

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

ADASSA GAMA TAVARES

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE TOLERÂNCIA DIRETA E CRUZADA EM CEPAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADAS DE ALIMENTOS**

JOÃO PESSOA
2014

ADASSA GAMA TAVARES

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE TOLERÂNCIA DIRETA E CRUZADA EM CEPAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADAS DE ALIMENTOS**

**JOÃO PESSOA
2014**

ADASSA GAMA TAVARES

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE TOLERÂNCIA DIRETA E CRUZADA EM CEPAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADAS DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição, com área de concentração em Análise e Controle de Qualidade de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza.

Co-orientador: Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

**JOÃO PESSOA
2014**

T231e Tavares, Adassa Gama.

Efeito do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (Óregano) sobre o desenvolvimento de tolerância direta e cruzada em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos / Adassa Gama Tavares. -- João Pessoa, 2014.

65f. : il.

Orientador: Evandro Leite de Souza

Coorientador: José Pinto de Siqueira Júnior

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Nutrição. 2. *Origanum vulgare* L. (Óregano). 3. Óleo essencial. 4. *Staphylococcus*. 5. Tolerância. 6. Conservação de alimentos.

UFPB/BC

CDU: 612.39(043)

ADASSA GAMA TAVARES

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE TOLERÂNCIA DIRETA E CRUZADA EM CEPAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADAS DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos
requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências
da Nutrição, com área de concentração em Análise e
Controle de Qualidade de Alimentos

Dissertação _____ em ____ / ____ / 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
Orientador

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior
Co-Orientador

Prof. Dr. Juscélio Donizete Cardoso
Examinador Interno

Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino
Examinador Interno Suplente

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Examinador Externo

Profa. Dra. Janeeyre Ferreira Maciel
Examinador Externo Suplente

*Aos meus avós **Maria Iraci, Antônio e Josefa Tavares**
Exemplos de luta e dedicação*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor e graça sempre constantes em minha vida.

À Universidade Federal da Paraíba, pelo suporte e estrutura.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da UFPB, seu corpo docente, direção e funcionários pela oportunidade e presteza.

Ao prof. Dr. Evandro Leite de Souza, pela orientação e confiança mais uma vez em mim depositadas, pelos ensinamentos, paciência e toda assistência durante a pesquisa, produção do artigo e dissertação.

Ao meu Co-orientador prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior, pela oportunidade e apoio.

À prof. Dra. Marciane Magnani, por acompanhar o projeto desde o início, compartilhando seus conhecimentos para condução e alcance dos seus objetivos.

Ao prof. Dr. Fábio Sampaio, por disponibilizar o espaço e equipamentos do Laboratório de Biologia Bucal para realização de alguns ensaios laboratoriais.

À prof. Dra. Maria Lúcia da Conceição, grande incentivadora, amiga, fonte de sabedoria, humildade e gentileza. Minha admiração!

Aos professores doutores da banca examinadora, por aceitarem avaliar esse trabalho e pela contribuição para a melhoria da dissertação e artigo.

Aos meus pais, Almir e Zarlene, que apesar de distantes fisicamente, me alcançam com seu amor, cuidado, orientação, incentivo e orações.

À minha irmã Abigail, pelo carinho, orações e torcida.

À minha irmã Amada, por todo auxílio e incentivo, por aguentar meus estresses e por me escutar e aconselhar nos momentos difíceis.

À minha tia Marilene, por seu incentivo e também carinho e cuidado para comigo.

A Daniel, parceiro de tema, por dividir todo o trabalho durante experimentos, por sua compreensão e paciência para com minhas falhas e desastres e também por ter compartilhado alguns dos seus conhecimentos de microbiologia.

A Nelson, por ser tão solícito e me ajudar em todos os momentos que precisei.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, Isabelle, Jossana, Kataryne, Elieidy, Isabella, Rayssa, Geany, Liliane, Priscila, Neusa, Eryka, Alberto, Mayara, Ana Júlia, pelo convívio e ajuda quando necessitei, em especial Ingrid, pelo apoio e conselhos.

A Allan, por todo auxílio durante os experimentos realizados no Laboratório de Biologia Bucal.

À Quênia, por dividir as responsabilidades do estágio a docência comigo e por ter me ensinado com sua experiência.

À minha amiga Gracy, pelo companheirismo, por partilhar alegrias, tristezas, mas também metodologias e técnicas da pesquisa, por ser um exemplo de determinação.

À minha amiga Polyana, pelo incentivo, por sua paciência em me escutar tantas vezes e por ser tão serena e me tranquilizar até mesmo nos momentos mais tensos. Sentirei saudades!

À Renata, por partilhar os momentos em sala de aula, bem como as dificuldades enfrentadas durante a pesquisa.

Às minhas amigas Thaisa e Vanessa, pelo carinho e torcida.

Aos meus amigos e irmãos em cristo da IBRB, por todo apoio, carinho e orações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa.

*Feliz o homem que acha sabedoria, e o homem
que adquire conhecimento.*

Pv 3:13

TAVARES, A.G. Efeito do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) sobre o desenvolvimento de tolerância direta e cruzada em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos. 2014. Orientador Evandro Leite de Souza.

RESUMO

O desenvolvimento de tolerância em *S. aureus* frente a condições de estresse subletal aplicadas na conservação dos alimentos tem sido observado. Apesar do uso do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (OEOV) como conservante em alimentos ser considerado uma alternativa promissora, poucos estudos científicos têm avaliado sua capacidade de induzir o desenvolvimento de tolerância direta e cruzada em bactérias patogênicas de origem alimentar. O objetivo desse estudo foi investigar a capacidade do OEOV em inibir o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos, bem como avaliar o desenvolvimento de tolerância direta e/ou cruzada a sais e ácidos orgânicos comumente utilizados pela indústria alimentícia após a exposição das cepas a concentrações subletais do OEOV. Foram utilizadas quatro cepas de *S. aureus* (FRI-S-6; FRI-196-3; FRI-326; ATCC 13565) produtoras de enterotoxinas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEOV, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), ácido acético (AA) e ácido láctico (AL) foi determinada através do método de microdiluição em caldo. A capacidade das cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* desenvolverem tolerância direta e/ou cruzada ao NaCl, KCl, AA e AL foi observada mediante a exposição dessas cepas a quantidades subletais ($\frac{1}{2}$ CIM e $\frac{1}{4}$ CIM) do OEOV em caldo Brain Heart Infusion (BHI) durante 72 horas e posterior determinação da CIM dos agentes antimicrobianos ensaiados. A indução de tolerância bacteriana direta e/ou cruzada foi avaliada através da comparação dos valores de CIM dos antimicrobianos contra as cepas teste antes e após sua habituação às quantidades subletais do OEOV. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em valores de moda. Os valores de CIM do OEOV, NaCl, KCl, AA e AL contra as cepas de *S. aureus* testadas foram $2,5 - 10 \mu\text{L.mL}^{-1}$, 200 mg.mL^{-1} , 300 mg.mL^{-1} , $2,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente. Após a exposição das cepas às concentrações subletais ($\frac{1}{2}$ CIM e $\frac{1}{4}$ CIM) do OEOV, os valores de CIM desse óleo essencial frente às células habituadas se mantiveram os mesmos ou reduziram até cinco vezes quando comparados aos das células não habituadas, revelando que não houve indução de tolerância direta. O OEOV não induziu o desenvolvimento de tolerância cruzada ao NaCl, KCl, AA e AL, uma vez que os valores de CIM desses antimicrobianos contra as cepas teste habituadas ao OEOV foram iguais ou até seis vezes menores comparados àqueles obtidos contra as células não habituadas. Estes dados sugerem que concentrações subletais do OEOV podem ser aplicadas na conservação de alimentos de forma segura, uma vez que esse óleo essencial não induziu o desenvolvimento de tolerância direta ou cruzada sobre as cepas de *S. aureus* testadas.

Palavras-chave: óleo essencial, *Staphylococcus*, tolerância, conservação de alimentos.

TAVARES, A.G. Efeito do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) sobre o desenvolvimento de tolerância direta e cruzada em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos. 2014. Orientador Evandro Leite de Souza.

