



MARIANA SILVA COELHO

**RESPOSTA ADAPTATIVA DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
SÉSSEIS DE *Salmonella* Enteritidis AO ÓLEO ESSENCIAL DE
CRAVO, EUGENOL, QUATERNÁRIO DE AMÔNIO E ÁCIDO
LÁTICO**

**LAVRAS - MG
2017**

MARIANA SILVA COELHO

**RESPOSTA ADAPTATIVA DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE
Salmonella Enteritidis AO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO, EUGENOL,
QUATERNÁRIO DE AMÔNIO E ÁCIDO LÁTICO**

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

Orientadora
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS - MG
2017**

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

Coelho, Mariana Silva.

Resposta adaptativa de células planctônicas e sésseis de
Salmonella Enteritidis ao óleo essencial de cravo, eugenol,
quaternário de amônio e ácido lático / Mariana Silva Coelho. -
2017.

70 p.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.
Bibliografia.

1. Óleo essencial. 2. *Salmonella*. 3. Microrganismo
patogênico. I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Título.

MARIANA SILVA COELHO

**RESPOSTA ADAPTATIVA DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE
Salmonella Enteritidis AO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO, EUGENOL,
QUATERNÁRIO DE AMÔNIO E ÁCIDO LÁTICO**

**ADAPTIVE RESPONSE OF PLANKTONIC AND SESSILE CELLS
OF *Salmonella* Enteritidis TO CLOVE ESSENTIAL OILS, EUGENOL,
QUATERNARY AMMONIUM AND LACTIC ACID**

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

APROVADA em 29 de setembro de 2017.

Dr. Disney Ribeiro Dias

UFLA

Dr. Whasley Ferreira Duarte

UFLA

Dra. Wellingta Cristina A. do Nascimento Benevenuto

IFSUDESTEMG

Dra. Sandra Marisa Mathioni

UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS - MG
2017**

A Deus
A toda a minha família
Em especial, aos meus pais, Juarez e Roseli,
e ao meu noivo, Raphael,
em reconhecimento ao apoio e incentivo.
Dedico

AGRADECIMENTOS

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

À Universidade de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA), pela oportunidade concedida para a realização do doutorado e do doutorado Sanduíche na Universidade de Delaware, EUA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos e também pela concessão da bolsa do doutorado sanduíche.

À professora Roberta, pela valiosa oportunidade, orientação, dedicação, paciência, amizade e incentivo. Sem você nada seria possível. Minha eterna gratidão.

Aos professores do PPGMA, pelos ensinamentos transmitidos.

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

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

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

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

Aos membros da banca, Disney, Whasley e Sandra, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho e, especialmente, à professora Wellingtona, que vem fazendo parte de todas as minhas conquistas, desde o começo de minha vida acadêmica.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DCA/UFLA), pela ajuda na condução dos experimentos.

À minha coorientadora da Universidade de Delaware, Kali Kniel, pela valiosa oportunidade de trabalhar com ela e sua equipe durante um ano.

À Eliane, que está sempre à disposição no laboratório.

À Sandra e a Bella, que foram fundamentais para que este estudo fosse realizado.

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

RESUMO GERAL

A contaminação de superfícies e alimentos por microrganismos deterioradores e patogênicos como *Salmonella* sp. é uma preocupação na indústria de alimentos. Os óleos essenciais e seus componentes majoritários têm demonstrado atividade antimicrobiana sobre esses microrganismos. Eles podem modificar as características sensoriais dos alimentos aos quais são adicionados no intuito de preservá-los. Diante disso, esses antimicrobianos vêm sendo utilizados em conjunto com outras barreiras, para que sejam utilizados em menores quantidades, o que faz com que eles possam ser encontrados em concentrações subletais. Assim, as características fisiológicas desses microrganismos podem conferir resistência aos agentes antimicrobianos, como, por exemplo, aos sanificantes utilizados nos procedimentos de higienização ou aos antimicrobianos utilizados na conservação de alimentos. Esta frequente exposição a concentrações subletais pode levar ao aparecimento de microrganismos mais resistentes. Neste contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a adaptação de células planctônicas e sésseis de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ao óleo essencial de cravo, seu componente majoritário eugenol, ao quaternário de amônio e ao estresse ácido. Para a avaliação da adaptação das células planctônicas, primeiramente, foi realizada a análise das concentrações mínimas bactericidas (CMB) do óleo essencial de cravo e de seu componente majoritário eugenol nas concentrações de 0,5; 0,9; 1,9; 3,9; 7,8; 15,6; 31,2 e 62,5 mg.mL⁻¹ e do quaternário de amônio nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 0,9; 1,9 mg.mL⁻¹, que foram determinadas empregando-se a técnica de microdiluição em caldo em placas de poliestireno de 96 cavidades e incubados, a 37 °C, por 24 horas. Para a avaliação da adaptação das células sésseis, primeiramente foi realizada a análise da CMB do óleo essencial de cravo e de seu componente majoritário eugenol nas concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 80 mg.mL⁻¹ e do quaternário de amônio nas concentrações de 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 e 100 mg.mL⁻¹, que foram determinadas empregando-se a técnica de microdiluição em caldo em placas de poliestireno de 96 cavidades e incubados, a 37 °C, por 48 horas. Em todo o experimento os antimicrobianos foram homogeneizados em caldo BHI, adicionado de 0,5% (v/v) de Tween 80. Para a adaptação das células planctônicas, utilizou-se a concentração subletal de 1/8 CMB dos antimicrobianos, a 37 °C, por 6 horas. Para adaptação das células sésseis utilizou-se a concentração subletal de 1/8 CMB dos antimicrobianos das células planctônicas, a 37 °C, por 48 horas. Para a indução de resistência direta das células planctônicas, ou seja, submetidas à concentração subletal e, posteriormente, expostas ao mesmo antimicrobiano, não foi observada a adaptação, tendo as CMB se mantido as mesmas. Entretanto, foi observada adaptação cruzada de *S. Enteritidis* entre o óleo essencial de cravo e eugenol ao pH, e os microrganismos passaram a crescer em pH 4,5 e 5,0, respectivamente. Também foi observada a adaptação cruzada entre o componente majoritário eugenol e o sanificante quaternário de amônio. Para a indução de resistência direta e cruzada das células sésseis foi observada a adaptação ao eugenol, tendo sua concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB) passado de 30 para 40 mg.mL⁻¹, para ambos os casos. Pode concluir-se que esses antimicrobianos podem ser utilizados na indústria de alimentos, mas medidas preventivas devem ser utilizadas para que o microrganismo não seja submetido a concentrações subletais desses antimicrobianos, devido à aquisição de tolerância cruzada.

Palavras-chave: Óleo essencial. *Salmonella*. Microrganismo patogênico. Estresse ácido. Adaptação.

GENERAL ABSTRACT

Surfaces and food contamination by deteriorating and pathogenic microorganisms such as *Salmonella* sp. is a concern in the food industry. Essential oils and their major compounds have demonstrated antimicrobial activity on these microorganisms. They can modify the foods sensorial characteristics to which they are added in order to preserve them. Front of this, these antimicrobials have been used in conjunction with other barriers, in order that it is used in smaller quantities, so they can be found in sublethal concentrations. Thus, the physiological characteristics of these microorganisms may confer resistance to antimicrobial agents, such as, for instance, sanitizers used in hygienic procedures or antimicrobials used in food preservation. This frequent exposure to sublethal concentrations may lead to the appearance of more resistant microorganisms. In this context, the objective of this study was to evaluate the adaptation of planktonic and sessile cells of *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis to the clove essential oil, its majoritarian compound eugenol, quaternary ammonium and acid stress. In order to evaluate the adaptation of the planktonic cells, were firstly analyzed the clove essential oil minimum bactericidal concentrations (MBC) and its major compound eugenol at concentrations of 0.5; 0.9; 1.9; 3.9; 7.8; 15.6; 31.2 and 62.5 mg.mL⁻¹ and the quaternary ammonium at concentrations of 0.1; 0.2; 0.5; 0.9; 1.9 mg.mL⁻¹, which were determined using the broth microdilution in 96-well polystyrene plates and incubated at 37 ° C for 24 hours. To evaluate the adaptation of the sessile cells, were firstly analyzed the MBC of the clove essential oil and its major compound eugenol at concentrations of 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 and 80 mg.mL⁻¹ and also the quaternary ammonium at concentrations of 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 and 100 mg.mL⁻¹ which were determined using the broth microdilution in 96-well polystyrene plates and incubated at 37 ° C for 48 hours. Throughout the experiment the antimicrobials were homogenized in BHI broth, added with 0.5% (v / v) Tween 80. For the adaptation of the planktonic cells, the sublethal concentration of 1/8 MBC of the antimicrobials was used, at 37 ° C, for 6 hours. To adapt the sessile cells, the sublethal concentration of 1/8 MBC of the antimicrobials of the planktonic cells was used at 37 ° C/48 h. For direct resistance induction of planktonic cells, that is, subjected to sublethal and then exposed to the same antimicrobial concentrations, there was no adaptation, the MBC remained the same. However, cross-adaptation of *S. Enteritidis* between clove essential oil and eugenol at pH was observed, and the microorganisms grew at pH 4.5 and 5.0, respectively. Cross-matching between the majoritarian component eugenol and the quaternary ammonium sanitizer was also observed. For the induction of direct and cross resistance of sessile cells, adaptation to eugenol was observed, with a minimum bactericidal concentrations of biofilm (MBCB) increased from 30 to 40 mg.mL⁻¹, in both cases. It can be concluded that these antimicrobials can be used in the food industry, but preventive measures should be used so that the microorganism is not subjected to sublethal concentrations of these antimicrobials due to the acquisition of cross tolerance.

Keywords: Essential oil. *Salmonella*. Pathogenic microorganism. Acid stress. Adaptation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Processo de formação do biofilme (BREYERS; RATNER, 2004).....	18
Figura 2 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.	22
Figura 3 - Mecanismo de ação dos óleos essenciais.....	24
Figura 4 - Estrutura Molecular do Eugenol.	25

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis.	42
Tabela 2 - Resposta adaptativa de <i>S. Enteritidis</i> ao óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio.	43
Tabela 3 - Adaptação cruzada ao quaternário de amônio da bactéria <i>S. Enteritidis</i> submetida ao estresse subletal causado por óleo essencial de cravo e eugenol.	45
Tabela 4 - Resposta adaptativa cruzada de <i>Salmonella</i> Enteritidis ao pH, após cultivo em presença de concentrações subletais de óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio.	46

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB) de óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio sobre biofilme de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis.	62
Tabela 2 - Resposta adaptativa de biofilme de <i>S. Enteritidis</i> ao óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio.	63
Tabela 3 - Resposta adaptativa sucessiva de <i>S. Enteritidis</i> ao óleo essencial de cravo e seu componente majoritário eugenol.	66
Tabela 4 - Resposta adaptativa cruzada de <i>S. Enteritidis</i> ao óleo essencial de cravo e eugenol.	67

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis	15
2.2	Biofilmes.....	16
2.2.1	Etapas envolvidas no processo de formação de biofilmes microbianos	17
2.2.2	Mecanismos de resistência de bactérias em biofilmes	19
2.2.3	Controle e eliminação de biofilmes.....	19
2.3	Adaptação e adaptação cruzada de células planctônicas e sésseis a agentes antimicrobianos.....	20
2.4	Agentes antimicrobianos tradicionais	21
2.5	Óleos essenciais.....	21
2.5.1	Mecanismo de ação dos óleos essenciais.....	23
2.5.2	<i>Syzygium aromaticum</i> Thumb.	24
2.5.3	Eugenol.....	25
	REFERÊNCIAS	26
	CAPÍTULO 2 Adaptação e adaptação cruzada de células planctônicas de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis ao óleo essencial de cravo-da-índia, eugenol, quaternário de amônio e ácido láctico	31
1	INTRODUÇÃO.....	34
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1	Agentes antimicrobianos	37
2.2	Microrganismo, manutenção e padronização do inóculo.....	37
2.3	Determinação da concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida das células planctônicas.....	38
2.4	Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório das células planctônicas	38
2.5	Adaptação de <i>Salmonella</i> Enteritidis a concentrações subletais de óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio	39
2.6	Indução de <i>Salmonella</i> Enteritidis ao estresse ácido.....	39
2.7	Avaliação da adaptação de <i>Salmonella</i> Enteritidis ao óleo essencial de cravo, eugenol, quaternário de amônio e resposta à tolerância ácida	40
2.8	Avaliação da adaptação cruzada entre óleo essencial de cravo e eugenol ao quaternário de amônio.....	40
2.9	Avaliação da adaptação cruzada entre óleo essencial de cravo, eugenol, quaternário de amônio e estresse ácido.....	41
2.10	Avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e óleo essencial de cravo, eugenol, quaternário de amônio	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1	Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida das células planctônicas.....	42
3.2	Adaptação de <i>Salmonella</i> Enteritidis ao óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio.....	43
3.3	Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório e indução de estresse ácido na <i>Salmonella</i> Enteritidis	44
3.4	Avaliação da adaptação cruzada entre óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio.....	45

3.5	Avaliação da adaptação cruzada ao estresse ácido de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis expostas ao óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio	46
4	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	CAPÍTULO 3 Adaptação e adaptação cruzada de células sésseis de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis ao óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio.....	52
1	INTRODUÇÃO	55
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1	Agentes antimicrobianos	57
2.2	Microrganismo, manutenção e padronização do inóculo.....	57
2.3	Determinação da concentração mínima bactericida do biofilme	57
2.4	Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório do biofilme	58
2.5	Adaptação de células planctônicas de <i>Salmonella</i> Enteritidis a concentrações subletais do óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio e formação de biofilme	59
2.6	Adaptação de células planctônicas de <i>Salmonella</i> Enteritidis ao estresse ácido e formação de biofilme.....	60
2.7	Adaptação de biofilme de <i>Salmonella</i> Enteritidis a concentrações crescentes do óleo essencial de cravo e eugenol	60
2.8	Avaliação da adaptação cruzada entre óleo essencial de cravo e eugenol	61
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1	Concentração mínima bactericida do biofilme	62
3.2	Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório do biofilme	63
3.3	Adaptação de biofilme de <i>Salmonella</i> Enteritidis a concentrações subletais do óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio	63
3.4	Adaptação de células planctônicas de <i>Salmonella</i> Enteritidis ao estresse ácido e formação de biofilme.....	65
3.5	Adaptação a concentrações crescentes do óleo essencial de cravo e eugenol ...	65
3.6	Avaliação da adaptação cruzada entre óleo essencial de cravo e eugenol	66
4	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

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

Preocupações crescentes sobre a transmissão de doenças de origem alimentar têm levado ao aumento da utilização de agentes antimicrobianos, nas indústrias e nas residências. Há preocupações em relação ao fato de que o uso indiscriminado e inadequado desses compostos biocidas (concentrações inadequadas, limpeza insuficiente antes da aplicação ou presença de sanificantes residuais subletais após sanificação) pode contribuir para a propagação da resistência bacteriana a esses compostos, bem como a resistência cruzada a certos antibióticos terapêuticos. Estudos demonstraram o potencial para que esse fenômeno ocorra (BRAOUDAKI; HILTON, 2004; RUSSELL, 2000).

