada por fosfolipídios, lipopolissacarídeos e proteínas que garantem uma certa impermeabilidade aos agentes antimicrobianos (LAMBERT, 2002).

#### **4.5.2 Adaptação cruzada de *Staphylococcus aureus* entre pH e antibióticos**

Um pH fora dos padrões ideais do microrganismo afeta sua célula em pelo menos dois aspectos, o funcionamento de suas enzimas e o transporte de nutrientes para o interior da célula (JAY, 2005). Assim, a indústria alimentícia utiliza de ácidos fracos como conservantes, uma vez que afetam a capacidade das células microbianas de manter a homeostase do pH, interrompendo o transporte de nutrientes e inibindo as vias metabólicas (BEALES, 2004).

Os resultados da adaptação cruzada entre pH e antibióticos para *Staphylococcus aureus* estão apresentados na tabela 6. *S. aureus* apresentou adaptação cruzada somente a tetraciclina, fato ocorrido apenas após exposição ao baixo pH por 24h, a cepa passou de sensível para intermediária. Em relação a novobiocina, a bactéria se tornou mais sensível ao antibiótico após 6h de exposição ao pH 5,0, entretanto foi observado que, após 24h de exposição ao estresse subletal, a bactéria conseguiu se reestabelecer, voltando a ser classificada com sensibilidade intermediária ao antibiótico.

Tabela 6 - Adaptação cruzada de *Staphylococcus aureus* a antibióticos após adaptação por 6 e 24 h ao pH 5,0 (mínimo de crescimento)

Antibiótico	Conc. ( $\mu\text{g}$ )	Halo de inibição (mm) / classificação			
		Adap. (h)			
		6		24	
Cefuroxima	30	6,20 $\pm$ 3,71	R	5,06 $\pm$ 5,14	R
Clorafenicol	30	18,05 $\pm$ 1,27	S	18,99 $\pm$ 0,92	S
Norfloxacina	10	19,87 $\pm$ 0,46	S	18,18 $\pm$ 1,76	S
Novobiocina	30	24,24 $\pm$ 1,00	S*	20,01 $\pm$ 1,89	INT
Tetraciclina	30	21,29 $\pm$ 0,65	S	18,06 $\pm$ 2,80	INT**

\*aumento da sensibilidade ao antibiótico; \*\*diminuição da sensibilidade ao antibiótico. R: Resistente; S:Sensível; INT: Intermediário

McMahon et al. (2007) demonstrou que os tratamentos realizados pela indústria alimentícia para controlar patógenos (temperatura, pH e estresse osmótico) quando utilizados de maneira subletal gerava alterações significativas na resistência dos microrganismos a antibióticos. Quando expostas a estresse subletal de pH baixo (< 5) *S. aureus*, *Salmonella enterica* Typhimurium e *Escherichia coli* apresentaram uma menor sensibilidade aos antibióticos e mesmo após as células serem retiradas da situação de estresse *S. aureus* e *E. coli* mantiveram a susceptibilidade baixa. Tal resposta indica que o estresse foi capaz de promover alterações fenotípicas estáveis. Os autores sugeriram que a utilização de métodos bacteriostáticos, em vez de bactericidas, pela indústria, pode ter contribuído para a disseminação de cepas mais resistentes a antibióticos.



## 5. CONCLUSÃO

Os óleos de *Cinnamomum cassia* (canela), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Mentha piperita* (menta) e *Origanum vulgare* (orégano) apresentaram atividade bactericida sobre as células de *Staphylococcus aureus* - GL 4384. Dentre eles, o de canela foi o mais eficiente, seguido do óleo de orégano, apresentando concentração mínima bactericida (CMB) de 0,062% e 0,25% respectivamente. O óleo essencial de lavanda, apesar de ter apresentado menor eficiência na ação bactericida (CMB DE 2%), foi o único óleo para o qual a cepa de *S. aureus* não desenvolveu adaptação em nenhuma das concentrações subletais (1/4, 1/8 e 1/16 CMB) e tempos (6 e 24 h) avaliados neste estudo. Mostrando-se, assim, mais seguro para aplicações na indústria de alimentos e na área da saúde.