ABSTRACT

The development of tolerance in *S. aureus* when exposed to sublethal stress conditions used in food preservation has been observed. Despite the use of the essential oil from *Origanum vulgare* L. (OVEO) as a preservative in food be considered a promising alternative, there is a lack of scientific studies about its ability to induce the development of direct tolerance and cross-tolerance by food-borne pathogen bacteria. The aim of this study was to investigate the capability of the OVEO to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods, and to evaluate the development of direct tolerance and/or cross-tolerance to salts and organic acids typically used by the food industry after habituation in sublethal amounts of OVEO. Four strains of *S. aureus* (FRI-S-6; FRI-196-3; FRI-326; ATCC 13565) producing enterotoxins A, B, D and E were used as test-organisms. The values of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of OVEO, sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), acetic acid (AA) and lactic acid (LA) were determined by the microdilution method. The ability of strains of enterotoxigenic *S.aureus* to develop direct tolerance and/or cross-tolerance to NaCl, KCl, AA and LA was evaluated after the exposure of these strains to sublethal amounts ($\frac{1}{2}$ MIC and $\frac{1}{4}$ MIC) of OVEO in Brain Heart Infusion broth (BHI) for 72 hours, followed by the determination of the MIC values of the tested antimicrobial agents. The induction of direct tolerance and/or cross-tolerance was assessed by comparing the MIC values of the antimicrobials against the tested strains before and after the habituation treatment with sublethal amounts of OVEO. The assays were performed in triplicate and the results were expressed in modal value. MIC values of OVEO, NaCl, KCl, AA and LA against the test strains were 2,5-10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 200 mg.mL^{-1} , 300 mg.mL^{-1} , 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectively. After the exposure of the strains to sublethal concentrations ($\frac{1}{2}$ MIC and $\frac{1}{4}$ MIC) of OVEO, MIC values of this essential oil against the habituated cells were maintained the same or decreased up to five-fold when compared to the non-habituated cells, revealing no induction of direct tolerance. The OVEO not induced the development of cross-tolerance to NaCl, KCl, AA and LA, since the MIC values of these antimicrobials against test strains habituated to sublethal amounts ($\frac{1}{2}$ MIC and $\frac{1}{4}$ MIC) of OVEO were the same or up to six-fold lower when compared to those obtained against the non-habituated cells. These data suggest that sublethal concentrations of OVEO can be applied in food preservation safely, since this essential oil did not induced direct tolerance or cross-tolerance to the tested *S. aureus* strains.

Keywords: essential oil, *Staphylococcus*, tolerance, food preservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química dos ácidos acético e láctico	19
Figura 2	Efeito de tratamentos subletais sobre as células microbianas	24
Figura 3	Estrutura química dos principais constituintes dos óleos essenciais	28
Figura 4	Representação dos mecanismos e locais da célula bacteriana que parecem ser sítios de ação para os constituintes dos óleos essenciais	29
Figura 5	Estrutura molecular dos dois principais componentes do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L.	31
Figura 6	Configuração esquemática da microplaca para determinação da CIM do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L.	36
Figura 7	Configuração esquemática da microplaca para determinação da CIM do cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de potássio (KCl)	36
Figura 8	Configuração esquemática da microplaca para determinação da CIM do ácido acético e ácido láctico	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cepas teste de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
-----------------	---	----

Apêndice:

Tabela 1	The minimum inhibitory concentration of the essential oil from <i>O. vulgare</i> L. against different enterotoxigenic strains of <i>S. aureus</i> that were isolated from foods	62
Tabela 2	The minimum inhibitory concentration of the essential oil from <i>O. vulgare</i> L. against different enterotoxigenic strains of <i>S. aureus</i> that were isolated from foods, with or without habituation to the same stressing agent for 72 h	63
Tabela 3	The minimum inhibitory concentrations of sodium chloride, potassium chloride, acetic acid and lactic acid against enterotoxigenic strains of <i>S. aureus</i> that were isolated from foods, with or without habituation to the essential oil from <i>O. vulgare</i> L. for 72 h	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a_w	Atividade de água
AA	Ácido Acético
AL	Ácido Láctico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
EGCG	Galato de Epigallocatequina
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina
MW	Molecular Weight
OEs	Óleos essenciais
OEOV	Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L.
<i>O. vulgare</i> L.	<i>Origanum vulgare</i> L.
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
<i>S. Tiphymurium</i>	<i>Salmonella</i> Tiphymurium
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEs	Staphylococcal Enterotoxins
SpA	Staphylococcus protein A
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin-1
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS.....	15
2.2 USO DE SAIS E ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE MICROBIANO EM ALIMENTOS.....	17
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.4 MECANISMOS DE DESENVOLVIMENTO DE TOLERÂNCIA MICROBIANA	24
2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO POTENCIAL CONSERVANTES PARA USO EM ALIMENTOS.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 MATERIAL.....	33
3.1.1 Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L.....	33
3.1.2 Sais e ácidos orgânicos.....	33
3.1.3 Microrganismos teste.....	33
3.2 MÉTODOS.....	34
3.2.1 Padronização do inóculo bacteriano.....	34
3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	35
3.2.3 Indução de tolerância bacteriana direta.....	37
3.2.4 Indução de tolerância bacteriana cruzada.....	38
3.2.5 Análise estatística.....	38
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE	51
ANEXO	65

1 INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são utilizados na indústria de alimentos, por duas razões principais: controlar os processos de deterioração naturais - conservação de alimentos, e impedir o crescimento de microrganismos, incluindo aqueles potencialmente patogênicos - segurança alimentar (BRUL; COOTE, 1999). Apesar da modernização na produção e técnicas de preservação de alimentos, como o uso da engenharia genética, irradiação de alimentos e embalagens com atmosfera modificada, a segurança de alimentos consiste ainda em um fator de grande preocupação para a saúde pública em todo o mundo (LV et al. 2011).

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, que podem levar a ocorrência de doenças manifestadas por ação de microrganismos patogênicos ou de toxinas microbianas. A maioria das doenças veiculadas por alimentos de origem microbiana possui sua etiologia estabelecida, sendo a bactéria *Staphylococcus aureus* reconhecida com um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos associados à ingestão de alimentos *in natura* e processados (PULIDO et al., 2012; WANG et al., 2013).

S. aureus caracteriza-se como um microrganismo de difícil controle devido a combinação de diversos fatores, incluindo elevado potencial de patogenicidade e capacidade de adesão a superfícies através da formação de biofilmes associado à resistência a compostos antimicrobianos. Neste sentido, existe uma necessidade contínua para descoberta de novos agentes antimicrobianos de uso no controle de *S. aureus*, com benefícios potenciais para a indústria de alimentos (QIU et al., 2010).

Durante o processamento de alimentos, os agentes patogênicos de origem alimentar são expostos a uma série de condições de estresse, como aquecimento, refrigeração, pH ácido, estresse salino ou a exposição a produtos de limpeza e desinfecção (CEBRIÁN et al., 2010). O controle microbiano em alimentos pode ser alcançado através da combinação do uso de agentes em uma menor intensidade, como é defendido no conceito de tecnologia de obstáculos (LEISTNER, 2000). A aplicação de uma combinação racional de agentes de preservação pode garantir uma efetiva segurança microbiana, além de manter a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (KARATZAS et al., 2000).

O uso de fatores estressantes a níveis subletais pode causar danos às células microbianas que, durante o seu processo de reparação, podem adquirir novas habilidades de adaptação a tais agentes estressores repercutindo no desenvolvimento de tolerância e/ou resistência e em impactos sobre a segurança alimentar (SILVA-ANGULO et al., 2014). Essas

respostas podem ainda resultar em um aumento da tolerância a outros agentes estressores, fenômeno denominado tolerância cruzada. O desenvolvimento de tolerância cruzada entre agentes conservantes tem importantes implicações na conservação de alimentos, onde geralmente múltiplas tensões são aplicadas para o controle do crescimento e sobrevivência dos microrganismos (GREENACRE; BROCKLEHURST, 2006).

A demanda dos consumidores por produtos frescos e com aspecto mais natural, com adequada segurança microbiológica e estabilidade, tem despertado o interesse pela aplicação de antimicrobianos naturais eficazes no controle de microrganismos e enzimas em alimentos (HUANG et al., 2012). Entre os possíveis preservativos naturais para uso em alimentos, estão uma série de produtos derivados de plantas, animais e microrganismos, os quais consistem em uma significativa gama de substâncias com interessante potencial antimicrobiano (DEMIRCI et al., 2008; TIWARI et al., 2009).

Neste contexto, a aplicação de óleos essenciais de plantas, e seus constituintes, em alimentos surge como alternativa promissora para a conservação desses produtos. Particularmente, o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (OEOV) tem demonstrado atividade inibitória sobre o crescimento e sobrevivência de um amplo espectro de microrganismos (NOSTRO et al., 2004; SILVA et al., 2013; STEFANAKIS et al., 2013). Estudos também têm demonstrado a capacidade desse óleo essencial de suprimir a ação de alguns fatores de virulência relacionadas a *S. aureus*, incluindo a produção de enterotoxinas (BARROS et al., 2009; SOUZA et al., 2010). Embora algumas pesquisas tenham avaliado a atividade anti-estafilocócica do OEOV, existem poucas informações sobre a resposta desta bactéria quando desafiada com quantidades subletais deste óleo essencial.

Considerando tais aspectos, o presente estudo teve como objetivo investigar a efetividade do OEOV na inibição do crescimento de cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* isolados de alimentos, bem como avaliar os efeitos da exposição das cepas teste a concentrações subletais do OEOV, em diferentes intervalos de tempo, sobre o desenvolvimento de tolerância bacteriana direta e cruzada a sais e ácidos orgânicos comumente utilizados pela indústria alimentícia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

O consumidor exige produtos alimentares frescos, saborosos, saudáveis e seguros. No entanto, a globalização da produção e comercialização de alimentos, apesar de aumentar a variedade de produtos disponíveis, também exerce um grande impacto sobre a segurança de alimentos (QUESTED et al., 2010). A qualidade desses alimentos pode ser afetada durante a cadeia de produção por uma diversidade de fatores físicos, químicos ou microbiológicos (FORSYTHE, 2002).