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

Tem sido relatado em estudos que o uso de determinados sanificantes promove pressão seletiva e contribui para o surgimento de microrganismos resistentes a eles (LANGSRUD et al., 2003). Assim, é possível que a resistência a sanificantes dos microrganismos de um biofilme também seja consequência da exposição prolongada a doses subletais desses compostos (DAVIDSON; HARRISON, 2003). Apesar de a resistência bacteriana a antibióticos ser bastante conhecida, a resistência a sanificantes e a conservantes de alimentos ainda é pouco estudada. Os mecanismos bioquímicos exatos de adaptação e de resistência ainda não foram completamente elucidados (BRAOUDAKI; HILTON, 2005; LEVIN, 2004; RUSSEL, 2003).

O crescente interesse por compostos antimicrobianos naturais tem aumentado devido a mudanças nas atitudes dos consumidores em relação ao uso de agentes sintéticos de conservação de alimentos, detergentes e sanificantes, buscando aqueles que causam menor impacto (LEBERT; LEROY; TALON, 2007). Entre os agentes que têm recebido recente interesse, destaca-se a utilização de óleos essenciais.

Os óleos essenciais são formados a partir de vias metabólicas secundárias e podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, que ocorrem em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares,

células parenquimáticas diferenciadas e canais oleíferos, ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (BURT, 2004).

A partir de condições favoráveis, quase todos os microrganismos são capazes de formar biofilmes (MCLANDBOROUGH et al., 2006). As bactérias são as que mais frequentemente produzem biofilme, ainda que algumas apresentem, naturalmente, maior aptidão que outras. Adesão de *Salmonella* a superfícies de indústrias de alimentos foi o primeiro relato publicado em relação à formação de biofilme por bactérias de origem alimentar (DUGUID; ANDERSON; CAMPBELL, 1966).

No estado de São Paulo, a *Salmonella enterica* Enteritidis representou, nas duas últimas décadas, de 0,4% a 1,0% de todos os sorotipos isolados de infecções humanas. A partir de 1993, verificou-se aumento crescente no seu isolamento e, em 1995, passou a ser o sorotipo predominante, correspondendo a 64,9% dos isolamentos de material biológico de origem humana e 40,6% de outras origens (PERESI et al., 1998).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2 Biofilmes

A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre não com células individualizadas crescendo de maneira planctônica (livres, em suspensão), mas como comunidades sésseis (células microbianas associadas a diversos tipos de superfícies), com diferentes graus de complexidade, em estruturas denominadas biofilmes (WATNICK; KOLTER, 2000; WEBB; GIVSKOVY; KJELLEBERG, 2003).

Os biofilmes podem ser definidos como um ecossistema microbiológico complexo formado por populações microbianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas, podendo ser compostas por populações oriundas de uma única espécie ou por comunidades derivadas de múltiplas espécies microbianas embebidas em matriz exopoliméricas (COSTERTON; WILSON, 2004; DAVEY; O'TOOLE, 2000; PARSEK; FUQUA, 2004).

Uma característica que deve ser ressaltada na formação de biofilmes é a dependência crítica da presença de substâncias extracelulares que constituem a matriz polimérica na qual as células são envoltas (VEENING et al., 2006).

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

Na maioria dos biofilmes, os microrganismos constituem menos de 10% da matéria seca, enquanto a EPS pode ser responsável por mais de 90% (FLEMMING; WINGENDER, 2010). O topo e a base do biofilme têm maior densidade de células e, muitas vezes, existem canais para o transporte de água, nutrientes e resíduos (REN; SIMS; WOOD, 2002). As células dentro do biofilme estão sujeitas a gradientes de nutrientes que, normalmente, resultam em células metabolicamente ativas, ou seja, com acesso a nutrientes, na superfície intermediária do biofilme e células metabolicamente inativas no líquido sobreposto à periferia e na superfície mais interna (PARSEK; FUQUA, 2004). Os biofilmes contêm células bacterianas em diferentes estágios de desenvolvimento fisiológico.

Vários microrganismos são capazes de aderir e formar biofilmes em diversos tipos de superfícies, podendo ser divididos em deteriorantes e patogênicos. Na indústria de alimentos, o grupo de maior predominância é o das bactérias, cujas elevadas taxas de multiplicação, grande capacidade de adaptação e produção de substâncias e estruturas extracelulares as tornam aptas à formação de biofilme (CHARACKLIS, 1990; NITSCHKE, 2006).

2.2.1 Etapas envolvidas no processo de formação de biofilmes microbianos

Os microrganismos passam por intensas mudanças durante a transição de células planctônicas para células sésseis e a posterior organização em comunidades altamente complexas (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

O desenvolvimento do biofilme bacteriano inclui tanto o comportamento individual e as interações iniciais das células indiferenciadas, assim como a morte celular e a diferenciação no biofilme maduro (WEBB; GIVSKOVY; KJELLEBERG, 2003). O biofilme forma-se em qualquer superfície sólida em que haja presença bacteriana, e sua formação ocorre em uma sequência de eventos, da seguinte forma:

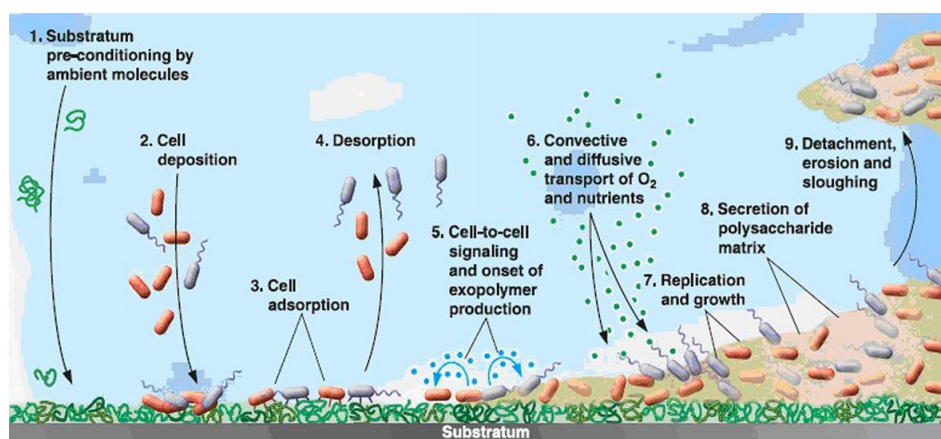
- a) os nutrientes dos alimentos são adsorvidos na superfície formando um filme condicionante. Isso leva à alta concentração de nutrientes e favorece a formação de biofilmes. A camada de nutrientes afeta, ainda, as propriedades físico-químicas da superfície, como, por exemplo, a mudança na hidrofobicidade e as cargas eletrostáticas, as quais influenciam as condições de colonização;
- b) após a formação dessa camada, a bactéria se aproxima da superfície, de modo que sua mobilidade seja retardada. A bactéria então se associa de forma transitória com a superfície e/ou outros microrganismos anteriormente ligados à superfície. Esta associação transitória permite a busca de um lugar para se estabelecer. A adesão inicial

- é controlada por interações eletrostáticas e por forças físicas, como força de Van der Waals, força de Lewis e ligações de hidrogênio. Estas forças estão diretamente relacionadas com as propriedades físico-químicas das superfícies a serem aderidas e da superfície do microrganismo, que são a hidrofobicidade e a carga elétrica;
- c) após a adsorção ocorrem a adesão irreversível e o crescimento das células bacterianas nas superfícies. Durante essa fase, as células produzem mais polímeros, que aumentam sua fixação e estabilizam as colônias contra flutuações do ambiente;
 - d) junto à adesão contínua ocorrem a produção de moléculas sinalizadoras, o transporte de substratos, a multiplicação celular e a produção de EPS, levando à formação de biofilme;
 - e) com o tempo, o biofilme começa a liberar partículas relativamente grandes de biomassa. As bactérias das partes liberadas podem contaminar o alimento e/ou iniciar a formação de um novo biofilme (BREYERS; RATNER, 2004; KREPSKY et al., 2003; RAZATOS et al., 1998; WATNICK; KOLTER, 2000).

O carácter irreversível da adesão é, geralmente, mediado pela produção do EPS e pela presença de apêndices (píli, flagelo, proteínas adesina) (CHARACKLIS, 1990; FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Na Figura 1 tem-se a ilustração das etapas do mecanismo de adesão bacteriano.

Figura 1 - Processo de formação do biofilme.



(1. Substrato pré-condicionamento por moléculas ambientais; 2. Deposição de células; 3. Adsorção de células; 4. Dessorção de células; 5. Sinalização de célula a célula e início da produção de exopolímeros; 6. Transporte convectivo e difusivo de oxigênio e nutrientes; 7. Replicação e crescimento; 8. Secreção da matriz polissacarídica; 9. Desprendimento, erosão e destruição).

Fonte: Breyers e Ratner (2004).

2.2.2 Mecanismos de resistência de bactérias em biofilmes

Os microrganismos podem ser divididos em duas formas, de acordo com sua forma de crescimento, que são os planctônicos e os sésseis. No estágio planctônico, os microrganismos vivem livremente como organismos flutuantes individuais, enquanto na fase sésil se encontram aderidos a uma superfície, formando os biofilmes e funcionando como comunidade integrada fechada (POULSEN, 1999).

As células em biofilmes bacterianos apresentam fisiologia, ecologia e impactos de resistência distintos da célula do mesmo microrganismo que esteja crescendo em culturas planctônicas. Estas diferenças contribuem não somente no processo de infecção, biocorrosão e biodeterioração, mas também tornam os biofilmes um dos nichos ambientais mais prováveis para o desenvolvimento de resistência e seleção microbiana (GILBERT; ALLISON; MCBAIN, 2002).

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

Tem sido demonstrado que os microrganismos em biofilmes são mais resistentes aos sanificantes do que células planctônicas (MILLEZI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010a, 2010b). A sua resistência depende da sua atividade metabólica e aumenta com a idade do biofilme. A resistência a agentes antimicrobianos exibida pelo biofilme está relacionada com a sua estrutura tridimensional e a capacidade do sanificante de penetrar e eliminar a mesma (POULSEN, 1999). A resistência também pode ser atribuída a fatores como neutralização de antimicrobianos pela matriz polimérica, baixa taxa de crescimento e aquisição de genes que conferem resistência (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2004).

2.2.3 Controle e eliminação de biofilmes

A indústria de alimentos deve adotar estratégias de caráter preventivo para o controle do biofilme. Para tal, é necessário implementar procedimentos eficientes de higienização. No entanto, tais medidas nem sempre são suficientes para evitar a formação e o acúmulo de biofilmes nas superfícies.

São consideradas agentes antimicrobianos todas as substâncias que apresentam uma ou mais zonas ativas capazes de estabelecer interações com componentes celulares em sítios alvo específicos das células microbianas (PAULUS, 1993). De forma geral, antimicrobiano define-se como sendo uma substância que exerce efeito adverso na viabilidade ou no crescimento e na reprodução do microrganismo (GAYLARDE; MORTON, 1999; PAULUS, 1993).

2.3 Adaptação e adaptação cruzada de células planctônicas e sésseis a agentes antimicrobianos

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

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

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

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

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

potencial de desenvolvimento de resistência dos microrganismos alvos (DAVIDSON; HARRISON, 2003).

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

2.4 Agentes antimicrobianos tradicionais

Dentre os agentes antimicrobianos tradicionais utilizados na formulação de sanificantes para indústria de alimentos têm-se os de caráter oxidantes e os não oxidantes. Entre os agentes antimicrobianos tradicionais podem-se citar os compostos clorados (cloro, dióxido de cloro, ácido hipocloroso e hipoclorito de sódio e de cálcio), compostos não halogenados (ozônio e peróxido de hidrogênio), aldeídos, sais quaternários de amônio e ácido peracético, entre outros (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

Nas últimas décadas, produtos vegetais com atividade antimicrobiana ganharam especial interesse devido ao aumento do número de microrganismos resistentes aos antibióticos comumente utilizados (ESSAWI; SROUR, 2000). Ao mesmo tempo, a sociedade ocidental está enfrentando a tendência do consumismo “verde” (SMID; GORRIS, 1999), desejando menos aditivos alimentares sintéticos e produtos com menor impacto sobre o meio ambiente.