Quanto as adaptações cruzadas, exceto para a cefuroxima, os outros antibióticos avaliados (cloranfenicol, norfloxacin, novobiocina, tetraciclina) apresentaram alguma forma de interação com os óleos essenciais para *Staphylococcus aureus*, ou desenvolvendo adaptação cruzada ou sinergismo, quando ocorreu o aumento da sensibilidade de da cepa ao fármaco após pré-exposição a concentrações subletais de óleo essencial. *S. aureus* desenvolveu adaptação cruzada apenas a tetraciclina, após pré-exposição ao pH 5,0 por 24 horas.

Diante dos resultados, embora as adaptações diretas e cruzadas de *Staphylococcus aureus* – GL 4384 aos óleos essenciais, antibióticos e pH tenham ocorrido em casos específicos, de modo geral, pode-se concluir que a cepa estudada apresentou capacidade de resposta adaptativa aos estresses aos quais foi submetida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, Konstantia et al. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. hirtum, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1739-1745, 1998.
- AGUIAR, J. J. S. et al. Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. **European Journal of Integrative Medicine**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 151-156, Apr. 2015.
- ARGUDÍN, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, 2(7), 1751-1773.
- AKHTAR, M.; PARK, C. E.; RAYMAN, K. Effect of urea treatment on recovery of Staphylococcal enterotoxin A from heat—processed foods. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3274-3276, Sept. 1996.
- ALARCÓN, M. M. V. **Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota**. 2007. 56 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- ALVAREZ-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, n. 3, p. 212-219, Apr. 2008.
- ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: implications for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 213, p. 99-109, 2015.
- ALVES, Livia Araújo; DE ALMEIDA FREIRES, Irlan; CASTRO, Ricardo Dias. Efeito Antibacteriano de Óleos Essenciais sobre Bactérias Formadoras do Biofilme Dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 57-62, 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.
- APPELBAUM, P. C. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. s1, p. 16-23, 2006.
- ARAÚJO, M.A. Química de alimentos. Teoria e prática. Viçosa: **Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa**, 1995. p. 247.
- BAKKALI, F. et al.; Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2004.
- BEGLEY, Máire; HILL, Colin. Stress adaptation in foodborne pathogens. **Annual review of food science and technology**, v. 6, p. 191-210, 2015.

BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 436-440, out. /dez. 2013.

BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 100, n. 2, p. 91- 100, Mar. 1990.

BHUNIA, A.K. **Foodborne Microbial Pathogens**. 1. ed. New York: Springer, 2008.

BIKELS-GOSHEN, Tamar 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**, v. 138, n. 1, p. 26-31, 2010.

BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA, Sociedade et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541938005>>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Antimicrobianos - principais grupos disponíveis para uso clínico**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/antimicrobianos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm)> Acesso em: 06 dezembro 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos - VE-DTA**. São Paulo, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. São Paulo, 2016.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. **Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do meio ambiente**. Minas Gerais: Embrapa, 1997, p. 7-25

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Microbiologia Médica**. 21ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 612p.

BURLISON, Joseph A. et al. Novobiocin: redesigning a DNA gyrase inhibitor for selective inhibition of hsp90. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 48, p. 15529-15536, 2006.

BURT, S. A. et al. Carvacrol induces heat shock protein and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 4484-4490, 2007.

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.

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**, Bethesda, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, June 2002.

CEBRIÁN, G. et al. Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. **International journal of food microbiology**, v. 140, n. 1, p. 26-33, 2010.

CHAN, Pan F. et al. The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor  $\zeta$ B controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 23, p. 6082-6089, 1998.

CHAPMAN, John S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271–276, 2003.

CLEMENTS, Mark O.; FOSTER, Simon J. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**, v. 7, n. 11, p. 458-462, 1999.

COELHO, M. S. **Resposta adaptativa de *Clostridium perfringens*, *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus* aos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*, eugenol, timol e ácido peracético**. 2014. 95 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

COSTA, A. R. T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.

CUNHA, A., Silva, A., e Roque, O. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. 2ª ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2006.

CUNHA, A., Silva, A., e Roque, O., Cunha, E. **Plantas e Produtos Vegetais em Cosmética e Dermatologia**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

DIETZE, B. et al. Survival of MRSA on sterile goods packaging. **Journal of Hospital Infection**, v. 49, n. 4, p. 255-261, 2001.