Os microrganismos, por sua vez, podem ser inseridos na cadeia alimentar em qualquer uma das etapas e podem crescer e interagir com os componentes alimentares de diferentes formas, as quais ainda não foram completamente compreendidas. Estes agentes são altamente versáteis e podem se adaptar ao ambiente, o que permite não apenas sua sobrevivência e crescimento, como também a produção de compostos tóxicos (HAVELAAR et al., 2010). Os contaminantes microbianos são os principais agentes responsáveis pela deterioração dos alimentos e podem provocar infecção e intoxicação alimentar, sendo que os procedimentos de conservação de alimentos são direcionados, principalmente, para o seu controle (MAÑAS; PAGÁN, 2005).

A deterioração microbiana de alimentos pode ser ocasionada pelo crescimento de microrganismos, por suas atividades metabólicas naturais ou ainda pela liberação de enzimas extra ou intracelulares no substrato após a lise da célula microbiana (GOULD, 1996). Os efeitos adversos causados por microrganismos deteriorantes em alimentos incluem alterações na cor, odor, sabor e textura e têm graves implicações sobre o suprimento mundial de alimentos, podendo resultar em prejuízos econômicos e redução do acesso a alguns produtos por parte da população (SOFOS, 1993).

A ocorrência de doenças de origem alimentar apresenta grande impacto sobre a saúde pública. As infecções e intoxicações causadas por microrganismos patogênicos presentes em alimentos envolvem diferentes agentes etiológicos que podem afetar a saúde humana por invasão direta dos tecidos ou através da produção de toxinas, ocasionando uma ampla variedade de sintomas. A transmissão destes patógenos e/ou suas toxinas para os alimentos pode ocorrer de diferentes maneiras e em diferentes etapas da produção, sendo necessário a

aplicação de técnicas de conservação que garantam o acesso dos consumidores à alimentos inócuos e seguros sob o ponto de vista microbiológico (CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002).

A segurança e a qualidade microbiana dos alimentos podem ser estabelecidas através da aplicação de métodos que garantam a inativação ou inibição do crescimento e proliferação de bactérias deteriorantes e/ou patogênicas (KARATZAS et al., 2000). Esse controle microbiano é comumente realizado por métodos tais como o congelamento, aquecimento, secagem, liofilização, irradiação, alta pressão hidrostática, fermentação ou a adição de antimicrobianos e produtos químicos, os quais atuam causando injúria e/ou dano permanente à célula microbiana, com comprometimento ou perturbação do seu processo homeostático, adaptativo, crescimento e multiplicação (GOULD, 1996; WU, 2008).

Os procedimentos empregados para o controle microbiano em alimentos promovem uma série de interações e reações entre substâncias constituintes destes substratos, que podem comprometer suas características nutricionais, funcionais e sensoriais (HAVELAAR et al., 2010). Adicionalmente, o desenvolvimento de tolerância microbiana aos processos de conservação também tem se apresentado como fator motivador para mudanças nos procedimentos empregados na conservação de alimentos (GOULD, 1996).

As alterações na qualidade sensorial dos alimentos causadas por processos de preservação têm levado a indústria a reduzir a intensidade das tensões ou obstáculos utilizados. A combinação de técnicas de conservação menos agressivas, como defende o conceito de tecnologia de obstáculos (LEISTNER, 2000), tem se mostrado uma alternativa promissora para alcançar o controle microbiano em alimentos. A aplicação de uma combinação inteligente de obstáculos (fatores de preservação) pode garantir uma efetiva segurança microbiana, além de manter a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (KARATZAS et al., 2000).

A indústria alimentícia tem buscado tecnologias alternativas e inovadoras de conservação que permitam a manutenção dos atributos naturais e a segurança dos produtos (LADO; YOUSEF, 2002). Dentre essas alternativas promissoras que vem sendo estudadas atualmente, podem ser citadas as tecnologias não térmicas, como alta pressão hidrostática; campos elétricos pulsados; diferentes sistemas de embalagens e a biopreservação por meio da utilização de produtos antimicrobianos naturais como sistema lactoperoxidase, bacteriocinas, lisozima, quitosana e derivados vegetais (TIWARI et al., 2009; PARDO; ZURFÍA, 2012; PEREIRA; VICENTE, 2010).

2.2 USO DE SAIS E ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE MICROBIANO DE ALIMENTOS

Os sais têm sido aplicados em alimentos para o controle do crescimento microbiano durante séculos (HARPER; GETTY, 2012). Esses agentes conservantes promovem a inibição microbiana por redução da disponibilidade de água nos produtos. A resposta dos microrganismos a um ambiente de elevada pressão osmótica, consiste basicamente no acúmulo dos solutos compatíveis, tais como betaínas, prolina e açúcares, através de seu transporte ou biossíntese, tentando assim manter o equilíbrio no interior da célula, melhorar a estabilidade de enzimas e preservar a integridade das membranas biológicas (MOLINA-HÖPPNER et al., 2004; SCYBERT et al., 2003). A redução da a_w provocada por esses solutos pode também alterar a composição das membranas celulares, aumentando a proporção de fosfolípido e/ou de glicolípídeos. Essas mudanças ocorrem como uma tentativa do microrganismo preservar os lipídios da membrana celular (RUSSEL, 1995).

Dentre os sais utilizados na preservação de alimentos, o cloreto de sódio (NaCl) é um ingrediente comumente utilizado para conferir sabor salgado e para inibir o crescimento de microrganismos contaminantes patogênicos e deteriorantes, promovendo plasmólise, lesão e a morte dos microrganismos (CHIANG; YU; CHOU, 2005). O NaCl tem sido aplicado em uma grande variedade de produtos alimentícios (SALLAMA; SAMEJIMA, 2004; KAMLEH et al., 2011), no entanto devido aos danos que o excesso desse sal pode provocar a saúde humana, os consumidores têm exigido sua redução nos alimentos. Associado a isso, vários microrganismos tem desenvolvido tolerância a este composto (LIN; CHOU, 2004).

Tendo em vista o efeito negativo de quantidades excessivas de NaCl a saúde humana, o cloreto de potássio (KCl) tem sido estudado como uma opção para a sua substituição nos alimentos, aprimorando a qualidade dos produtos e mantendo sua qualidade microbiológica (BLESA et al., 2008; CARDOSO et al., 2013; KAMLEH et al., 2011).

Os ácidos orgânicos fracos como, por exemplo, acético, láctico, benzóico e sórbico, são agentes conservantes clássicos comumente utilizados e sua aplicação em alimentos tem se mostrado de baixo custo financeiro, simples, rápida e eficiente (HUANG et al., 2010). As propriedades antimicrobianas de todos os ácidos fracos são maiores em alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,5$). Em solução aquosa, esses ácidos estão em equilíbrio dinâmico com os ácidos moleculares e seus respectivos ânions carregados, a exemplo do ácido acético com acetato. Essa condição de equilíbrio é modulada pelo pH. Por sua vez, a ação antimicrobiana

desses conservantes aumenta com a acidez, que parece ser proporcional à concentração de ácido na forma não dissociada (HUANG et al., 2010; STRATFORD et al., 2009).

Os ácidos orgânicos atuam contra os microrganismos por dois mecanismos principais: acidificação citoplasmática e pelo acúmulo de ânions de ácido dissociado a níveis tóxicos. A ação antimicrobiana dos ácidos fracos é iniciada pela rápida difusão das moléculas não dissociadas para a matriz citoplasmática. O pH nesse meio está próximo da neutralidade e faz com que as moléculas do ácido sofram dissociação em ânions e prótons, que por serem insolúveis em lipídios, se acumulam no citoplasma. O acúmulo de prótons causa uma diminuição brusca no pH intracelular, que em seguida, inibe o metabolismo da célula (STRATFORD et al., 2009). Booth (1985) referiu que a redução do pH intracelular também pode interferir na síntese de ATP, RNA e proteínas, na replicação do DNA e no crescimento celular.

Vários fatores devem ser considerados para alcançar uma ótima atividade antimicrobiana quando os ácidos orgânicos são aplicados, podendo ser citado o tipo de ácido, a concentração, o pH e a temperatura da solução, mas também o tipo, o pH e a capacidade tamponante do produto alimentar, bem como sua carga microbiana inicial (RAJKOVIC; SMIGIC; DEVLIEGHERE, 2010). Em geral, as bactérias Gram-negativas são mais suscetíveis a descontaminação com ácido orgânico do que Gram-positivas, possivelmente, pelo fato de serem mais suscetíveis à ação de compostos que interferem no transporte de íons através da membrana (VIRTO et al., 2006).