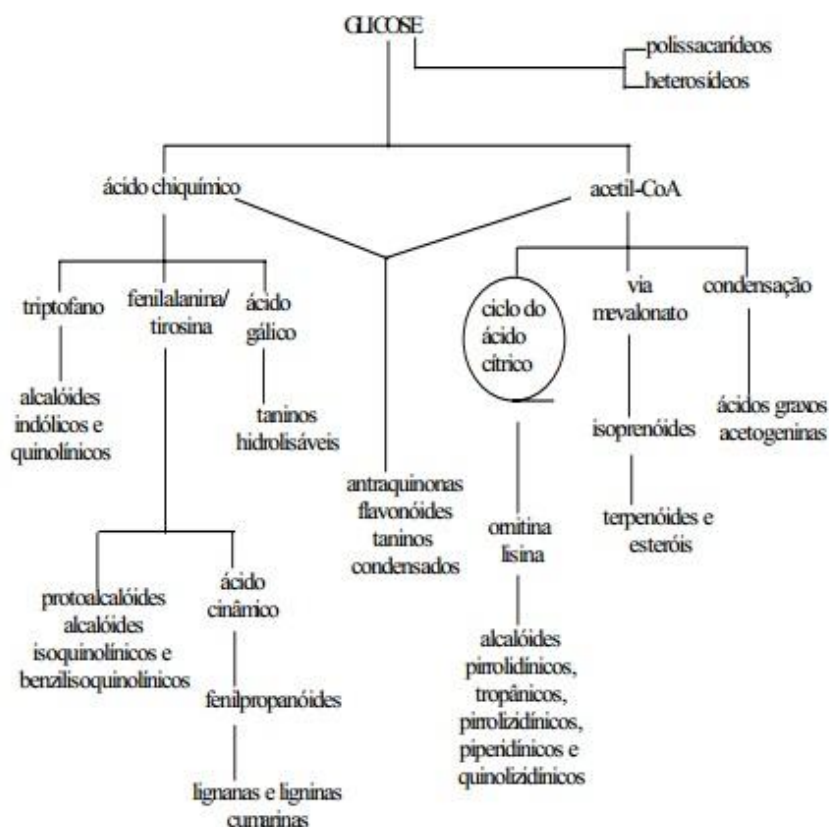
2.5 Óleos essenciais

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

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

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato, e origina os aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Exemplos de componentes aromáticos originados do metabolismo secundário são os fenilpropanóides, que derivam do ácido cinâmico, originado da fenilalanina a partir da ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) e apresentam uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligados ao anel aromático (Figura 2) (SANTOS, 2004).

Figura 2 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: Santos (2004).

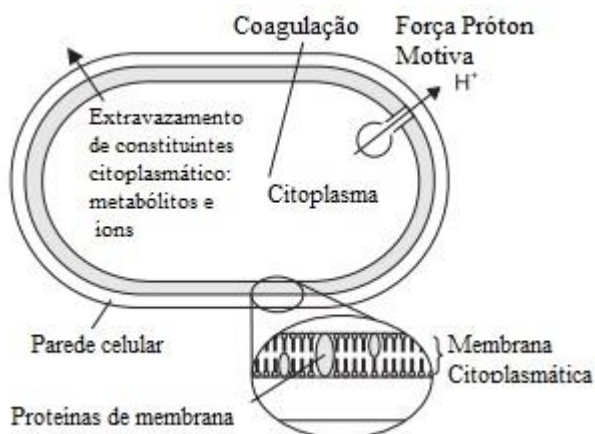
Na natureza, os óleos essenciais exercem importante papel na proteção das plantas, tendo ação antibacteriana, antiviral, antifúngica, inseticida e também contra herbívoros. Podem agir também atraindo insetos para favorecer a dispersão de polens e sementes ou repelir aqueles indesejáveis. Pelas propriedades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

2.5.1 Mecanismo de ação dos óleos essenciais

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais nas células bacterianas (Figura 3) são danos estruturais e funcionais à membrana citoplasmática (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994). Como são tipicamente lipofílicos, os óleos essenciais se acumulam na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, conferindo característica de permeabilidade (BAKKALI et al., 2008; SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994). A permeabilidade das membranas celulares é dependente da sua composição e da hidrofobicidade dos solutos que a atravessam (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995), de maneira que a resistência bacteriana a óleos essenciais parece estar relacionada à habilidade de partição dos componentes dos mesmos na fase lipídica da membrana (LAMBERT et al., 2001).

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

Figura 3 - Mecanismo de ação dos óleos essenciais



Fonte: Burt (2004).

2.5.2 *Syzygium aromaticum* Thumb.

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

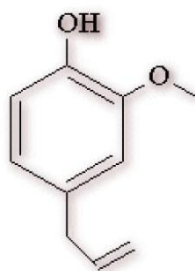
No Brasil, praticamente apenas na Bahia, na região do Baixo Sul (Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha), esta especiaria é produzida na forma comercial (FRAIFE-FILHO; CÉSAR; RAMOS, 2005).

O cravo é conhecido por ser uma planta medicinal que é utilizada como expectorante, antiemético, estimulante, antiflatulento e para o tratamento da dispepsia. É também utilizado como anódino e antisséptico, em odontologia. O óleo extraído do cravo contém propriedades anti-helmínticas, analgésicas, antibacterianas, antifúngicas e anticarcinogênicas (ZHENG; KENNEY; LAM, 1992). É muito utilizado também como condimento na culinária, devido ao seu marcante aroma e sabor, conferido por um composto fenólico volátil, o eugenol. Nas folhas, ele chega a representar, aproximadamente, 95% do óleo extraído (RAINHA et al., 2001).

2.5.3 Eugenol

O eugenol (Figura 4) é um composto fenólico volátil e é o principal constituinte do óleo extraído do cravo (MAZZAFERA, 2003). É um derivado de fenilpropanoides, sendo quimicamente designado como 4-alil-2-metóxi-fenol ou 2-metoxi-4-(2-propenil-fenol), conhecido comumente como essência de cravo. Apresenta baixa solubilidade em água e é completamente solúvel em clorofórmio, álcool etílico, gordura e éter. Por ser lipofílico é rapidamente absorvido (ESCOBAR, 2002), sendo capaz de penetrar as membranas biológicas e atingir alvos intracelulares, como as mitocôndrias, onde inibe a oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), diminuindo os níveis de ATP (USTA et al., 2002).

Figura 4 - Estrutura molecular do eugenol.



ESTRUTURA PLANA

Fonte: Eugenol (2017).

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. J. de; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.
- AUDIA, J. P.; WEBB, C. C.; FOSTER, J. W. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 291, n. 2, p. 97-106, 2001.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 1, p. 73-78, 2004.
- BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, p. 31-37, 2005.
- BREYERS, J. D.; RATNER, D. B. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News**, New York, v. 70, n. 5, p. 232-237, Jan. 2004.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 3, n. 94, p. 223-253, 2004.
- CHAO, M. R. et al. Assessing the prevalence of *Salmonella enterica* in poultry hatcheries by using hatched eggshell membranes. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n. 8, p. 1651-1655, 2007.
- CHAPMAN, J. S. Desinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 51, p. 271-276, 2003.
- CHARACKLIS, W. G. Laboratory biofilm reactors. In: CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (Ed.). **Biofilms**. New York: J. Wiley, 1990. p. 55-89.
- COSTERTON, J. W.; WILSON, M. Introducing biofilms. **Biofilms**, London, v. 1, p. 1-4, May 2004.
- DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 4, p. 847-867, Dec. 2000.
- DAVIDSON, P. M.; HARRISON, M. A. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. **Food Technology**, Oxford, v. 56, n. 11, p. 69-78, Nov. 2003.
- DUGUID, J. P.; ANDERSON, E. S.; CAMPBELL, I. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, London, v. 92, n. 1, p. 107-138, 1966.

- ESCOBAR, R. G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas: ventajas y esventajas de su uso. **Revista Cubana de Estomatología**, Ciudad de la Habana, v. 39, n. 2, mayo/ago. 2002. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200005>. Acesso em: 10 mar. 2017.
- ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 70, n. 3, p. 343-349, 2000.
- EUGENOL. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/eugenol/>>. Acesso em: 21 ago. 2017.
- FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. The EPS matrix: the house of biofilm cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, p. 7945-7947, Nov. 2007.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 9, p. 623-633, Sept. 2010.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- FRAIFE-FILHO, G. A.; CÉSAR, J. O.; RAMOS, J. V. **Cravo-da-india**. Brasília, DF: CEPLAC, 2005. Radar Técnico. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2017.
- FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.
- FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ. **Manual de procedimentos para determinação da suscetibilidade antimicrobiana em enterobactérias**. Rio de Janeiro, 2005. 1 CD-ROM.
- GAYLARDE, C. C.; MORTON, L. H. G. Deteriogenic biofilms on buildings and their control: a review. **Biofouling**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 59-74, 1999.
- GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 98-110, 2002. Supplement 1.
- GONZALEZ-GIL, F. et al. Expression of hila in response to mild acid stress in *Salmonella enterica* is serovar and strain dependent. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 77, n. 5, p. M292-M297, May 2012.
- GUIBAUD, G. et al. Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 48-54, 2008.
- JAY, J. M. I. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.
- KREPSKY, N. et al. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. **Current Microbiology**, New York, v. 46, n. 4, p. 280-286, 2003.

- 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, n. 3, p. 453-462, 2001.
- LANDAU, E.; SHAPIRA, R. Effects of subinhibitory concentrations of menthol on adaptation, morphological, and gene expression changes in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 15, p. 5361-5367, Aug. 2012.
- LANGSRUD, S. et al. Bacterial disinfectant resistance: a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 51, n. 4, p. 283-290, 2003.
- LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, London, v. 24, p. 281-287, 2007.
- LEHNER, A. et al. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 11, p. 2287-2294, 2005.
- LEVIN, B. R. Noninherited resistance to antibiotics. **Science**, Washington, v. 305, p. 1578-1579, 2004.
- LEVIN, B. R.; ROZEN, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 556-562, 2006.
- LIMA, I. de O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-india e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 231-238, jun. 2003.
- MCLANDSBOROUGH, L. et al. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. **Food Biophysics**, New York, v. 1, n. 2, p. 94-114, 2006.
- MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.
- MILLEZI, F. M. et al. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 32, n. 3, p. 351-359, 2012.
- NITSCHKE, M. **Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 2006. Projeto de pesquisa.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 49-79, Oct. 2000.

- OLIVEIRA, M. M. M. de et al. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 97-106, 2010a.
- OLIVEIRA, M. M. M. de et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 549-553, 2010b.
- PARKAR, S. G.; FLINT, S. H.; BROOKS, J. D. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 110-116, 2004.
- PARSEK, M. R.; FUQUA, C. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 14, p. 4427-4440, July 2004.
- PAULUS, W. **Microbicides for the protection of materials**. Boca Raton: Chapman & Hall, 1993.
- PERESI, J. T. M. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1-13, 1998.
- POULSEN, L. V. Microbial biofilm in food processing. **LWT-Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 32, n. 6, p. 321-326, 1999.
- RAINA, V. K. et al. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 16, n. 5, p. 334-336, 2001.
- RAZATOS, A. et al. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 19, p. 11059-11064, 1998.
- REN, D.; SIMS, J. J.; WOOD, T. K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, p. 293-299, Jan. 2002.
- RUSSELL, A. D. Do biocides select for antibiotic resistance? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 52, p. 227-233, 2000.
- RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the response of microorganisms to biocides. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 52, p. 750-763, 2003.
- SANDER, J. E. et al. Investigation of resistance of bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 46, n. 4, p. 997-1000, 2002.
- SANTOS, L. R. dos et al. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 247-250, 2001.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2004. p. 467-495.

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

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

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2004. p. 467-495.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.

SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M. Natural antimicrobials for food preservation. In: RAHMAN, M. S. (Ed.). **Handbook of food preservation**. New York: M. Dekker, 1999. p. 285-308.

TUNON, G. I. L. et al. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* sp isolada de carne de frango resfriada comercializada em Aracaju, Sergipe. **BEPA-Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 5, n. 52, p. 4-6, 2008.

USTA, J. et al. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 935-940, 2002.

VEENING, J. W. et al. Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 8, p. 3099-3109, 2006.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.

WEBB, J. S.; GIVSKOVY, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 578-585, 2003.