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.

FERREIRA, A. C. **Uso Do Açafrão (*Curcuma Longa* L.) Na Redução De *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 em Ricota**. 2003. 76 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FONTANA, Rosane Teresinha. As infecções hospitalares e a evolução histórica das infecções. **Revista Brasileira de enfermagem**, v. 59, n. 5, 2006.

FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, SP: Atheneu, 2008. 182p.

FONG, Karen; WANG, Siyun. Heat resistance of *Salmonella enterica* is increased by pre-adaptation to peanut oil or sub-lethal heat exposure. **Food microbiology**, v. 58, p. 139-147, 2016.

GONÇALVES, L. A. et al. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 8-14, 2003.

GOULD, Grahame W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 13, p. 82-86, 1996.

HABER LL et al. Diferentes concentrações de solução nutritiva para o cultivo de *Mentha Piperita* e *Melissa Officinalis*. **Horticultura Brasileira**, 23(4): 1006-1009, 2005.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, p. 985-990, 1999.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 135-136, 1997.

HOFFMANN, Fernando Leite. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil alimentos**, v. 9, n. 1, p. 23-30, 2001.

HUANG, D. F. et al. Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. **Microbiology**, United Kingdom, v. 83, n. 4, p. 357-365, July 2014.

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.

IMAI, Hirokazu et al. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. **Microbios**, v. 106, p. 31-39, 2001.

ITA, P. S.; HUTKINS, R. W. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric, and hydrochloric acids. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 54, p. 15-19, 1991.

ITO, Teruyo et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 1, p. 41-52, 2003.

JAY, James M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005. 711 p.

KALILY, Emmanuel et al. Adaptation of *Salmonella enterica* Serovar Senftenberg to Linalool and Its Association with Antibiotic Resistance and Environmental Persistence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 10, p. e03398-16, 2017.

KARATZAS, Kimon AG et al. Piezotolerant small-colony variants with increased thermotolerance, antibiotic susceptibility, and low invasiveness in a clonal *Staphylococcus aureus* population. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1873-1881, 2007.

KIM, J. M. et al.; Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 1364-1368, 1995.

KIM, N. H.; YUN, A.-R.; RHEE, M. S. Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 6, p. 1456-1464, 2011.

KULLIK, I.; GIACHINO, P. The alternative sigma factor  $\sigma_B$  in *Staphylococcus aureus*: regulation of the sigB operon in response to growth phase and heat shock. **Archives of microbiology**, v. 167, n. 2-3, p. 151-159, 1997.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 453-462, 2001.

LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 92, p. 46S-54S, 2002.

- LANGSRUD, S. et al. Bacterial disinfectant resistance: a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, United Kingdom, v. 51, n. 4, p. 283-290, June 2003.
- LEVIN, Bruce R.; ROZEN, Daniel E. Non-inherited antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 556, 2006.
- LUNDÉN, J. M. et al. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 265-272, May 2003.
- 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.
- MADANI, N. B.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam v. 59, n. 2/3, p. 139-145, Jan. 1998.
- MADIGAN, Michael T. et al. Brock biology of microorganisms 12th edn. **Int. Microbiol**, v. 11, p. 65-73, 2008.
- MCMAHON, M. Ann S. et al. Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 1, p. 211-217, 2007.
- MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2005. 72 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. NCCLS document M100-S21, vol. 31, no. 1. Wayne: NCCLS. 168 p, 2011.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 11th ed. Wayne, 2018. 91 p. (NCCLS Document, M07).
- NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Avellino, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, Dec. 2013.
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- NEELY, Alice N.; MALEY, Matthew P. Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 2, p. 724-726, 2000.
- NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; SUDANO, A. R.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.
- OLIVEIRA, Adriana R.; DOMINGUES, Fernanda C.; FERREIRA, Susana. The influence of resveratrol adaptation on resistance to antibiotics, benzalkonium chloride, heat and acid stresses of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 73, p. 1420-1425, 2017.

OLIVEIRA, RAG de et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

OPAS. **Guía veta**: guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos y la investigación de brotes de toxi-infecciones alimentarias. Buenos Aires: OPAS, 2001.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control, Guildford**, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

PAGNOSSA, J. P. **Adaptação e adaptação cruzada de biofilmes de *Salmonella* sp. a linalol, citral e cinamaldeído**. 2016. 89 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Evolution of Comercial Enzyme Imunoassay Kit (RIDASCREEN) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C, D and E in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 2, p. 677-681, Feb. 1994.