Esses ácidos são empregados em alimentos como picles, molhos para salada, maionese, pães, produtos de panificação, vinhos e sidra fermentada, doces e refrigerantes (STRATFORD et al., 2009). Podem ser aplicados ainda em carcaças de animais antes da sua refrigeração, na forma de pulverizações ou soluções de imersão. De todos os ácidos orgânicos avaliados na literatura, os ácidos acético e láctico são considerados os mais aceitáveis (RAJKOVIC; SMIGIC; DEVLIEGHERE, 2010).

Enquanto agente conservador de natureza química, o ácido acético é um ácido monocarboxílico, de fórmula molecular $C_2H_4O_2$ e estrutural CH_3COOH (Figura 1), sendo líquido transparente e incolor na sua forma pura, com um sabor e odor pungente, o que limita o seu uso em alimentos. Consiste no principal componente do vinagre e, como tal, é utilizado principalmente por suas habilidades de aromatizante. Pode ser obtido por processo biológico fermentativo ou por meios sintéticos, como a oxidação do acetaldeído. É altamente solúvel em água e é comumente aplicado em produtos em conserva (MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012).

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) é um ácido monocarboxílico de fórmula molecular $C_3H_6O_3$ e estrutural $CH_3CHOHCOOH$ (Figura 1). É produzido durante a fermentação de vários microrganismos bacterianos, incluindo bactérias ácido lácticas e apresenta aspecto líquido e coloração variando entre incolor e ligeiramente amarelado com solubilidade ilimitada em água. Pode ocorrer em duas formas isoméricas (D-, L-), e tem sido relatado que o isómero L é muito mais eficiente na inibição de agentes patogênicos (MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012). Esse ácido não possui toxicidade, o que levou ao seu uso como agente de descontaminação e é considerado um dos mais antigos conservantes em uso (LÜCK; JAGER, 2002).

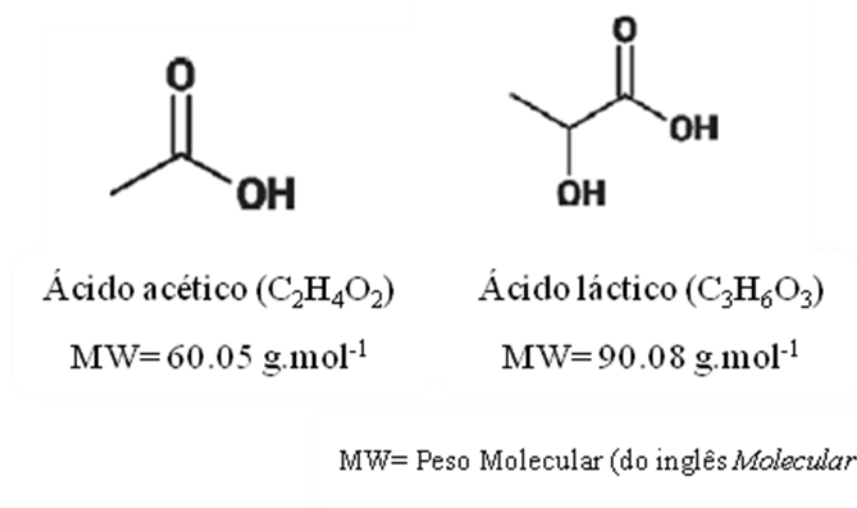


Figura 1. Estrutura química dos ácidos acético e láctico (Adaptada de Mani-lópez; García; López-Malo, 2012).

2.3 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcae*, juntamente com os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Atualmente, já foram caracterizadas 50 espécies e subespécies desse gênero (PODKOWIK; BYSTRONÍ; BANIA, 2012; SANTOS et al., 2007). As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são Gram e catalase-positivas, imóveis, não-esporuladas, geralmente não-encapsuladas, aeróbias ou anaeróbias facultativas e agem sobre carboidratos produzindo ácidos por meio de metabolismo respiratório e fermentativo (BHATIA; ZAHOOR, 2007). Consistem em cocos com diâmetro, na sua

maioria, de 0,5 a 1,5 μm , variando de acordo com a espécie e condições de cultura, e apresentam-se sob diversas formas, desde isolados, aos pares, em cadeias curtas ou agrupamentos irregulares semelhantes a cachos de uva (SANDEL; McKILLIP, 2004; SANTOS et al., 2007).

A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, é *S. aureus*, que está frequentemente relacionada a diversas infecções em seres humanos (SANTOS et al., 2007). Esta espécie também é um importante patógeno de origem alimentar e um dos principais causadores de intoxicação alimentar estafilocócica e surtos desta doença em todo o mundo (PULIDO et al., 2012).

A temperatura ótima para o crescimento de *S. aureus* está entre 35 e 41 °C, sendo, portanto classificada como mesófila, porém consegue crescer e se multiplicar entre 6 e 48,5 °C (RODRIGUEZ-CATURLA et al., 2012). Para produção de enterotoxinas requerem temperaturas entre 10 e 46 °C, com valores ótimos entre 40 e 45 °C (AYCICEK; CAKIROGLU; STEVENSON, 2005; CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002).

S. aureus é capaz de se desenvolver em uma ampla variedade de alimentos devido sua capacidade de manter-se viável em baixa atividade de água (a_w - 0,83 a 0,86), elevadas concentrações de cloreto de sódio (até 20%), e dentro de uma faixa de pH de 4 a 10, com um ótimo entre 6 e 7 (RODRIGUEZ-CATURLA et al., 2012). Quanto ao seu habitat, encontram-se amplamente distribuídos no meio ambiente, podendo ser encontrados no ar, em fezes, esgotos e, principalmente, na mucosa nasal do homem e de animais, o que favorece sua transmissão aos alimentos por manipuladores, geralmente portadores assintomáticos, e por animais, principalmente o gado leiteiro com mastite (STAMFORD et al., 2006).

A patogenicidade de *S. aureus* é muito complexa e envolve a expressão de vários fatores de virulência que são secretados ou encontram-se associados à parede celular, tais como enzimas, toxinas, proteínas e polissacarídeos. Estes fatores podem ser considerados produtos de genes acessórios que não são necessários para o crescimento e divisão celular em condições normais, mas são sintetizados durante os processos de adaptação dos microrganismos a condições ambientais adversas e injúria celular, além de contribuir para a adesão e invasão de tecidos do hospedeiro (HADDADIN et al., 2010).

A estrutura da parede celular de *S. aureus* contém polissacarídeos e proteínas antigênicas, bem como outras moléculas importantes, dentre as quais podem se citadas a proteína A, o ácido teicóico e as adesinas. A proteína A estafilocócica (SpA, do inglês *Staphylococcus protein A*) inibe a eliminação mediada por anticorpos e tem efeito antifagocitário. O ácido teicóico, por sua vez, consiste em um polissacarídeo espécie-

específico capaz de ativar a via alternativa do complemento e estimular a produção de citocinas, além de unir-se a fibronectina promovendo a adesão bacteriana. As adesinas são moléculas que se ligam aos receptores químicos encontrados na superfície das células epiteliais do hospedeiro, promovendo a aderência da bactéria (GEMMELL; O'DOWD, 1983; MURRAY; ROSENTHAL; PFAÜER, 2006; SANTOS et al., 2007).

A principal função das enzimas bacterianas é transformar componentes do hospedeiro em nutrientes, os quais podem ser utilizados pela bactéria para o seu crescimento, além de muitas vezes agirem como fatores de patogenicidade. A coagulase converte o fibrinogênio em fibrina, provocando a deposição de fibrina em torno do microrganismo, o que dificulta a fagocitose celular. Outra enzima que pode ser secretada por *S. aureus* é a catalase, capaz de converter o peróxido de hidrogênio tóxico em oxigênio e água. A despolimerização do ácido hialurônico é causada pela hialuronidase, o que favorece a disseminação do microrganismo (SANDEL; McKILLIP, 2004; SANTOS et al., 2007).

O alto potencial infeccioso de *S. aureus* também está relacionado à produção de toxinas, entre essas, as citotoxinas, as enterotoxinas estafilocócicas (SEs, do inglês *Staphylococcal Enterotoxins*) e a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), que causam toxicidade e supressão da resposta imune, liberação de mediadores inflamatórios e o extravasamento ou destruição de células endoteliais (LIN et al., 2011; PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010).

A capacidade de persistir em biofilmes por longo período de tempo também é um fator de virulência de *S. aureus*, tendo em vista que estas estruturas apresentam elevada resistência à interferência mecânica, aos mecanismos de defesa do hospedeiro e ao tratamento antimicrobiano, podendo ocasionar infecções crônicas em seres humanos e animais (PERIASAMY et al., 2012).

A instalação do quadro infeccioso ocorre mediante a liberação coordenada desses fatores de virulência, de modo que a versatilidade deste patógeno o torna capaz de ocasionar um amplo espectro de infecções variando de abscessos superficiais, como furúnculos e carbúnculos, até infecções no sistema nervoso central, respiratório e urinário, osteomielite, endocardite e síndrome do choque tóxico, septicemia, além de causar intoxicação alimentar estafilocócica (BUSTOS-MARTINÉZ; HAMDAN-PARTIDA; GUTIÉRREZ-CÁRDENAS, 2006; HECKER; ENGELMANN; CORDWELL, 2003).