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

CAPÍTULO 2 Adaptação e adaptação cruzada de células planctônicas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ao óleo essencial de cravo-da-índia, eugenol, quaternário de amônio e ácido láctico

RESUMO

A *Salmonella* Enteritidis é um agente patogênico de origem alimentar altamente prevalente e persistente e, conseqüentemente, uma das principais causas de doenças gastrintestinais não tifoides em todo o mundo. Apesar de a ação dos óleos essenciais e seus componentes majoritários já estar bem elucidada diante da *Salmonella* Enteritidis, são necessárias mais pesquisas para estudar as respostas desses microrganismos, quando submetidos às concentrações subletais dos óleos essenciais e seus componentes majoritários. O objetivo, nesta pesquisa, foi avaliar a resposta adaptativa de células planctônicas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis S64 ao óleo essencial de cravo, seu componente majoritário eugenol e ao sanificante quaternário de amônio. Para a avaliação da adaptação, primeiramente foi realizada a análise das concentrações mínimas bactericidas (CMB) do óleo essencial de cravo, seu componente majoritário eugenol nas concentrações de 0,5; 0,9; 1,9; 3,9; 7,8; 15,6; 31,2 e 62,5 mg.mL⁻¹ e do quaternário de amônio nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 0,9; 1,9 mg.mL⁻¹, que foram determinadas empregando-se a técnica de microdiluição em caldo em placas de poliestireno de 96 cavidades. Em todo o experimento, os antimicrobianos foram homogeneizados em caldo BHI, com adição de 0,5% (v/v) de Tween 80. O crescimento bacteriano foi verificado por plaqueamento após incubação das culturas durante 24 horas. Para adaptação, utilizou-se a concentração subletal de 1/8 CMB dos antimicrobianos, a 37 °C, por 6 horas. Para a indução de resistência direta, ou seja, submetido à concentração subletal e, posteriormente, exposto ao mesmo antimicrobiano, não foi observada a adaptação; as CMB se mantiveram as mesmas. Entretanto, foi observada adaptação cruzada de *S. Enteritidis* entre o óleo essencial de cravo e eugenol ao pH, tendo os microrganismos passado a crescer em pH 4,5 e 5,0, respectivamente. Também foi observada a adaptação cruzada entre o componente majoritário eugenol e o sanificante quaternário de amônio. Pode-se concluir que não foi observado o aumento da tolerância direta de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis S64 ao óleo essencial de cravo, ao eugenol ou ao sanificante quaternário de amônio. Houve desenvolvimento da tolerância cruzada ao sanificante quaternário de amônio após exposição de *S. Enteritidis* ao eugenol, e ao pH após adaptação das células ao óleo essencial de cravo e ao eugenol.

Palavras-chave: Células planctônicas. Cravo. *Salmonella* Enteritidis. Eugenol. Adaptação.

ABSTRACT

Salmonella Enteritidis is a highly prevalent and persistent foodborne pathogen and, consequently, a major cause of non-typhoid gastrointestinal diseases worldwide. Although the action of essential oils and their major components is already well elucidated with *Salmonella* Enteritidis, more research is needed to study the responses of these microorganisms when subjected to the sublethal concentrations of essential oils and their major components. The objective, in this research, was to evaluate the adaptive response of planktonic cells of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis S64 to clove essential oil, its major component eugenol and the quaternary ammonium sanitizer. In order to evaluate the adaptation, we firstly analyzed the clove essential oil minimum bactericidal concentrations (MBC) and its major compound eugenol at concentrations of 0.5; 0.9; 1.9; 3.9; 7.8; 15.6; 31.2 and 62.5 mg.mL⁻¹ and the quaternary ammonium at concentrations of 0.1; 0.2; 0.5; 0.9; 1.9 mg.mL⁻¹, which were determined using the broth microdilution in 96-well polystyrene plates. Throughout the experiment the antimicrobials were homogenized in BHI broth, added with 0.5% (v / v) Tween 80. Bacterial growth was verified by plating after the cultures incubation for 24 hours. For the adaptation, the sublethal concentration of 1/8 MBC of the antimicrobials was used, at 37 ° C, for 6 hours. For direct resistance induction, that is, subjected to sublethal and then exposed to the same antimicrobial concentrations, there was no adaptation, the MBC remained the same. However, cross-adaptation of *S. Enteritidis* between clove essential oil and eugenol at pH was observed, and the microorganisms grew at pH 4.5 and 5.0, respectively. Cross-matching between the majoritarian component eugenol and the quaternary ammonium sanitizer was also observed. It can be concluded that increased direct tolerance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis S64 to clove essential oil, eugenol or the quaternary ammonium sanitizer was not observed. There was a development of cross tolerance to the quaternary ammonium sanitizing agent after exposure of *S. Enteritidis* to eugenol and pH after adaptation of the cells to the essential oil of carvo and eugenol.

Keywords: Essential oil. *Salmonella*. Pathogenic microorganism. Acid stress. Adaptation.

1 INTRODUÇÃO

Seguindo a descoberta e a ampla aplicação de agentes antibacterianos, a morbidade e a mortalidade da população causadas por infecções bacterianas foram consideravelmente reduzidas. Entretanto, novo desafio surge devido ao crescente aumento da resistência bacteriana à maioria dos agentes antimicrobianos existentes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS, 2017). Somado a esse cenário, observa-se também o aumento da tolerância das bactérias aos agentes sanitizantes empregados na indústria e na produção de alimentos. Dentre as várias bactérias que têm sido associadas ao aumento de persistência em ambientes de processamento destaca-se *Salmonella*.

O gênero *Salmonella* spp. tem duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, seis subespécies e 2.637 sorotipos (FABRE et al., 2014). É amplamente distribuída, sendo associada a diversos surtos de toxinfecções alimentares. Segundo dados do CDC (Foodborne Outbreak Online Database), entre 2005 e 2015, nos EUA, foram registrados 1.449 surtos, com 39.429 pessoas, envolvendo *Salmonella* spp. No Brasil, dados epidemiológicos do Ministério da Saúde e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária mostram que, entre 2007 e 2016, dentre os surtos de toxinfecções alimentares envolvendo bactérias, *Salmonella* spp. se destaca como o principal agente causador de doença veiculada por alimentos (BRASIL, 2017).

Salmonella enterica subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis se destaca dentre os vários sorotipos por estar associada à maioria dos surtos de toxinfecções causados por estirpes não tifoides (GONZALEZ-GIL et al., 2012).

A higienização dos equipamentos e utensílios é empregada com o objetivo de garantir a segurança e a qualidade dos alimentos, sendo a sanificação uma etapa crucial em que diversos agentes antimicrobianos podem ser utilizados. Contudo, muitas vezes, essas substâncias são utilizadas erroneamente, expondo os microrganismos constantemente a concentrações subletais, induzindo ao aumento de tolerância ou de adaptação da bactéria a esses agentes estressores. Além disso, a maioria dos antimicrobianos, conservantes e sanitizantes empregados na produção de alimentos tem sido utilizada por cerca de 50 a 100 anos, sendo consenso o número crescente de microrganismos patogênicos que vem desenvolvendo resistência a esses componentes (DAVIDSON; HARRISON, 2002).

Devido a essa necessidade de novos antimicrobianos, o interesse por componentes antimicrobianos naturais tem aumentado. Neste contexto, destacam-se os óleos essenciais, substâncias sintetizadas por vias metabólicas secundárias de plantas. Os óleos essenciais podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente

odoríferas e líquidas. Estão presentes em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (BURT, 2004).

Os óleos essenciais e seus componentes majoritários vêm sendo utilizados nas indústrias de alimentos, principalmente como aromatizantes, porém, por apresentarem efeito antibacteriano, a atual preocupação é a possibilidade de que eles possam induzir mecanismos de adaptação nos microrganismos, se empregados em doses subletais como conservantes e ou sanificantes (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015).

Vários óleos essenciais exercem ação biocida sobre *Salmonella*. Os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* e *Mentha piperita* promoveram halo de inibição sobre *S. Enteritidis* S64 a partir da concentração de 3,9 e 7,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (OLIVEIRA; SOARES; PICCOLI, 2013; VALERIANO et al., 2012). Já a concentração mínima bactericida do óleo essencial de cravo sobre *S. enterica* 444 foi de 0,075% (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998). Como os óleos essenciais, seus componentes também têm sido estudados, apresentando também atividade bactericida. Vários isolados de alimentos de *Salmonella* Typhimurium testados contra eugenol, componente majoritário do óleo essencial de cravo, apresentaram concentrações mínimas bactericidas variando de 512 a 1.024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MILADI et al., 2017). Dessa forma, ressalta-se que os óleos essenciais e seus componentes majoritários são promissores agentes sanificantes e conservantes. Entretanto, após estudos mostrando a potencialidade da utilização de substâncias antimicrobianas, é imprescindível determinar se elas poderão ou não levar à adaptação ou adaptação cruzada.

A adaptação dos microrganismos a baixas temperaturas, a ácidos fracos, a baixo pH e à pressão osmótica já é bem conhecida (BEALES, 2004), contudo, essa relação com os óleos essenciais ou seus componentes ainda é pouco estudada.

Em alguns estudos tem sido demonstrado que os óleos essenciais e seus componentes majoritários não promovem a adaptação de bactérias a eles. Apolônio et al. (2014) demonstraram que *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* foram incapazes de se adaptarem ao eugenol e ao citral, mesmo após sucessivas exposições a concentrações subletais desses componentes. Isolados enterotoxigênicos de *Staphylococcus aureus* de alimentos não se adaptaram ou desenvolveram adaptação cruzada a cloreto de sódio e de potássio e aos ácidos láctico e acético, após exposição a concentrações subletais do óleo essencial de *Origanum vulgare* (TAVARES et al., 2015). Todavia, Nostro et al. (2017) mostraram a capacidade de duas das quatro cepas testadas de *S. aureus* em se adaptarem ao carvacrol, mas não foram capazes de desenvolver adaptação cruzada a cinamaldeído, a

eugenol e a antibióticos. Em estudo realizado com *Listeria monocytogenes* foi demonstrado que a bactéria desenvolveu adaptação e adaptação cruzada ao eugenol e ao carvacrol (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015).

Diante do exposto, o objetivo, neste estudo, foi avaliar a capacidade de adaptação e adaptação cruzada de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ao óleo essencial de cravo-da-índia, ao seu componente majoritário eugenol, ao sanificante quaternário de amônio e ao estresse ácido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

2.1 Agentes antimicrobianos

O óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) extraído dos botões (80,64% eugenol) foi adquirido da FERQUIMA[®] Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) e o componente majoritário eugenol (98,5%) foi adquirido da Sigma-Aldrich[®] (eugenol, 2-Methoxy-4-(2-propenyl) phenol (E51791)). O sanificante quaternário de amônio utilizado foi SANDET 666[®] (quaternário de amônio, nonil fenol etoxilado 9,5 moles).

2.2 Microrganismo, manutenção e padronização do inóculo

A cepa utilizada foi *Salmonella enterica* serovar Enteritidis S64, fornecida pelo Laboratório do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), a qual foi mantida a -18 °C, em meio de congelamento (glicerol, 15 mL; peptona bacteriológica, 0,5 g; extrato de levedura, 0,3 g; Na Cl, 0,5 g e água destilada, 100 mL).

Para ativação da cepa, alíquotas de 10 µL da cultura estoque foram transferidas para tubos contendo 3 mL de caldo *brain heart infusion* (BHI) e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após incubação, alíquotas de 200 µL foram transferidas para frascos erlenmeyer contendo 150 mL de caldo BHI e incubadas, a 37 °C, até atingirem 10⁸ UFC.mL⁻¹. O crescimento foi acompanhado por absorbância em espectrofotômetro (DO_{600nm}) e contagem em placas em *triptone soy agar* (TSA).

2.3 Determinação da concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida das células planctônicas

As concentrações mínimas inibitórias (CMI) do óleo essencial de cravo (OEC), do seu componente majoritário eugenol e do quaternário de amônio (QA) foram determinadas empregando-se a técnica de microdiluição, em microplacas de 96 cavidades, de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (M7-A6) (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2003), com adaptações. Soluções contendo caldo BHI, 0,5% de Tween 80 e OEC ou eugenol, nas concentrações de 0,0; 0,5; 0,9; 1,9; 3,9; 7,8; 15,6; 31,2 e 62,5 mg.mL⁻¹, e caldo BHI e quaternário de amônio (QA), nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 0,9; 1,9 mg.mL⁻¹, foram testadas. Em cada cavidade das microplacas foram adicionados 140 µL das soluções e 10 µL da cultura padronizada com incubação a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, a absorbância (DO_{620 nm}) foi lida em leitor de microplacas e determinada a concentração mínima inibitória (menor concentração em que não se observou alteração da absorbância após a incubação) dos antimicrobianos. Foram realizados três controles, sendo dois controles negativos (caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e antimicrobiano, e caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80, inóculo e 0,012% de clorexidina) e um controle positivo (caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e inóculo).

Para a determinação da concentração mínima bactericida (CMB), após a leitura da absorbância, alíquotas de 10 µL das culturas, dos poços nos quais não foi observado crescimento, foram plaqueadas em TSA e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. A CMB foi a menor concentração de antimicrobiano na qual não foi observado crescimento em placa, após incubação.

As análises foram realizadas em triplicata e três repetições.

2.4 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório das células planctônicas

A influência do pH no crescimento de *S. Enteritidis* foi avaliada em microplacas de poliestireno com 96 cavidades. Em cada cavidade foram adicionados 140 µL de caldo BHI, com pH previamente ajustado com ácido láctico (98%) para 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0. Após adição do meio de cultura, 10 µL de cultura padronizada foram adicionados em cada

poço, sendo as microplacas incubadas, a 37 °C, por 24 horas. A absorbância ($DO_{620\text{ nm}}$) foi lida em leitor de microplacas.