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

POIMENIDOU, S. V. et al. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat, salinity and low pH, after habituation on cherry tomatoes and lettuce leaves. **PloS One**, San Francisco, v. 11, n. 10, p. e0165746, 2016.

PORTOCARRERO, S. M.; NEWMAN, M.; MIKEL, B. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of countrycured hams manufactured under different processing procedures. **Meat Science**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 267-273, Oct. 2002.

RANG, H.P., Dalle, M., Ritter, J.M. **Farmacologia**, 7ª edição, Elsevier, 2011

RASOOLI, Iraj et al. Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 9, p. 1162-1167, 2008.

ROBERSON J. R.; FOX L. K., HANCOCK D. D.; GAY J. M. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.*, v.77, n.11, p.3354-3364, 1994

SANTOS, André Luis dos et al. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, J.M.P.; GONÇALVES, M.C.; PEREIRA, H.M.A.; PINELLI, J.J.; RODRIGUES, S.I.; PICCOLI, R.H. Homologous and Heterologous Adaptation of *Listeria* spp. to Essential Oils of Condiment Plants. **Advances in Microbiology**, v. 8, p. 639-649, 2018.

SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O, et. al., (Org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2000, p. 333-365.

SESSOU, P.; FAROUGOU, S.; SOHOUNHLOUÉ, D. Major component and potential applications of plant essentials oils as natural food preservatives: a short review research results. **International of Journal Biosciences**, Bangladesh, v. 2, n. 8, p. 45-57, Aug. 2012.

- SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, Tnases and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 11, p. 1-20, 1990.
- SCHULZ. HANSEL. E TYLER. (s.d.). Fitoterapia Racional. 4ª ed. S. Paulo, Manole. 2002
- SILVA, A. F. et al. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.(Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2003.
- SILVA JÚNIOR, A. A.; VERONA, M. L. F. **Plantas medicinais e aromáticas**. Itajaí, SC: Ministério de Meio Ambiente, Fundo Nacional do Meio Ambiente, 1997, 456 p.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos e bolores e leveduras em placas. In: **Manual de Métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. Cap. 3, p. 21-29.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. 1104 p.
- SIQUI AC, Sampaio, ALF, Sousa MC, Henriques MGMO, Ramos, MFS 2000. Óleos essenciais - potencial antiinfl amatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 16: 38-43.
- 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.
- SMITH-PALMER, A. et al.; Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118, 1998
- SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. Adaptation and Cross adaptation of *Listeria monocytogenes* to eugenol and carvacrol compounds. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 4, p. 528-533, 2015.
- SOUZA, T. R. de. **Óleos essenciais no controle de células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus***. 2015. 70 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- TATINE, S. R. Influence of food enviroments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. **Journal of Milk food Technology**, Ames, v. 36, n. 11, p. 559-563, Nov. 1973.
- TRAJANO, Vinicius Nogueira et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.
- WESCHE, ALISSA M. et al. Stress, Sublethal Injury, Resuscitation, and Virulence of Bacterial Foodborne Pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p. 1121–1138, maio 2009. Disponível em: <<http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-72.5.1121>>.
- WHEELER, K. A.; HURDMAN, B. F.; PITT, J. I. Influence of pH on the growth of some toxigenicspecies of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 141-150, 1991.
- WU, Shangwei; DE LENCASTRE, HERMINIA; TOMASZ, Alexander. Sigma-B, a putative



operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 20, p. 6036-6042, 1996.

WU, Shijia et al. A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 8, n. 7, 2016.

YOON, Y. et al. Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses. **Food Research International**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 25-36, 2015.

YOUSEF, Ahmed E; COURTNEY, Polly D. Basics of Stress Adaptation and Implications in New-Generation Foods. **Microbial stress adaptation and food safety**, p. 1–30, 2003.

ZAGO, Juliana AA et al. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista brasileira de farmacognosia**, p. 828-833, 2009.

ZAIKA, Laura L. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. **Journal of Food Safety**, v. 9, n. 2, p. 97-118, 1988.