As SEs são toxinas eméticas incluídas na família das toxinas pirogênicas, produzidas por espécies de estafilococos e estreptococos, apresentando relações filogenéticas, estrutura, função e atividades biológicas semelhantes. Essas proteínas bacterianas estão associadas a

doenças importantes que incluem gastroenterite estafilocócica, intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico e várias doenças alérgicas e auto-imunes (BLAIOTTA et al., 2004; QIU et al., 2010).

As enterotoxinas consistem em proteínas extracelulares de baixo peso molecular (26.900 a 29.600 dáltons), hidrossolúveis, que são capazes de resistir à inativação por proteases gastrointestinais, incluindo a pepsina, a tripsina, papaína e renina, permanecendo ativas após a ingestão. Outra característica importante das SEs é a termoestabilidade, não sendo totalmente inativadas por tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização, consistindo em um importante fator associado à segurança alimentar. Essa estabilidade a temperaturas elevadas mostra-se dependente do pH, concentração de sal e outras características ambientais relacionadas ao nível de desnaturação da toxina (BLAIOTTA et al., 2004; BORGES et al., 2008; OMOE et al., 2005; PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010).

O número de SEs conhecidas tem se expandido com detecção de novos genes e, até o momento já foram identificados mais de 20 tipos distintos, entretanto com similaridades em suas estruturas e sequências. As enterotoxinas clássicas SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED e SEE são as de maior ocorrência. Outros tipos sorológicos de SEs (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER E SEU) já foram identificados e seus genes (*seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser e seu*) correspondentes caracterizados (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010; RAJKOVIC, 2012). As SEs dos tipos SEA a SEE são responsáveis por aproximadamente 95% dos casos de intoxicação alimentar estafilocócica (CREMONESI et al., 2005). Dentre estas, SEA tem sido a toxina mais frequentemente envolvida em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica em todo o mundo (KÉROUANTON et al., 2007).

Um ampla variedade de fatores ambientais, tais como pH, a_w , temperatura, tipo de alimentos e de processamento, desempenham um papel importante na produção de SEs (SCHELIN et al., 2011). Alguns autores consideram que a contaminação de alimentos com níveis acima de 6 Log UFC.g⁻¹ desse microrganismo são suficientes para a produção de SEs (LINDQVIST; SYLVÉN; VGSHOLM, 2002).

Segundo Bennett (2005), a intoxicação alimentar estafilocócica consiste em uma gastroenterite resultante da ingestão de 100 a 200 ng de toxinas pré-formadas em alimentos. Estes níveis são alcançados quando a contagem de *S. aureus* excede 10⁵ e 10⁶ UFC por grama de alimento. Esta bactéria está em geral associada a alimentos com elevado teor protéico, que requerem manipulação durante o processamento, muitas vezes associada ao aquecimento e/ou

armazenamento inadequado destes produtos (WALLIN-CARLQUIST et al., 2010). Os alimentos frequentemente envolvidos em intoxicação alimentar estafilocócica incluem produtos cárneos, aves, ovos, leite e produtos lácteos (HAMADI et al., 2014)

Os sintomas da intoxicação iniciam-se 1 a 8 horas após a ingestão de enterotoxinas presentes no alimento, resultando em um quadro de êmese afebril aguda, cefaleia, sudorese, prostração, náuseas, dor abdominal e diarreia, que geralmente tem duração de 24 a 48 horas, mas a doença pode persistir por 7 a 10 dias (KÉROUANTON et al., 2007; LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al., 2007; NEMA et al., 2007; NORMANNO et al., 2007).

Em países desenvolvidos as despesas com tratamento dos casos de intoxicação alimentar estafilocócica são as maiores quando comparadas ao gasto com doenças ocasionadas por outros microrganismos de origem alimentar (BORGES et al., 2008; SANDEL; McKILLIP, 2004). Este tipo de intoxicação é uma das doenças re-emergentes veiculadas por alimentos ainda hoje devido a sua prevalência e o seu caráter patogênico versátil (NEWELL et al., 2010).

Estirpes de *S. aureus* podem desenvolver resistência a uma única droga e/ou a múltiplos antibióticos e representam uma grande ameaça para a saúde pública (SPANU et al., 2012). O arsenal de elementos responsável pela patogenicidade de *S. aureus* justifica sua sobrevivência frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro, bem como aos processos antimicrobianos utilizados para o seu controle (HURTATO; DE LA PARTE; BRITO, 2002).

A resistência de *S. aureus* aos antibióticos pode se desenvolver através de mutações em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes (SANTOS et al., 2007). Cepas de *S. aureus* têm apresentado resistência à penicilina, tetraciclina, eritromicina e meticilina (PODKOWIK; BYSTRONJ; BANIA, 2012). Os microrganismos patogênicos resistentes a antibióticos podem apresentar ainda resistência a várias técnicas de conservação de alimentos, tais como calor e tratamento com ácidos (KIESSLING et al., 2002; RAJU et al., 2007).

A transmissão de bactérias resistentes a antibióticos para os seres humanos através da cadeia alimentar tem sido relatada (ÂNGULO; NARGUND; CHILLER, 2004). Nos últimos anos, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês *Methicillin-Resistant S. aureus*) foi identificado em produtos alimentares derivados de animais em todo o mundo, sendo considerado um risco potencial de transmissão para a população humana em geral. Entre esses alimentos, podem ser citados frango, carne bovina, carne de carneiro, peru, carne suína processada, leite bovino e queijo mussarela (BOER et al., 2009; NORMANNO et al., 2007; SIMEONI et al., 2008; WANG et al., 2013).

2.4 MECANISMOS DE DESENVOLVIMENTO DE TOLERÂNCIA MICROBIANA

A aplicação, a níveis subletais, de condições de estresse resulta em uma população de microrganismos composta por células mortas, que são incapazes de se multiplicar sob quaisquer condições; células sobreviventes que incluem células ilesas, que são capazes de crescer e se multiplicar; e células subletalmente lesionadas, que são capazes de se multiplicar de acordo com as condições do meio (Figura 2) (WU, 2008).

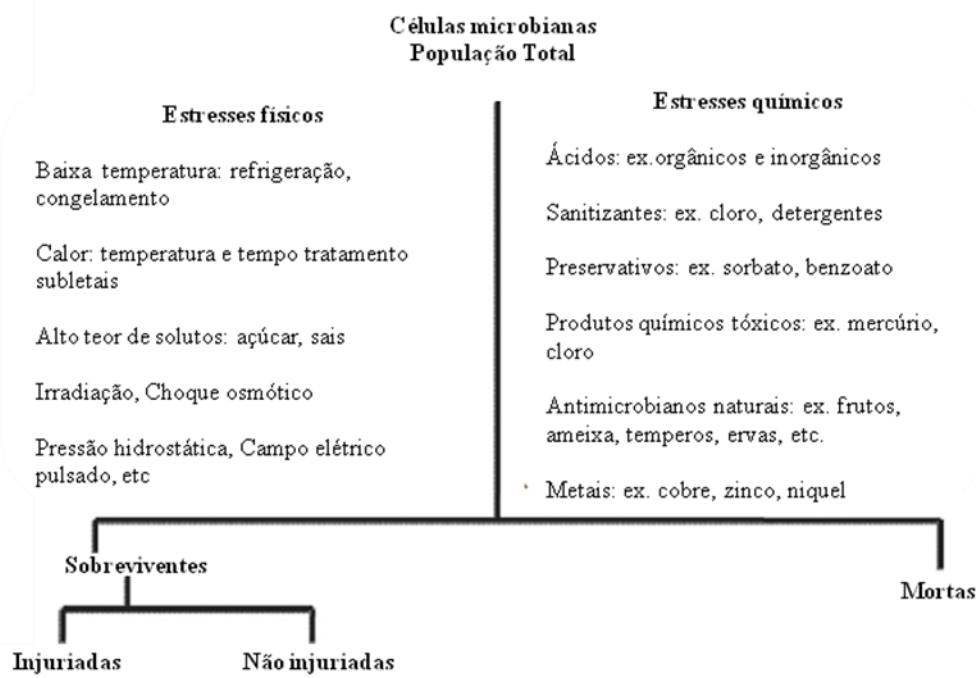


Figura 2. Efeitos de tratamentos subletais sobre as células microbianas (Adaptada de Wu, 2008).

Sob condições favoráveis, as células lesionadas podem sofrer reparo celular e proliferar a níveis reconhecidos como perigosos durante o processo de germinação, quando a água e os nutrientes são abundantes. Durante o processo de reparação, essas células podem sofrer alterações em sua virulência e/ou adquirir novas habilidades de adaptação, tolerância e resistência aos agentes estressores, consistindo em uma ameaça potencial a segurança alimentar (SILVA-ANGULO et al., 2014).