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

2.5 Adaptação de *Salmonella* Enteritidis a concentrações subletais de óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio

Células de *Salmonella* Enteritidis foram expostas a concentrações subletais de óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio. Foram utilizadas as concentrações subletais de 1/8 CMB de cada antimicrobiano (LUNDÉN et al., 2003), com adaptações. Em tubos contendo 10 mL de caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 foram adicionados os antimicrobianos nas concentrações subletais de 0,49 mg.mL⁻¹ de OEC e de eugenol ou 0,11 mg.mL⁻¹ de QA. Após homogeneização, alíquotas de 1 mL de cultura padronizada foram inoculadas e os tubos foram incubados, a 37 °C, por 6 horas. Após incubação, as culturas foram centrifugadas a 5.000 x g, por 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células lavadas e ressuspendidas em solução de NaCl 0,85% (m/v). As suspensões foram padronizadas em, aproximadamente, 10⁸ UFC.mL⁻¹, utilizando-se o padrão de turvação de 0,5 da escala de MacFarland. As células recuperadas foram denominadas adaptadas.

2.6 Indução de *Salmonella* Enteritidis ao estresse ácido

Alíquotas de 1 mL da cultura padronizada foram transferidas para 10 mL de caldo BHI com pH mínimo de crescimento (pH 5,5), previamente ajustado com ácido láctico (98%) e incubado, a 37 °C, por 6 horas. Em seguida, a cultura foi centrifugada (5.000 x g por 5 min), o sobrenadante descartado e as células lavadas e ressuspendidas em solução de NaCl 0,85% (m/v). A suspensão foi padronizada em, aproximadamente, 10⁸ UFC. mL⁻¹, utilizando-se o padrão de turvação de 0,5 da escala de MacFarland. As células recuperadas foram denominadas adaptadas ao estresse ácido. O controle foi realizado com células de *S. Enteritidis* crescidas em caldo BHI não acidificado (pH 7,4).

2.7 Avaliação da adaptação de *Salmonella* Enteritidis ao óleo essencial de cravo, eugenol, quaternário de amônio e resposta à tolerância ácida

Após a exposição das células de *S. Enteritidis* aos agentes estressores em concentração subletal (1/8 da CMB), as células adaptadas foram cultivadas em presença do mesmo agente estressor, nas concentrações de 0,5xCMB; CMB; 1,5xCMB; 2,0xCMB e 2,5xCMB.

Alíquotas de 10 µL das suspensões de células adaptadas foram transferidas para as cavidades das microplacas contendo soluções de 140 µL de caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e de OEC ou eugenol, nas concentrações de 1,95; 3,9; 5,85; 7,8; 9,75 mg.mL⁻¹. Alíquotas de 10 µL da suspensão celular adaptada ao QA foram inoculadas em solução de caldo BHI e QA nas concentrações de 0,045; 0,9; 1,35; 1,8; 2,25 mg.mL⁻¹. As microplacas foram incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após incubação, alíquotas de 10 µL das culturas foram plaqueadas em TSA pela técnica de microgotas e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. As células de *S. Enteritidis* foram classificadas como capazes de se adaptarem quando houve crescimento em placas em concentrações iguais ou maiores que a CMB. Paralelamente, realizou-se o mesmo procedimento com células de *S. Enteritidis* não expostas a concentrações subletais, possibilitando a comparação entre células expostas e não expostas, quanto à susceptibilidade aos componentes.

A adaptação ao estresse ácido foi avaliada pela inoculação de alíquotas de 10 µL de cultura padronizada de células adaptadas para as cavidades das microplacas adicionadas de 140 µL de caldo BHI com pH ajustado previamente, com solução de ácido láctico 98% (m/v), para 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0. As microplacas foram incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após incubação, foi realizado o plaqueamento em TSA, empregando-se a técnica de microgotas e incubação, a 37 °C, por 24 horas. Considerou-se a capacidade de as células de *S. Enteritidis* desenvolverem tolerância ácida quando houve crescimento em pH inferior ao pH mínimo de crescimento. Células não adaptadas foram utilizadas como controle.

2.8 Avaliação da adaptação cruzada entre óleo essencial de cravo e eugenol ao quaternário de amônio

Alíquotas de 10 µL das suspensões padronizadas (10⁸ UFC mL⁻¹) de *S. Enteritidis* adaptadas a concentrações subletais (1/8 CMB: 0,49 mg.mL⁻¹) de OEC e eugenol foram inoculadas nos poços das microplacas contendo 140 µL de caldo BHI, o qual continha quaternário de amônio nas concentrações de 0,5xCMB; CMB; 1,5xCMB; 2,0xCMB e

2,5xCMB, respectivamente, 0,045; 0,9; 1,35; 1,8; 2,25 mg.mL⁻¹. As placas foram incubadas, a 37 °C, por 24 horas e a absorvância (DO_{620 nm}) determinada.

2.9 Avaliação da adaptação cruzada entre óleo essencial de cravo, eugenol, quaternário de amônio e estresse ácido

Alíquotas de 10 µL das suspensões padronizadas (10⁸ UFC mL⁻¹) de células de *S. Enteritidis* previamente adaptadas a concentrações subletais de 1/8 CMB de OEC, eugenol (0,49 mg.mL⁻¹) e quaternário de amônio (0,11 mg.mL⁻¹) foram inoculadas nos poços das microplacas contendo 140 µL de caldo BHI com pH previamente ajustado para 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0, com ácido láctico (98%) e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após incubação, alíquotas de 10 µL das culturas foram plaqueadas em TSA. Considerou-se a capacidade de *S. Enteritidis* desenvolver adaptação cruzada pelo crescimento em placa após exposição ao pH abaixo do pH mínimo de crescimento.

2.10 Avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e óleo essencial de cravo, eugenol, quaternário de amônio

Após adaptação ao pH mínimo de crescimento (5,5), alíquotas de 10 µL das suspensões padronizadas de *S. Enteritidis* foram inoculadas nos poços das microplacas contendo 140 µL de caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e de OEC e eugenol. Para o quaternário de amônio foram utilizadas soluções em caldo BHI nas concentrações de 0,5xCMB; CMB; 1,5xCMB; 2,0xCMB e 2,5xCMB. As microplacas foram incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, o crescimento da cultura foi avaliado pelo plaqueamento em TSA, com incubação, a 37 °C, por 24 horas. Considerou-se a capacidade de adaptação cruzada de *S. Enteritidis* pelo seu crescimento em placas após cultivo em soluções contendo antimicrobiano nas concentrações iguais ou acima da CMI.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida das células planctônicas

Os valores de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos antimicrobianos estão expressos na Tabela 1. A inibição do crescimento de *S. Enteritidis* evidencia o efeito antimicrobiano do OEC, eugenol e quaternário de amônio.

Tabela 1 - Concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio sobre *Salmonella* Enteritidis.

Antimicrobianos	CMI (mg.mL ⁻¹)	CMB (mg.mL ⁻¹)
OEC	1,9	3,9
EUG	3,9	3,9
QA	0,9	0,9

OEC: óleo essencial de cravo; EUG: eugenol; QA: quaternário de amônio.

Fonte: Da Autora (2017).

Avaliando-se a ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo observa-se que a CMB (3,9 mg.mL⁻¹) foi 2,05 vezes maior que a CMI (1,9 mg.mL⁻¹). O óleo essencial utilizado neste experimento foi caracterizado por Souza (2016) como tendo uma concentração de eugenol de 80,64%. Comparando-se os resultados entre as CMI do OEC e do eugenol (3,9 mg.mL⁻¹) observa-se que sua concentração inibitória do eugenol foi 2,05 vezes maior que a do OEC. Em se tratando de custos este resultado é favorável, uma vez que o OEC tem um custo mais baixo que o EUG.

O óleo essencial de cravo tem mostrado atividade antimicrobiana sobre vários sorotipos de *Salmonella*, sendo encontradas variações entre os valores de CMI. Em trabalho realizado por Thanissery, Kathariou e Smith (2014), os sorotipos de *S. Heidelberg*, *S. Montevideo* e *S. Enteritidis* apresentaram CMI de 0,6; 1,5 e 1,5 mg.mL⁻¹, respectivamente. Já para *S. Enteritidis* 444, a CMI e a CMB do óleo foram, respectivamente, de 0,4 e 0,75 mg.mL⁻¹ (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998). Dessa forma, os resultados obtidos para o sorotipo *S. Enteritidis* S64, utilizado neste trabalho, corroboram os resultados encontrados na literatura, com CMI menor que a CMB.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido atribuída aos seus componentes majoritários, entretanto, foi observado que, para *S. Enteritidis* S64, a atividade inibitória do eugenol (CMI: 3,9 mg.mL⁻¹) foi menor que a do óleo essencial (CMI: 1,9 mg.mL⁻¹), considerando que esse componente está na concentração de 1,53 mg.mL⁻¹ na solução. Esses resultados mostram que a ação inibitória do óleo essencial não se dá apenas pelo eugenol, mas também por outros componentes presentes no óleo. De acordo com Oliveira et al. (2009), também podem ser encontrados o β-cariofileno e o acetato de eugenila, quando esse óleo é extraído dos botões do cravo, diferente de CMI e CMB que parecem ser devido, principalmente, ao eugenol.

A CMB do quaternário de amônio foi de 0,9 mg.mL⁻¹, sendo a recomendação do fabricante a utilização de soluções a 3%, ou seja, 30 mg.mL⁻¹. Dessa forma, a estirpe de *S. Enteritidis* utilizada neste trabalho foi sensível ao produto.

3.2 Adaptação de *Salmonella* Enteritidis ao óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio

Não foi observada capacidade de *S. Enteritidis* em aumentar sua tolerância aos agentes antimicrobianos após sua adaptação a concentrações subletais (1/8 CMB) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resposta adaptativa de *S. Enteritidis* ao óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio.

Fator subletal	Tolerância ao fator letal (mg.mL ⁻¹)				
	1,95	3,9	5,85	7,8	9,75
Controle	+	-	-	-	-
OEC	+	-	-	-	-
EUG	+	-	-	-	-
	0,045	0,9	1,35	1,8	2,25
Controle	+	-	-	-	-
QA	+	-	-	-	-

OEC: óleo essencial de cravo; EUG: eugenol; QA: quaternário de amônio.

(+) crescimento visível em placas; (-) ausência de crescimento em placas.

Fonte: Da Autora (2017).

Resultados semelhantes são encontrados na literatura, em que *S. Typhimurium* não desenvolveu tolerância ao óleo essencial de alecrim e aos componentes majoritários 1,8-

cineol, carvacrol, timol, eugenol e citral, após exposição a concentrações subletais desses antimicrobianos (SOUZA, 2016). *S. aureus* e *L. monocytogenes* também não foram capazes de desenvolver tolerância direta ao eugenol (APOLÓNIO et al., 2014). Entretanto, a capacidade de adaptação direta de dois de quatro isolados de *S. aureus* ao carvacrol foi mostrada por Nostro et al. (2017). *S. Typhimurium* ATCC 13311 e *S. Enteritidis* ATCC 13076 também foram capazes de se adaptar aos óleos essenciais de orégano, tomilho e *tea tree* (MELO et al., 2015).

3.3 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório e indução de estresse ácido na *Salmonella* Enteritidis

O pH mínimo de crescimento (pH_{MC}) e o pH mínimo inibitório (pH_{MI}) de *S. Enteritidis* em caldo BHI em presença de ácido láctico (pK_a 3,86) foram de 5,5 e 5,0, respectivamente.

O pH mínimo de crescimento das bactérias varia de acordo com os fatores intrínsecos do alimento ou o meio de cultura, sendo influenciado também pelo tipo de ácido presente. O pH mínimo de crescimento para *S. Anatum*, *S. Senftenberg* e *S. Tennessee* em meio de cultivo contendo diferentes tipos de ácido variou de 4,06 a 5,4, em presença de ácido cítrico e acético, respectivamente. Para ácido láctico, o pH_{MC} foi 4,4 (CHUNG; GOEPFERT, 1970). Sabe-se que pHs ácidos devido à presença de ácidos fracos causam maior estresse às bactérias do que os ácidos fortes, uma vez que a forma não dissociada do ácido fraco permeia a membrana citoplasmática e se dissocia no citoplasma, levando ao acúmulo de ânions e prótons, à depleção de energia, à queda do pH citoplasmático, à coagulação do citoplasma e à morte da célula (BRUL; COOTE, 1999).

Salmonella Enteritidis desenvolveu tolerância ao ácido láctico, crescendo em pH 4,5 e 5,0, valores antes inibitórios.

A capacidade de adaptação ao estresse ácido pelos microrganismos é bem conhecida, entretanto, esse sistema é complexo. Em revisão sobre resposta à tolerância ácida de *S. Typhimurium* é salientado que a chave para a resposta à tolerância ácida é a síntese de várias proteínas induzidas pelo choque ácido, tendo sido identificadas 51 na fase lag e 15 na fase estacionária (FOSTER, 1995). Outro estudo mostra que *S. Typhimurium* tem mudanças na composição proteica de sua membrana externa, tendo a porina OmpC sido detectada. Essa porina também é expressa em casos de estresse osmótico (LEYER; JOHNSON, 1993).

Além da modificação do perfil proteico, na adaptação ao estresse ácido observa-se também alteração da composição dos ácidos graxos da membrana citoplasmática. Estudos mostram que a exposição de *Salmonella enterica* ao ácido lático leva ao decréscimo da fluidez de sua membrana, levando à maior resistência ao calor e a agentes ácidos devido à diminuição entre a taxa de ácidos graxos insaturados e saturados (YOON et al., 2015).

3.4 Avaliação da adaptação cruzada entre óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio

A capacidade de adaptação cruzada ao sanificante quaternário de amônio de *S. Enteritidis* adaptado ao óleo essencial de cravo e ao eugenol está apresentada na Tabela 3. Foi observado que as células submetidas à concentração subletal do óleo essencial de cravo não desenvolveu capacidade de se adaptar ao quaternário de amônio, tornando-se mais sensível ao sanificante, uma vez que não foi observado seu crescimento na concentração de $\frac{1}{2}$ CMB ($0,45 \text{ mg.mL}^{-1}$). Para as células adaptadas ao EUG foi observada a adaptação cruzada ao QA, uma vez que não foi observado crescimento de *S. Enteritidis* em presença de $1,35 \text{ mg.mL}^{-1}$ de QA, valor superior à CMB.