A compreensão de como as bactérias se adaptam ao estresse leve é de fundamental importância para o estudo da viabilidade da aplicação de um agente antimicrobiano. Quando

exposta a processos que causem injúria (estresse) subletal, a célula bacteriana induz a expressão de sistemas de reparação celular (KIESSLING et al., 2002; LADO; YOUSEF, 2002). A resposta ao estresse envolve a regulação da expressão gênica e o envolvimento de diversas proteínas de choque que levam a adaptação (BIKELS-GOSHEN et al., 2010).

Alterações na composição da membrana celular consistem em um dos mecanismos adaptativos dos microrganismos quando expostos a condições de estresse subletal. Chiang, Yu e Chou (2005) afirmam que o aumento das proporções de ácidos graxos saturados e insaturados poderia aumentar a resistência nessas condições, tendo em vista que o perfil de ácidos graxos da membrana afeta sua fluidez e permeabilidade e, conseqüentemente, sua funcionalidade.

A adaptação do microrganismo ao ser exposto repetidas vezes a concentrações subletais de uma agente antimicrobiano particular pode resultar no desenvolvimento de tolerância, o que repercute em aumento da sua capacidade de sobreviver mesmo quando exposto a altas concentrações (ou doses) desse agente. A exposição de bactérias ao estresse subletal pode resultar ainda em um aumento da tolerância a outros tipos de estresses não relacionados, fenômeno denominado tolerância cruzada ou proteção cruzada (SKANDAMIS et al., 2008).

O desenvolvimento de tolerância direta ou cruzada pode ser observado mediante a exposição do microrganismo ao estresse subletal, seguida por sua exposição a doses letais do mesmo estresse ou estresses antimicrobianos diferentes (SKANDAMIS et al., 2008). As condições subletais que têm demonstrado induzir respostas ao estresse, resultando em um aumento da tolerância, incluem o choque térmico, a exposição a um pH extremo, o choque oxidativo, tal como a exposição ao peróxido de hidrogênio, o stress osmótico, entre outros (CEBRIÁN et al., 2010).

A resistência bacteriana pode ocorrer de forma intrínseca ou adquirida. As alterações nos padrões de expressão genética resultantes da adaptação a condições de estresse podem selecionar ou expressar cepas resistentes. A resistência adquirida é resultante de mutações ou transferência de material genético que irão repercutir na fisiologia celular conferindo ao microrganismo a capacidade de sobreviver a determinado estresse (POOLE, 2012). De acordo com Mckeegan, Borges-Walmsley e Walmsley (2002), diferentes mecanismos estão envolvidos no processo de desenvolvimento de resistência antimicrobiana como mudanças no alvo do antimicrobiano, inativação do antimicrobiano por ação enzimática, mudanças da permeabilidade celular, efluxo ativo do antimicrobiano e aumento da produção de enzimas-alvo.

Skandamis et al. (2008) relataram que cepas de *L. monocytogenes* cultivadas sequencialmente ou simultaneamente em condição de estresse osmótico (10 % de NaCl), moderada acidez (pH 5,0) e tratamento térmico (46 °C) durante 1,5 horas apresentaram destacável desenvolvimento de osmotolerância, ácidotolerância e termotolerância, respectivamente.

A habituação de isolados de *S. aureus* resistentes e sensíveis a meticilina a concentração subletais do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, em meio Luria-Bertani durante 72 horas, resultou no desenvolvimento de resistência ao estresse, com subsequente redução da sua susceptibilidade aos efeitos deste agente e de uma série de antibióticos de uso clínico (mupirocina, ácido fusídico, cloranfenicol, linezolida e vancomicina) (McMAHON et al., 2008).

Ao avaliar o efeito de diferentes combinações de ácido acético e NaCl a pH 3,2 (valor de pH comum em vegetais acidificados, processados sem tratamento térmico) sobre a sobrevivência de *E. coli* B241 (estirpe O157: H7, isolada de bovino), foi possível observar que o NaCl apresentou um efeito protetor sobre essa cepa. A sobrevivência dessa bactéria em concentrações de ácido de 10 mM ou menos, a longo prazo (entre 50 e 100 h), foi maior a 4% de NaCl quando comparado a concentração de 2% desse sal (HOSEIN; BREIDT; SMITH, 2011).

Em investigação sobre a capacidade de *S. aureus* de desenvolver tolerância ao estresse quando exposta a condições subletais (pH ácido e alcalino, peróxido de hidrogênio, e de calor), Cebrián et al. (2010) observaram que o choque ácido resultou em efeito protetor significativo contra o peróxido de hidrogênio e contra o tratamento térmico. A exposição a pH alcalino também induziu o desenvolvimento de resistência ao peróxido de hidrogênio e o choque térmico resultou em aumento significativo da resistência deste microrganismo ao peróxido hidrogênio e aos ácidos. De acordo com esses autores, as proteínas e/ou alterações celulares induzidas pela exposição ao agente de adaptação podem ter desempenhado um efeito sobre a resistência celular aos outros agentes

Bikels-Goshen et al. (2010) ao investigarem o efeito de doses subletais do Galato de Epigallocatequina (EGCG), principal componente polifenólico de extrato de chá verde, sobre a suscetibilidade e tolerância ao calor de cepas de *S. aureus*, observaram que todas as cepas pré adaptadas ao EGCG demonstraram maior tolerância ao calor. Os autores sugeriram que a exposição a esse composto antimicrobiano pode ter resultado em um aumento na expressão de proteínas do choque térmico, contribuindo, assim, diretamente ou indiretamente, ao desenvolvimento de uma maior tolerância a esta condição de estresse.

2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO POTENCIAIS CONSERVANTES PARA USO EM ALIMENTOS

Entre as tecnologias emergentes de conservação de alimentos, o uso de agentes antimicrobianos naturais está se tornando uma medida de controle reconhecida mundialmente, seja de forma isolada ou combinada com outras tecnologias de preservação (SILVA-ANGULO, 2014). A aplicação de conservantes naturais com objetivo de aumentar a vida de prateleira de alimentos é considerada um método promissor devido as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, além de diminuir os custos de processamento e serem acreditadas de reduzirem o surgimento de microrganismos resistentes (GYAWALI; IBRAHIM, 2012).

Os preservativos naturais representam uma variedade de produtos oriundos de plantas, animais e microrganismos que consistem em uma destacável fonte de substâncias com propriedades antimicrobianas. Os efeitos da aplicação desses biopreservativos são a redução ou eliminação de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, além de fornecer benefícios à qualidade global dos produtos alimentícios (PONCE; ROURA; MOREIRA, 2011).

As plantas produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários com propriedades biológicas, tais como citotoxicidade, atividades antiparasitária e antimicrobiana (WINK, 2012). Muitos desses compostos naturalmente presentes em plantas, ervas e especiarias têm demonstrado possuir um efeito antimicrobiano contra agentes patogênicos de origem alimentar (ESPINA et al., 2011). Os extratos obtidos de uma diversidade de plantas têm sido utilizados há séculos com objetivo de conferir sabor e aroma aos alimentos, como medicamentos e como agentes conservantes de alimentos (KIM et al., 2011).

Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários de plantas sintetizados em estruturas glandulares de uma célula vegetal, podendo estar concentrados em diversas regiões (flores, brotos, folhas, sementes, frutos, raízes, galhos, cascas e madeiras), armazenados em células secretoras, cavidades ou células epidérmicas (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012; BAKKALI et al., 2008).

Vários OEs têm demonstrado capacidade de inibir bactérias patogênicas e deteriorantes de origem alimentar, de modo que a atividade antimicrobiana destas substâncias depende da sua composição química (ESPINA et al., 2011). Os OEs consistem em misturas naturais muito complexas de compostos orgânicos de baixo peso molecular com diferentes potenciais de atividade antimicrobiana (AIT-OUAZZOU et al., 2011). Esses compostos

podem ser divididos de acordo com sua estrutura química em quatro grupos: terpenos, terpenóides, fenilproenos e outros (Figura 3) (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

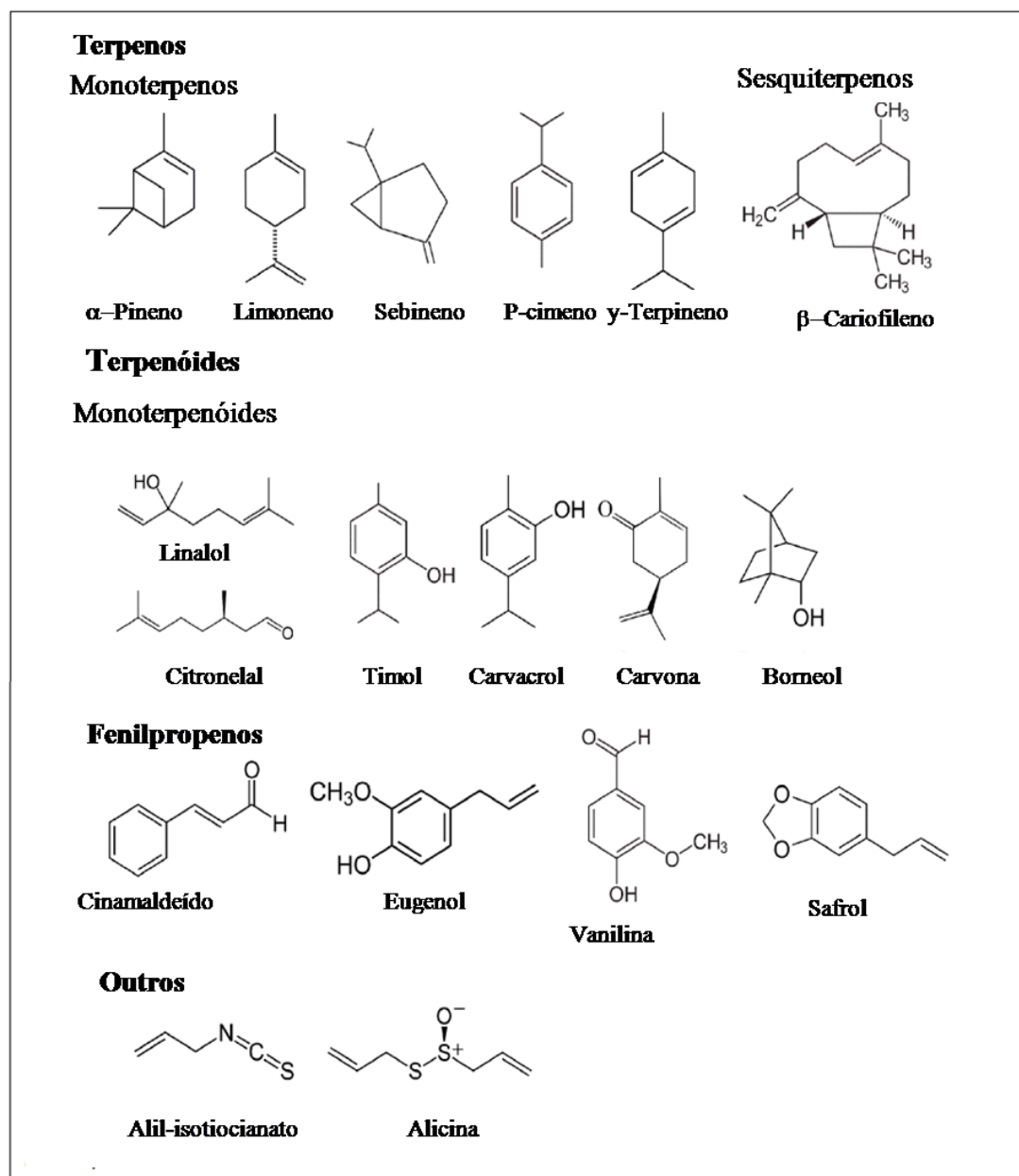


Figura 3. Estrutura química dos principais constituintes dos óleos essenciais (Adaptada de Hyldgaard; Mygind; Meyer, 2012).

Os terpenos mais comuns são os monoterpenos e sesquiterpenos, no entanto, hemiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos também podem estar presentes. Alguns terpenos são hidrocarbonetos, porém quando possuem um oxigênio em sua estrutura (álcoois, aldeídos ou cetonas), são chamados de terpenóides (BAKKALI et al., 2008). Em geral, os monoterpenos oxigenados são significativamente mais ativos do que os monoterpenos

hidrocarbonetos (AIT-OUAZZOU et al., 2011). A concentração dos componentes nos OEs varia de acordo com a espécie e parte da planta da qual foi extraído. Os OEs podem ser obtidos por extração ou fermentação, mas a destilação a vapor é o método mais comumente utilizado (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

O método e o tipo de solvente utilizado na obtenção podem interferir na composição fitoquímica, no rendimento e efeitos antimicrobianos dos OEs (BURT, 2004). A atividade inibitória dos OEs pode variar ainda de acordo com o órgão da planta da qual foram extraídos, das condições geográficas em que a planta foi cultivada, a época de colheita e as condições climáticas, pois estes fatores interferem na composição química e concentrações obtidas (OUSSALAH et al., 2007).

Alguns autores têm atribuído o potencial antimicrobiano aos componentes presentes em maior quantidade no óleo essencial, entretanto os componentes presentes em quantidade inferiores têm demonstrado exercer efeito sinérgico e/ou aditivo com os constituintes majoritários (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). A eficácia antimicrobiana dos OEs não pode ser baseada em um mecanismo de ação específico, tendo em vista que essas substâncias consistem em uma mistura de componentes químicos que irão agir em diferentes alvos na célula microbiana (Figura 4) (BURT, 2004). Supõe-se que essa característica dos OEs dificultaria o desenvolvimento de tolerância bacteriana (SKANDAMIS et al., 2008).

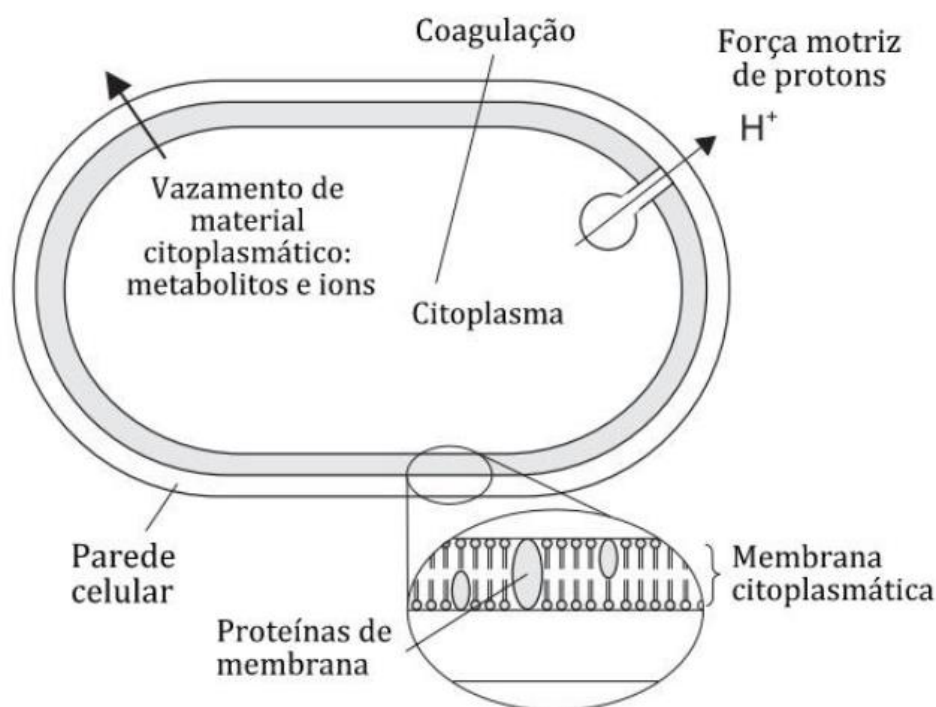


Figura 4. Representação dos mecanismos e locais da célula bacteriana que parecem ser sítios de ação para os constituintes dos óleos essenciais (Adaptada de Burt, 2004).

A atividade antimicrobiana dos OEs em matrizes alimentares tem sido avaliada em diversos estudos. No entanto, essa atividade em sistemas de alimentos é, em geral, reduzida quando comparado aos testes *in vitro*, devido à influência de gorduras, carboidratos, proteínas, sais e pH sobre a eficácia desses agentes (BURT, 2004). Segundo Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008) esses componentes nutricionais poderiam proteger as bactérias contra a ação desses compostos oriundos de plantas, além de possibilitar uma reparação mais rápida das células injuriadas em decorrência da maior disponibilidade de nutrientes neste substrato, quando comparada aos meios laboratoriais.

Nos últimos anos, uma das formas mais estudadas para aplicação dos óleos essenciais na conservação de alimentos, envolve a sua incorporação em materiais de embalagem, em filmes comestíveis e revestimentos para aumentar a vida de prateleira de alimentos minimamente processados, como, por exemplo, peixes, carnes e frutas (GUARDA et al., 2011; ITURRIAGA; OLABARRIETA; MARTÍNEZ DE MARAÑÓN, 2012; SILVA-WEISS et al., 2013).

Dentre os óleos essenciais mais investigados, àqueles obtidos da espécie *Origanum vulgare* L. têm revelado destacáveis propriedades antimicrobianas frente a bactérias patogênicas de origem alimentar, incluindo *S. aureus* (SILVA et al., 2013; SOUZA et al., 2010).

As folhas *in natura* ou secas, bem como o óleo volátil da espécie vegetal *O. vulgare* L. (OEOV) possuem sabor apreciado por consumidores em todo o mundo. Adicionalmente, têm sido utilizadas medicinalmente durante séculos por apresentarem propriedades antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antioxidante (CHUN et al., 2005; YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ, 2006).