Tabela 3 - Adaptação cruzada ao quaternário de amônio da bactéria *S. Enteritidis* submetida ao estresse subletal causado por óleo essencial de cravo e eugenol.

Fator subletal	Concentração (mg.mL^{-1})	Tolerância ao fator letal (mg.mL^{-1})				
		QA				
		0,45	0,9	1,35	1,8	2,25
OEC	0,49	-	-	-	-	-
EUG	0,49	+	+	-	-	-

OEC: óleo essencial de cravo; EUG: eugenol; QA: quaternário de amônio.

(+) crescimento visível em placas; (-) ausência de crescimento em placas.

Fonte: Da Autora (2017).

O quaternário de amônio, utilizado nesta pesquisa como antimicrobiano controle, é amplamente utilizado como sanificante na indústria de alimentos. Os desinfetantes desempenham papel importante na manutenção dos padrões de saúde aceitáveis, reduzindo significativamente a carga microbiana nas indústrias alimentícias e também são utilizados para reduzir, se não eliminar, os agentes patogênicos (TEZEL; PAVLOSTATHIS, 2015).

Isolados de *Salmonella* têm mostrado resistência a quaternário de amônio, sendo necessário de 2 a 4 vezes mais sanificante do que a dose recomendada pelo fabricante para que haja sua eliminação (CARBALLO; ARAÚJO, 2012). Tem sido demonstrado em estudos que a exposição à QA em concentrações subinibitórias conduz à seleção de bactérias resistentes em comunidade microbiana ou resulta no desenvolvimento ou aquisição de mecanismos de resistência, tais como a modificação da composição da membrana celular, a hidrofobicidade, a sobre-expressão de bombas de e fluxo e a aquisição de integrons e plasmídeos (TEZEL; PAVLOSTATHIS, 2011).

3.5 Avaliação da adaptação cruzada ao estresse ácido de células de *Salmonella* Enteritidis expostas ao óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio

Embora não tenha sido observado aumento de tolerância direta de *S. Enteritidis* ao óleo essencial de cravo, ao eugenol e ao quaternário de amônio, houve indução de tolerância cruzada (Tabela 4) ao pH após adaptação das células a 1/8CMB do óleo essencial de cravo e ao eugenol. O pH_{MI} passou de 5,5 para 5,0 após adaptação de *S. Enteritidis* ao EUG e de 5,5 para 4,5, após adaptação ao óleo essencial de cravo.

Tabela 4 - Resposta adaptativa cruzada de *Salmonella* Enteritidis ao pH, após cultivo em presença de concentrações subletais de óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio.

Fator subletal	Concentração (mg.mL ⁻¹)	pH de cultivo					
		3,0	3,5	4,0	4,5	5,0 ^{1*}	5,5 ^{2*}
OEC	0,49	-	-	-	+	+	+
EUG	0,49	-	-	-	-	+	+
QA	0,11	-	-	-	-	-	+

1*: pH_{MI}; 2*: pH_{MC}; OEC: óleo essencial de cravo; EUG: eugenol; QA: quaternário de amônio.
(+) crescimento visível em placas; (-) ausência de crescimento em placas.

Fonte: Da Autora (2017).

Ao se comparar o aumento da tolerância cruzada ao pH nota-se que, provavelmente, o sinergismo, ou seja, a combinação dos componentes do óleo essencial de cravo, fez com que as células ficassem mais tolerantes. Essa tolerância pode ser observada por meio de mecanismos como a indução da expressão gênica da “resposta de tolerância ao ácido” (ALVAREZ-ORDONEZ et al., 2009).

A análise do proteoma de *Salmonella* Thompson adaptada ao estresse subletal causado por timol mostrou que há mudanças significativas no perfil proteico da bactéria, sendo observado aumento da concentração de chaperones e proteínas chave da síntese *de novo* associadas ao mecanismo de proteção ao estresse térmico. Aumento de proteínas de membrana, envolvidas no mecanismo de resposta ao estresse, também foi observado (DI PASQUA et al., 2010). Aumento significativo na concentração de ácidos graxos insaturados também foi observado após a adaptação de *S. Typhimurium* ao carvacrol e ao eugenol (DI PASQUA et al., 2006).

Os resultados mostram que, apesar de a bactéria não ter desenvolvido tolerância aos antimicrobianos utilizados, ela desenvolveu tolerância cruzada, fato que mostra que os mecanismos de resistência ao estresse aos antimicrobianos e ao estresse ácido estão interligados. Dessa forma, deve-se ter precaução ao utilizar tanto o óleo essencial de cravo como seu componente majoritário em alimentos ou ambientes de processamento, pois a exposição de *S. Enteritidis* a esses antimicrobianos em condições subletais pode levar à persistência dessa bactéria patogênica na indústria e sua sobrevivência em alimentos processados.

4 CONCLUSÃO

Não foi observado o aumento da tolerância direta de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis S64 ao óleo essencial de cravo, ao eugenol e ao quaternário de amônio. As células que foram adaptadas se tornaram mais sensíveis.

Houve o desenvolvimento da tolerância cruzada ao quaternário de amônio após exposição de *S. Enteritidis* ao eugenol.

Foi observado aumento na tolerância de *S. Enteritidis*, quando adaptada ao óleo essencial de cravo e eugenol e posteriormente exposta a diferentes valores de pH.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Comparison of acids on the induction of an Acid Tolerance Response in *Salmonella* Typhimurium, consequences for food safety. **Meat Science**, Barking, v. 81, n. 1, p. 65-70, 2009.
- APOLÓNIO, J. et al. No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 354, n. 2, p. 92-101, 2014.
- BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 1-20, 2004.
- BRASIL. Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado%20vigilancia_doencas_alimentos.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2017.
- BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 1-17, 1999.
- 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.
- CARBALLO, J.; ARAÚJO, A. B. Evaluation of the efficacy of commercial sanitizers against adhered and planktonic cells of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 32, n. 3, p. 606-612, 2012.
- CHUNG, K. C.; GOEPFERT, J. M. Growth of *Salmonella* at low pH. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 35, n. 3, p. 326-328, 1970.
- DAVIDSON, P. M.; HARRISON, M. A. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. **Food Technology**, Oxford, v. 56, n. 11, p. 69-78, Nov. 2002.
- DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, 2006.
- DI PASQUA, R. et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, New York, v. 10, n. 5, p. 1040-1049, 2010.
- FABRE, L. et al. CRISPR is an optimal target for the design of specific PCR assays for *Salmonella enterica* serotypes Typhi and Paratyphi A. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e2671, 2014.

FOSTER, J. W. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. **Critical Reviews in Microbiology**, Cleveland, v. 21, n. 4, p. 215-237, 1995.

GONZALEZ-GIL, F. et al. Expression of *hlaA* in response to mild acid stress in *Salmonella enterica* is serovar and strain dependent. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 77, n. 5, p. M292-M297, May 2012.

LEYER, G. J.; JOHNSON, E. A. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella* Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 6, p. 1842-1847, 1993.

LUNDÉN, J. et al. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 265-272, 2003.

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

MILADI, H. et al. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. **Microbial Pathogenesis**, New York, v. 104, p. 56-63, 2017.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard M7-A6. Wayne, 2003.

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

OLIVEIRA, R. A. de et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

OLIVEIRA, T. L. C. de; SOARES, R. A. de; PICCOLI, R. H. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, Barking, v. 93, n. 3, p. 645-651, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente**. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812>. Acesso em: 29 fev. 2017.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

SOUZA, E. L. The effect of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 56, p. 1-12, 2016.

SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. Adaptation and Cross adaptation of *Listeria monocytogenes* to eugenol and carvacrol compounds. Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 528-533, 2015.

TAVARES, A. G. et al. Habituation of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* to *Origanum vulgare* L. essential oil does not induce direct-tolerance and cross-tolerance to salts and organic acids. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 835-840, 2015.

TEZEL, U.; PAVLOSTATHIS, S. G. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 33, p. 296-304, 2015.

TEZEL, U.; PAVLOSTATHIS, S. G. Role of quaternary ammonium compounds on antimicrobial resistance in the environment. **Antimicrobial Resistance in the Environment**, Alexandria, v. 83, p. 349-387, Dec. 2011.

THANISSERY, R.; KATHARIOU, S.; SMITH, D. P. Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit *Salmonella* and *Campylobacter* in vitro. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 23, n. 2, p. 221-227, 2014.

VALERIANO, C. et al. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 2, p. 673-677, 2012.

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

CAPÍTULO 3 Adaptação e adaptação cruzada de células sésseis de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ao óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio

RESUMO

A contaminação de superfícies e alimentos por microrganismos deterioradores e patogênicos como a *Salmonella* sp. é motivo de preocupação para a indústria alimentícia. As características fisiológicas desses microrganismos podem conferir resistência aos agentes antimicrobianos, como, por exemplo, aos sanificantes utilizados nos procedimentos de higienização ou nos antimicrobianos utilizados na conservação de alimentos. O objetivo, neste estudo, foi avaliar as células sésseis de *Salmonella* Enteritidis S64 quanto à adaptação ao óleo essencial de cravo, ao seu componente majoritário eugenol e ao sanificante quaternário de amônio e também ao estresse ácido, e à adaptação cruzada entre o óleo essencial de cravo e seu componente majoritário, eugenol. Para a avaliação da adaptação, primeiramente, foi realizada a análise das concentrações mínimas bactericidas do biofilme (CMBB) do óleo essencial de cravo, seu componente majoritário, eugenol, nas concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 80 mg.mL⁻¹ e do quaternário de amônio nas concentrações 30; 40; 50; 60; 70 e 80; 90 e 100 mg.mL⁻¹, que foram determinadas empregando-se a técnica de microdiluição em caldo em placas de poliestireno de 96 cavidades. Biofilmes de *S. Enteritidis* foram formados nas cavidades das microplacas pela inoculação de alíquotas de 50 µL de cultura padronizada em 150 µL de BHI e incubadas, a 37 °C, por 48 horas. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (v/v), para a remoção das células não aderidas. Após a formação dos biofilmes, alíquotas de 200 µL de soluções aquosas contendo 0,5% de Tween 80 (v/v) e agentes estressores foram adicionadas nas cavidades. Após 20 minutos de contato, as soluções foram removidas e as cavidades foram lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v). Às cavidades foram adicionados 200 µL de BHI e as microplacas incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Para a adaptação, células de *Salmonella* Enteritidis foram expostas a concentrações subletais de óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio e incubadas, a 37 °C, por 48 horas. Foi realizada a mesma metodologia da determinação da CMBB para avaliação da adaptação. O componente majoritário eugenol induziu resposta adaptativa direta, ou seja, quando o microrganismo é submetido a concentrações subletais de um componente e posteriormente colocado no mesmo. Não foi observada a tolerância do microrganismo ao estresse ácido. Foi observada a adaptação do microrganismo quando submetido à adaptação cruzada entre o óleo essencial de cravo e eugenol. O óleo essencial de cravo e o eugenol foram mais eficientes, quando comparados com o sanificante quaternário de amônio, que é um produto químico geralmente utilizado na indústria de alimentos. Pode-se concluir que óleo essencial de cravo pode ser um potencial sanificante para utilização na indústria de alimentos, uma vez que apresentou ótimos resultados para os testes de adaptação.

Palavras-chave: Cravo. *Salmonella* Enteritidis. Eugenol. Adaptação. Biofilme.

ABSTRACT

Contamination of surfaces and food by deteriorating and pathogenic microorganisms such as *Salmonella* sp. is a concern in the food industry, the physiological characteristics of these microorganisms may confer resistance to antimicrobial agents, such as sanitizers used in hygienic procedures or antimicrobials used in food preservation. The objective of this study was to evaluate the *Salmonella* Enteritidis S64 sessile cells for adaptation to clove essential oil, its major component eugenol and the quaternary ammonium sanitizer as well as acid stress, and the cross-adaptation between the essential oil of clove and its major component, eugenol. For the evaluation of the adaptation, first the analysis of the minimum bactericidal concentrations biofilm (MBCB) of the essential oil of clove was carried out, its compound majoritarian eugenol in the concentrations of 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 and 80 mg.mL⁻¹ and the quaternary ammonium at concentrations 30; 40; 50; 60; 70 and 80; 90 and 100 mg.mL⁻¹, which were determined using the broth microdilution in 96-well polystyrene plates. Biofilms of *S. Enteritidis* were formed in the microplate wells by inoculating aliquots of 50 µL of standard culture into 150 µL of BHI and incubated at 37 ° C for 48 h. After this time the cultures were removed and the wells washed three times with 0.85% (v/v) NaCl solution to remove unbound cells. After formation of the biofilms, 200 µl aliquots of aqueous solutions containing 0.5% Tween 80 (v / v) and stress agents were added into the wells. After 20 minutes contact the solutions were removed and the wells were washed three times with 0.85% NaCl solution (v/v). To the wells were added 200 µl of BHI and the microplates incubated at 37 ° C for 24h. For adaptation, *Salmonella* Enteritidis cells were exposed to sublethal concentrations of clove essential oil, eugenol and quaternary ammonium and incubated at 37°C for 48h. The same methodology was used to determine MBCB for adaptation evaluation. The major component eugenol induced a direct adaptive response, that is, when the microorganism is subjected to sublethal concentrations of a component and subsequently placed in it. The microorganism tolerance to acid stress was not observed. Adaptation of the microorganism was observed when submitted to the cross-adaptation between clove essential oil and eugenol. Clove essential oil and eugenol were more efficient when compared to the quaternary ammonium sanitizer which is a chemical commonly used in the food industry. It can be concluded that clove essential oil may be a potential sanitizer for use in the food industry since it presents the results for the adaptation tests.

Keywords: Clove. *Salmonella* Enteritidis. Eugenol. Adaptation. Biofilm.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de superfícies e alimentos por microrganismos deterioradores e patogênicos, como a *Salmonella* sp., é uma preocupação na indústria de alimentos. *Salmonella* é um bastonete móvel, gram-negativo e pertence à família das Enterobacteriaceae. Com base na sorologia, *Salmonella* é classificada em mais de 2.200 sorovares (CONTRERAS et al., 1997).

A adesão bacteriana e a formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis são motivos de preocupação para a indústria de alimentos, devido ao fato de a persistência dos microrganismos no biofilme representar uma fonte contínua de contaminação (VALERIANO et al., 2012). Esses microrganismos patogênicos podem aderir nas superfícies dos equipamentos, podendo, assim, contaminar os alimentos durante o processamento, e a *Salmonella* é um agente patogênico que pode causar graves doenças, transmitidas por alimentos contaminados (CASARIN et al., 2014).

As proteínas que estão envolvidas na adesão de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em forma de biofilme são responsáveis por regulação global, resposta ao estresse, transporte de nutrientes, degradação e metabolismo energético, desintoxicação, metabolismo do DNA e síntese de mureína, o que demonstra que a formação do biofilme é um mecanismo de resistência da *Salmonella* (GIAOURIS et al., 2013).

Devido aos processos de desinfecção mal sucedidos e à resistência emergente, os métodos de controle convencional estão rapidamente se tornando ineficazes, exigindo novas estratégias de controle (VALERIANO et al., 2012). Os óleos essenciais e seus agentes majoritários, utilizados como sanificantes naturais, podem atuar como novas estratégias de controle, constituindo uma importante fonte de compostos químicos biologicamente ativos (MICHELIN et al., 2005). Concentrações subletais de óleos essenciais e seus componentes majoritários podem causar modificações visíveis de perfis de ácidos graxos da membrana e de componentes voláteis produzidos durante o crescimento de células planctônicas de microrganismos deterioradores e patogênicos de alimentos, e essas modificações podem ser as responsáveis pela resistência dos microrganismos (SIROLI et al., 2015). Em estudo realizado com o óleo essencial de cravo foi observada atividade antibacteriana contra células sésses de *Staphylococcus aureus* e no mecanismo de ação do óleo, além de danos físicos e em níveis moleculares (XU et al., 2016). O eugenol apresentou atividade antibacteriana contra *Salmonella* Typhi, sendo seu mecanismo de ação o aumento da permeabilidade da membrana e o consequente rompimento da membrana celular bacteriana (DEVI et al., 2010).

Este contexto mostra a importância de se estudar o comportamento de células sésseis de *Salmonella* Enteritidis, quando elas são submetidas a concentrações subletais de óleos essenciais e seus componentes majoritários para posterior formação de biofilme. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar as células sésseis de *Salmonella* Enteritidis quanto à adaptação ao óleo essencial de cravo, ao componente majoritário eugenol, ao sanificante quaternário de amônio e ao estresse ácido, e também a adaptação cruzada entre o óleo essencial de cravo e seu componente majoritário eugenol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

2.1 Agentes antimicrobianos

O óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) extraído dos botões foi adquirido da FERQUIMA[®] Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) e o componente majoritário eugenol (98,5%), foi adquirido da Sigma-Aldrich[®] (eugenol, 2-Methoxy-4-(2-propenyl) phenol (E51791)). O sanificante quaternário de amônio utilizado foi SANDET 666[®] (quaternário de amônio, nonil fenol etoxilado 9,5 moles).

2.2 Microrganismo, manutenção e padronização do inóculo

A cepa utilizada foi *Salmonella enterica* serovar Enteritidis S64, fornecida pelo Laboratório do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), mantida à -18 °C, em meio de congelamento (glicerol, 15mL; peptona bacteriológica, 0,5 g; extrato de levedura, 0,3 g; Na Cl, 0,5 g; água destilada, 100 mL).

Para ativação da cepa, alíquotas de 10 µL da cultura estoque foram transferidas para tubos contendo 3 mL de caldo *brain heart infusion* (BHI) e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após incubação, alíquotas de 200 µL foram transferidas para frascos erlenmeyer contendo 150 mL de caldo BHI e incubadas, a 37 °C, até atingirem 10⁸ UFC.mL⁻¹. O crescimento foi acompanhado por absorbância em espectrofotômetro (DO_{600nm}) e contagem em placas em *triptone soy agar* (TSA).

2.3 Determinação da concentração mínima bactericida do biofilme

A concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de cravo (OEC), seu componente majoritário eugenol e do quaternário de amônio (QA) foram determinadas empregando-se a técnica de microdiluição, em microplacas de 96 cavidades, de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (M7-A6) (NCCLS, 2003), com

adaptações. Biofilmes de *S. Enteritidis* foram formados nas cavidades das microplacas pela inoculação de alíquotas de 50 μL de cultura padronizada em 150 μL de BHI e incubadas, a 37 $^{\circ}\text{C}$, por 48 horas, para a formação do biofilme. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (v/v), para a remoção das células não aderidas.

Após a formação dos biofilmes, alíquotas de 200 μL de soluções aquosas contendo 0,5% de Tween 80 (v/v) e agentes estressores foram adicionadas nas cavidades. Foram utilizadas as concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, para o óleo essencial de cravo e eugenol, e as concentrações de 30; 40; 50; 60; 70 e 80; 90 e 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ do sanificante quaternário de amônio. Após 20 minutos de contato, as soluções foram removidas e as cavidades foram lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v). Às cavidades foram adicionados 200 μL de BHI e as microplacas incubadas, a 37 $^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Após esse período, realizou-se o plaqueamento de alíquotas de 10 μL das culturas de cada cavidade em placas contendo TSA, empregando-se a técnica de microgotas, com incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições.

As menores concentrações dos componentes majoritários onde não foi observado crescimento em placas foram denominadas de concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB).

2.4 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório do biofilme

A influência do pH no crescimento de *S. Enteritidis* foi avaliada em microplacas de poliestireno com 96 cavidades. Biofilmes de *S. Enteritidis* foram formados nas cavidades das microplacas pela inoculação de alíquotas de 50 μL de cultura padronizada em 150 μL de BHI e incubadas, a 37 $^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (v/v), para a remoção das células não aderidas.

Para a determinação da influência do pH no crescimento das células de *S. Enteritidis* em biofilme, após a lavagem com NaCl 0,85% (v/v), às cavidades foram adicionados 200 μL de caldo BHI, com pH ajustado com ácido láctico para 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0, e as microplacas foram incubadas, a 37 $^{\circ}\text{C}$, por 24 horas.

Após esse período, realizou-se o plaqueamento de alíquotas de 10 μL das culturas de cada cavidade em placas contendo TSA, empregando-se a técnica de microgotas, com incubação, a 37 $^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições.

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

2.5 Adaptação de células planctônicas de *Salmonella* Enteritidis a concentrações subletais do óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio e formação de biofilme

Células de *Salmonella* Enteritidis foram expostas a concentrações subletais de óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio. Elas foram definidas como 1/8 da CMB obtidas com adaptações (DI PASQUA et al., 2010). Alíquotas de 150 μL de soluções de BHI acrescidas de 0,5% de Tween 80 e os agentes estressores OEC e eugenol, nas concentrações subletais, foram adicionadas nas cavidades. Para os testes com quaternário de amônio foram adicionados somente BHI e o agente estressor, inoculados 50 μL das culturas padronizadas e as microplacas incubadas, a 37 °C, por 48 horas. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v), para a remoção das células não aderidas.

Os biofilmes formados com as células adaptadas foram expostos a diferentes concentrações dos agentes estressores. Alíquotas de 200 μL de soluções aquosas acrescidas de 0,5% de Tween 80 (v/v) de antimicrobianos nas concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 80 mg.mL^{-1} , para o óleo essencial de cravo e, para o eugenol, as concentrações de 30; 40; 50; 60; 70 e 80; 90 e 100 mg.mL^{-1} do sanificante quaternário de amônio foram adicionadas nas cavidades. Após 20 minutos de contato, as soluções foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v).

Em seguida, 200 μL de BHI foram adicionados às cavidades e as microplacas foram incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, realizou-se o plaqueamento de alíquotas de 10 μL das culturas tratadas em TSA pela técnica de microgotas, seguido de incubação, a 37 °C, por 24 horas e, assim, determinada a concentração dos antimicrobianos capazes de eliminar as células sésseis de *S. Enteritidis* que sofreram adaptação em estágio planctônico.

2.6 Adaptação de células planctônicas de *Salmonella* Enteritidis ao estresse ácido e formação de biofilme

Biofilmes de *S. Enteritidis* foram formados nas cavidades das microplacas pela inoculação de alíquotas de 50 µL de cultura padronizada em 150 µL de BHI, ajustado com ácido láctico, para o valor de 5,5 (pH mínimo de crescimento de células planctônicas) e incubação, a 37 °C, por 48 horas. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (v/v), para a remoção das células não aderidas.

Para a determinação da influência do pH no crescimento de *S. Enteritidis* em biofilme, após a lavagem com NaCl 0,85% (v/v), às cavidades foram adicionados 200 µL de caldo BHI, com pH ajustado com ácido láctico para 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0, e as microplacas foram incubadas, a 37 °C, por 24 horas.

Após esse período, realizou-se o plaqueamento de alíquotas de 10 µL das culturas de cada cavidade em placas contendo TSA, empregando-se a técnica de microgotas, com incubação a 37 °C, por 24 horas. O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições. Considerou-se a capacidade de as células sésseis de *S. Enteritidis* desenvolverem tolerância ácida quando houve crescimento em pH inferior ao pH mínimo de crescimento. Células não adaptadas foram utilizadas como controle.

2.7 Adaptação de biofilme de *Salmonella* Enteritidis a concentrações crescentes do óleo essencial de cravo e eugenol

Para a formação do biofilme de *S. Enteritidis* foram inoculados 50 µL da cultura padronizada em 150 µL de caldo BHI com a concentração subletal de 1/8 da CMB do OEC e eugenol das células planctônicas. As microplacas foram incubadas, a 37 °C, por 48 horas. Após a formação do biofilme, as culturas foram removidas utilizando-se micropipetas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (v/v), para a remoção das células não aderidas.

Após a lavagem foram preparadas novas soluções com os antimicrobianos na concentração subletal de 1/4 da CMB das células planctônicas e novamente adicionados às cavidades em que os biofilmes foram formados. As microplacas foram incubadas, a 37 °C, por 24/48 horas, para observação do crescimento, com adaptações (BUZÓN-DURÁN et al., 2017). Esse procedimento foi realizado sucessivamente enquanto fosse observado

crescimento e as concentrações foram aumentando, sendo utilizados os valores de 1/8CMB; 1/4CMB; 1/2CMB; CMB; 1,5xCMB e 2xCMB.

2.8 Avaliação da adaptação cruzada entre óleo essencial de cravo e eugenol

Alíquotas de 150 µL de soluções de BHI acrescidas de 0,5% de Tween 80 e os agentes estressores OEC e eugenol nas concentrações subletais de 1/8 CMB foram adicionadas nas cavidades. Inocularam-se 50 µL das culturas padronizadas e as microplacas foram incubadas, a 37 °C, por 48 horas. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v), para a remoção das células não aderidas.

Os biofilmes formados com as células adaptadas foram expostos a concentrações do agente estressor diferentes daquelas a que as células foram adaptadas, nas concentrações de 80; 70; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 10; 5; 3,9 e 2,5 mg.mL⁻¹ do OEC e eugenol. Assim, células adaptadas ao OEC foram expostas a diferentes concentrações de EUG e células adaptadas ao EUG foram expostas a diferentes concentrações de OEC. Para isso, alíquotas de 200 µL de soluções aquosas acrescidas de 0,5% de Tween 80 (v/v) dos antimicrobianos nas diferentes concentrações foram adicionadas às cavidades da microplaca. Após 20 minutos de contato, que é o tempo utilizado nas indústrias de alimentos para aplicação de sanificantes, as soluções foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v).

Em seguida, 200 µL de BHI foram adicionados às cavidades e as microplacas foram incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após esse período realizou-se o plaqueamento de alíquotas de 10 µL das culturas tratadas em TSA pela técnica de microgotas, seguido de incubação, a 37 °C, por 24 horas e, assim, determinada a concentração dos antimicrobianos capazes de eliminar as células sésseis de *S. Enteritidis* que sofreram adaptação em estágio planctônico do agente estressor diferente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentração mínima bactericida do biofilme

A utilização dos óleos essenciais e componentes majoritários como antimicrobianos naturais sobre células planctônicas já tem o seu efeito bactericida bem estabelecido. Diante disso, foi necessário determinar as concentrações mínimas bactericidas do óleo essencial de cravo, do seu componente majoritário eugenol e do quaternário de amônio sobre os biofilmes de *S. Enteritidis*, que são estruturas mais complexas. Os valores da concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB) dos antimicrobianos obtidos neste experimento estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB) de óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio sobre biofilme de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.

Antimicrobianos	CMBB (mg.mL ⁻¹)
Óleo essencial de cravo	40
Eugenol	30
Quaternário de amônio	90

CMBB: concentração mínima bactericida do biofilme.

Fonte: Da Autora (2017).

Foi possível observar que as CMBBs foram superiores aos valores encontrados para as células planctônicas (OEC; EUG; QA: 3,9; 3,9; 0,9 mg.mL⁻¹, respectivamente), ou seja, as que estavam livres e não em comunidades complexas, como os biofilmes. O valor da CMBB encontrado para o óleo essencial de cravo foi praticamente dez vezes maior que sua CMB; para o eugenol, a CMBB foi de, aproximadamente, 8 vezes o valor da CMB; já para o quaternário de amônio, o valor encontrado para a CMBB foi cem vezes maior que o encontrado para a CMB do antimicrobiano. Esses resultados mostram que, ao se encontrar na forma de biofilme, *S. Enteritidis* se torna mais tolerante aos antimicrobianos testados. Os resultados também mostraram que o eugenol foi mais eficiente sobre o biofilme de *S. Enteritidis*, em comparação com o OEC e o sanificante já utilizado nas indústrias alimentícias, o quaternário de amônio. Nos estudos de Liu et al. (2015) também foi observada a eficiência na concentração de 2.048 µg. mL⁻¹, para a eliminação do biofilme de *Salmonella Typhimurium*.

3.2 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório do biofilme

Os valores de pH mínimo inibitório (pH_{MI}) e mínimo de crescimento (pH_{MC}) do biofilme de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis foram de 3,5 e 4,0, respectivamente.

Os resultados mostram que, quando as células estão em comunidades complexas, como os biofilmes, elas conseguem resistir a pH mais ácidos, uma vez que o pH_{MC} e o pH_{MI} passaram de 5,5 e 5,0 para 4,0 e 3,5, respectivamente. Este resultado pode ser observado, uma vez que os biofilmes são estruturas que oferecem proteção às células contra condições ambientais adversas.

Em um estudo realizado por Dimakopoulou-Papazoglou, Lianou e Koutsoumanis (2016) foi observado pH_{MC} de *Salmonella enterica* sorovar Newport em biofilme entre 3,48 e 3,69, o qual se aproxima do resultado encontrado para *S. Enteritidis*.

3.3 Adaptação de biofilme de *Salmonella* Enteritidis a concentrações subletais do óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio

Nos resultados obtidos após a formação do biofilme em presença de concentrações subletais dos agentes estressores e posterior tratamento dos biofilmes com diferentes concentrações desses agentes, foi observado aumento de tolerância do biofilme de *S. Enteritidis* apenas ao eugenol (Tabela 2).

Tabela 2 - Resposta adaptativa de biofilme de *S. Enteritidis* ao óleo essencial de cravo, eugenol e quaternário de amônio.

Fator subletal (1/8 CMB)	Concentração Subletal (mg.mL ⁻¹)	Tolerância ao fator letal (mg.mL ⁻¹)							
		10	20	30	40	50	60	70	80
OEC	0,4875	+	+	-	-	-	-	-	-
EUG	0,4875	+	+	+	-	-	-	-	-
		30	40	50	60	70	80	90	100
QA	0,1125	-	-	-	-	-	-	-	-

OEC: óleo essencial de cravo; EUG: eugenol; QA: quaternário de amônio.

(+) crescimento visível em placas; (-) ausência de crescimento em placas.

Fonte: Da Autora (2017).

De acordo com o resultado apresentado, o biofilme adaptado ao OEC de *S. Enteritidis* não apresentou aumento de tolerância ao OEC, tornando-se mais sensível a esse agente estressor, uma vez que sua CMBB passou de 40 para 30 mg.mL⁻¹. Esse resultado pode ser devido aos diferentes componentes químicos encontrados no óleo essencial de cravo, corroborando as informações de que a atividade antibacteriana dos óleos essenciais não se dá apenas por um único mecanismo específico, atuando sobre vários alvos na célula (BURT, 2004). De acordo com Xu et al. (2016), o óleo essencial de cravo exibiu atividade antibacteriana contra *S. aureus*, levantando a hipótese de que o óleo essencial pode interagir primeiro com a parede celular e a membrana, uma vez que *S. aureus* é uma bactéria gram-positiva, ao contrário do microrganismo objeto do estudo, que é gram-negativo. Eles observaram que o óleo essencial de cravo provocou, além de danos físicos, também danos em nível molecular, como a inibição da síntese normal de DNA e proteínas, que são essenciais para o crescimento bacteriano.

Já o EUG induziu a resposta adaptativa das células, uma vez que foi observado crescimento de *S. Enteritidis* em sua presença em concentração antes inibitória. A CMBB passou de 30 para 40 mg.mL⁻¹, mostrando que, quando tem o componente puro, este pode ter somente um sítio de ação. Sabe-se que o eugenol promove o aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, levando ao seu rompimento (DEVI et al., 2010). A influência de terpenos, como o eugenol, sobre a composição de ácidos graxos de membrana de *S. Typhimurium*, foi mostrada após exposição dessas bactérias a concentrações subletais de eugenol, timol, carvacrol e citral (DUBOIS-BRISSONNET et al., 2011). Os autores observaram alteração na composição de ácidos graxos de membrana dessa bactéria com aumento dos ácidos graxos saturados. Para o quaternário de amônio foi observado que, quando submetido à concentração subletal do desinfetante, ele não foi capaz de crescer e formar biofilme. Esse resultado demonstra que as células foram estressadas, tornando-se mais sensíveis na presença da concentração subletal do componente. O mecanismo de ação do composto quaternário de amônio, provavelmente, se dá sobre os componentes fosfolipídicos da membrana, causando deformação da membrana, vazamento de material intracelular de baixo peso molecular e ruptura da força próton motora (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

3.4 Adaptação de células planctônicas de *Salmonella* Enteritidis ao estresse ácido e formação de biofilme

Os biofilmes de *S. Enteritidis* formados em microplacas em meio com pH 5,5 (pH mínimo de crescimento das células planctônicas) ajustado com ácido láctico foram avaliados quanto à sua capacidade de adaptação ao estresse ácido.

Para *S. Enteritidis* S64 não foi observada adaptação ao estresse ácido, embora seja conhecida essa capacidade para várias bactérias.

Os biofilmes foram mais sensíveis ao pH, uma vez que o pH mínimo de crescimento do biofilme (pH_{MCB}) passou de 4 para 4,5, e o pH mínimo inibitório do biofilme (pH_{MIB}) passou de 3,5 para 4, ou seja, não suportaram o mesmo estresse ácido que as células que não foram submetidas ao pH_{MC} . Os resultados mostraram que o pH de 5,5 foi estressante a ponto de o microrganismo tornar-se mais sensível a valores de pH que antes toleravam, ou seja, não se adaptaram ao estresse ácido.

Esse resultado se mostra importante, uma vez que é utilizada a pulverização de ácidos orgânicos, como ácidos láctico e acético, para diminuir a contaminação de carcaças e carnes frescas em abatedouros (DEL RIO et al., 2007).

3.5 Adaptação a concentrações crescentes do óleo essencial de cravo e eugenol

Foi realizado o teste de adaptação sucessiva, em que o microrganismo foi colocado para a formação de biofilme na presença da concentração de 1/8 CMB ($0,4875 \text{ mg.mL}^{-1}$) das células planctônicas. Após incubação por 48 horas e a formação de biofilme, os pocinhos foram lavados e acrescidos de meio contendo CMB/4, e assim sucessivamente. Os microrganismos não foram capazes de se adaptar, tornando-se mais sensíveis, pois as células em biofilme não foram capazes de crescer em meio contendo a CMB das células planctônicas ($3,9 \text{ mg.mL}^{-1}$), tanto para o cravo quanto para o seu componente majoritário eugenol (Tabela 3).

Tabela 3 - Resposta adaptativa sucessiva de *S. Enteritidis* ao óleo essencial de cravo e seu componente majoritário eugenol.

Antimicrobianos	Concentrações sucessivas (mg.mL ⁻¹)					
	0,4875	0,975	1,95	3,9	5,85	7,8
OEC	+	+	+	-	-	-
EUG	+	+	+	-	-	-

OEC: óleo essencial de cravo; EUG: eugenol; (+) crescimento visível em placas; (-) ausência de crescimento em placas.

Fonte: Da Autora (2017).

Em estudo realizado com isolados de *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* foi demonstrado que tanto eugenol quanto citral, quando utilizados em concentração subletal, inibiram significativamente a habilidade das bactérias em se aderirem no poliestireno (APOLÓNIO et al., 2014). Os autores observaram que a exposição das bactérias às CMB de eugenol e citral por 30 minutos foi suficiente para reduzir significativamente a aderência dessas bactérias. Assim, pode-se sugerir que tenha ocorrido o mesmo fato neste trabalho.

A diminuição da capacidade de aderência de *S. Enteritidis* pode ser devido à ação do eugenol e do óleo essencial sobre o sistema *quorum sensing*. Essa forma de ação dos óleos essenciais sobre bactérias foi discutida por Nazzaro et al. (2013). O sistema *quorum sensing* funciona como um processo de comunicação química entre as bactérias, o qual envolve a detecção de moléculas de sinalização, sendo necessário para a formação de biofilme.

3.6 Avaliação da adaptação cruzada entre óleo essencial de cravo e eugenol

Foram realizados testes da resposta adaptativa cruzada de *S. Enteritidis* entre o óleo essencial de cravo e o seu componente majoritário eugenol. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resposta adaptativa cruzada de *S. Enteritidis* ao óleo essencial de cravo e eugenol.

Fator subletal	Concentração subletal (mg.mL ⁻¹)	Tolerância ao fator letal (mg.mL ⁻¹)							
		EUG							
OEC	0,4875	10	20	30	40	50	60	70	80
		+	+	+	-	-	-	-	-
EUG	0,4875	OEC							
		10	20	30	40	50	60	70	80
		+	+	-	-	-	-	-	-

OEC: óleo essencial de cravo; EUG: eugenol; (+) crescimento visível em placas; (-) ausência de crescimento em placas.

Fonte: Da Autora (2017).

Os resultados observados na adaptação cruzada foram os mesmos que já tinham sido observados na adaptação direta, ou seja, os biofilmes que foram submetidos à concentração subletal do OEC e posteriormente expostos ao EUG se adaptaram, passando a CMBB de 30 para 40 mg.mL⁻¹. Os biofilmes que foram submetidos à concentração subletal de EUG e posteriormente expostos a soluções de OEC se tornaram mais sensíveis e a CMBB diminuiu de 40 para 30 mg.mL⁻¹. Os microrganismos que foram expostos a concentrações subletais de OEC e posteriormente submetidos a concentrações iguais ou superiores à CMB do EUG se adaptaram. Isso pode ocorrer, uma vez que o EUG pode estimular, por exemplo, a mudança do perfil lipídico da membrana celular (NAZZARO et al., 2013) e essa mudança pode alterar a permeabilidade da célula, podendo, então, aumentar a resistência bacteriana.

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de cravo e o eugenol foram mais eficientes, quando comparados com o sanificante quaternário de amônio, que é um produto químico, geralmente utilizado na indústria de alimentos.

Não foi observada adaptação direta ao óleo essencial de cravo, uma vez que não houve aumento da tolerância ao antimicrobiano. As células se tornaram mais sensíveis.

As células submetidas à adaptação cruzada, ou seja, que foram adaptadas ao EUG e posteriormente expostas a soluções de OEC não se adaptaram, tornando-se mais sensíveis.

Pode-se concluir que óleo essencial de cravo pode ser um potencial sanificante para utilização nas indústrias de alimentos, uma vez que apresentou ótimos resultados para os testes de adaptação.

REFERÊNCIAS

- APOLÓNIO, J. et al. No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 354, n. 2, p. 92-101, 2014.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.
- BUZÓN-DURÁN, L. et al. Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. **Food Microbiology**, London, v. 65, p. 294-301, 2017.
- CASARIN, L. S. et al. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on stainless steel welds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 191, p. 103-108, 2014.
- CONTRERAS, I. et al. *Salmonella typhi* mutants defective in anaerobic respiration are impaired in their ability to replicate within epithelial cells. **Microbiology**, New York, v. 143, n. 8, p. 2665-2672, 1997.
- DEL RÍO, E. et al. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. **International Journal of Food Microbiology**, Microbiology, v. 115, n. 3, p. 268-280, 2007.
- DEVI, K. Pandima et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.
- DI PASQUA, R. et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, New York, v. 10, n. 5, p. 1040-1049, 2010.
- DIMAKOPOULOU-PAPAZOGLU, D.; LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Modelling biofilm formation of *Salmonella enterica* ser. Newport as a function of pH and water activity. **Food Microbiology**, London, v. 53, p. 76-81, 2016.
- DUBOIS-BRISSONNET, F. et al. Induction of fatty acid composition modifications and tolerance to biocides in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by plant-derived terpenes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 3, p. 906-910, 2011.
- GIAOURIS, E. et al. Differential protein expression patterns between planktonic and biofilm cells of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 on stainless steel surface. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 162, n. 1, p. 105-113, 2013.
- LIU, Q. et al. Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 60, n. 5, p. 421-430, 2015.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

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

SIROLI, L. et al. Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis. **Food Chemistry**, London, v. 182, p. 185-192, 2015.

VALERIANO, C. et al. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 2, p. 673-677, 2012.

XU, J. G. et al. Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 9, p. 1194, Sept. 2016.