As propriedades biológicas dos extratos e óleos essenciais de *O. vulgare* L. têm atraído o interesse de pesquisadores e da indústria alimentícia devido, principalmente, ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano. A aplicação OEOV como aditivo natural em alimentos tem sido avaliada com o objetivo de proporcionar a conservação desses produtos, como por exemplo, carne fresca de peito de frango, peixe e polvo (TEIXEIRA et al., 2013).

O OEOV consiste em uma fonte rica de monoterpenos lipofílicos, dos quais os principais responsáveis por sua atividade antimicrobiana são os isômeros carvacrol e timol (Figura 5) (SILVA et al., 2010). Esses dois componentes podem causar vários danos a célula microbiana, incluindo desintegração da membrana externa; alterações na permeabilidade da membrana celular; diminuição do conteúdo de ATP intracelular; perda de várias substâncias, tais como íons, ácidos nucleicos e aminoácidos; e depleção de proteínas envolvidas na divisão

celular (DI PASQUA et al., 2010; HELANDER et al, 1998; LAMBERT et al., 2001; ULTEE; KETS; SMID, 1999).

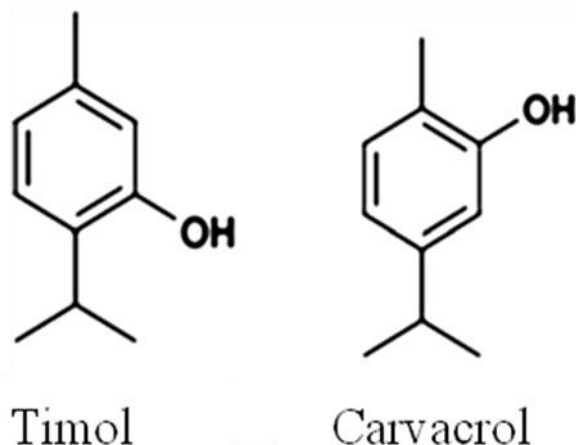


Figura 5. Estrutura molecular dos dois principais componentes do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (Adaptada de Almeida et al., 2013).

Lambert et al. (2001) sugeriram que o potencial antimicrobiano do OEOV pode ser atribuído a ação independente de seus dois principais componentes, e observaram que a adição de pequenas quantidades de OEOV, timol e carvacrol no meio de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* provocou o aumento da permeabilidade das células, perda do gradiente de pH e de íons inorgânicos.

Os danos causados a integridade celular pelos constituintes do OEOV podem interferir na manutenção do estoque energético das células e, conseqüentemente, nos processos dependentes de energia, tais como transporte de solutos; regulação do metabolismo; síntese de macromoléculas, como as toxinas extracelulares; e motilidade (COX et al., 2001; SILVA et al., 2010; TRUMPOWER; GENNIS, 1994).

Os efeitos do OEOV especificamente sobre cepas de *S. aureus* também têm sido investigados, dentre eles podem ser citados inibição da produção de SEs; perda da integridade da membrana citoplasmática, aumentando sua permeabilidade e conseqüente perda de material celular e inibição da atividade da coagulase e lipase. Em estudo realizado por Barros et al. (2009), verificou-se que o OEOV inibiu fortemente a viabilidade celular e algumas características metabólicas de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos, incluindo a atividade da coagulase, lipase e tolerância ao sal.

Souza et al. (2010) ao investigarem as propriedades antiestafilocócicas do OEOV, avaliaram sua interferência sobre a produção de enterotoxinas, a permeabilidade da membrana

celular e as características da superfície de cepas de *S. aureus* isoladas de queijo não curado. Nesse estudo, concentrações subletais do OEOV foram capazes de suprimir a produção de SEs, e a exposição destas cepas ao óleo essencial provocou, ainda, a perda de material citoplasmático e alterações na morfologia das superfícies celulares. Os autores sugeriram que essas alterações fenotípicas ocorreram devido a alterações na natureza física da membrana citoplasmática estafilocócica causada por compostos encontrados no óleo essencial.

Alguns autores afirmam ainda que ao penetrar na membrana citoplasmática, os compostos extraídos de plantas podem interferir profundamente sobre a propriedade física da dupla camada de fosfolípido, sendo que essa alteração pode prejudicar os processos de transporte transmembranar, resultando em alterações na secreção de proteínas associadas à virulência secretadas por *S. aureus* para o ambiente circundante (OKUBO et al., 1989).

A atividade antimicrobiana do OEOV sobre bactérias multirresistentes também tem sido avaliada. Nostro et al. (2004) observaram que mesmo em baixas concentrações, o OEOV foi capaz de inibir o crescimento de várias espécies bacterianas, incluindo *S. aureus* resistente a meticilina.

Um aspecto importante a ser considerado para a aplicação do OEOV como antimicrobiano natural em alimentos consiste no seu impacto sensorial sobre os produtos. Se altas concentrações são necessárias para garantir a atividade antimicrobiana, as alterações no sabor e odor dos alimentos podem exceder os limites aceitáveis. Com vistas a evitar os efeitos indesejáveis sobre os atributos sensoriais, pesquisas vêm sendo realizadas com a combinação de doses subletais desse óleo com outros agentes ou processos antimicrobianos (AZEREDO et al., 2011; DIMITRIJEVIĆ et al., 2007).

O desenvolvimento de tolerância em *S. aureus* frente a condições de estresse subletal como aplicação de calor, ácidos, sais e compostos naturais, tem sido objeto de vários estudos. No entanto, a capacidade dessa bactéria em desenvolver tolerância direta e cruzada após sua exposição a concentrações subletais do OEOV tem sido ainda pouco investigada, de modo que a avaliação da resposta desse microrganismo quando exposto a concentrações subletais desse composto poderá nortear a utilização racional e segura do OEOV em alimentos como uma alternativa para garantir a segurança microbiológica, prolongar a vida de prateleira, além de prover benefícios à qualidade global dos produtos alimentícios.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

O óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (OEOV) foi obtido através da empresa nacional Laszlo Aromaterapia Indústria e Comércio Ltda, (Minas Gerais, Brasil). Dados relacionados ao óleo essencial, tais como nome comercial, lote, nomenclatura botânica, método de extração, método de cultivo, órgão da planta do qual foi extraído, origem e composição química foram informados em certificado de análise química emitido pelo fornecedor (Anexo).

3.1.2 Sais e ácidos orgânicos

O cloreto de sódio (NaCl P.A.), o cloreto de potássio (KCl P.A.), o ácido acético P.A. e o ácido láctico P.A. (85%) utilizados foram obtidos da empresa Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os reagentes utilizados encontravam-se de acordo com os parâmetros de qualidade (aparência, cor, pureza, odor e densidade) descritos em relatório técnico de acompanhamento.

3.1.3 Microrganismos teste

As cepas bacterianas utilizadas nos ensaios antimicrobianos incluem cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de enterotoxinas isoladas de alimentos (FRI-S-6, FRI-196-E, FRI-326; Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de

Londrina) e uma cepa tipo padrão (ATCC 13565; Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba) (Tabela 1).

Tabela 1. Cepas teste de *Staphylococcus aureus*.

Cepas de <i>S. aureus</i>	Enterotoxina (SE) produzida	Origem	Referência
FRI-S-6	SEA e SEB	Camarão congelado	Wu; Bergdoll, 1971
FRI-196-E	SEA e SED	Desconhecida	
FRI-326	SEE	Refeição à base de frango	Bergdoll et al., 1971
ATCC 13565	SEA	Presunto	Johnson et al., 1991

Fonte: Ilustração do autor

FRI: Food Research Institute (Madison, Wisconsin, USA)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Padronização do inóculo bacteriano

Cada cepa foi previamente cultivada em 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI; Himedia) a 37° C por 17 horas. Em seguida, a massa celular dos cultivos foi coletada por centrifugação (4500 g por 15 minutos), lavada duas vezes em solução salina (NaCl a 0,85% p/v) e ressuspensa em 10 mL de solução salina. As suspensões microbianas foram diluídas (1:9) em uma série de 10 tubos contendo cada um 2,7 mL de solução salina (10^{-1} a 10^{-8}). Cada diluição foi padronizada em espectrofotômetro de massa a 600 nm mediante o valor de Densidade Óptica (DO), utilizando-se solução salina como branco.

Em placas de Petri contendo ágar Brain Heart Infusion (BHI; Himedia), foram semeados 0,1 mL de cada diluição da suspensão de microrganismos com auxílio de alça de Drigalsky e essas foram posteriormente incubadas a 37 °C por 24 horas. Após incubação, as placas contendo o crescimento bacteriano foram submetidas à contagem do número de colônias formadas. Com o número de colônias obtido e corrigindo-se a respectiva diluição, foi determinado o número de células contidas no tubo onde foi encontrado valor de DO_{600} de 0,1. Assim, relacionou-se a contagem bacteriana (UFC.mL⁻¹) à leitura da absorbância (DO) a

600nm. A DO do inóculo utilizado nos ensaios foi de 0,1 ($\sim 10^7$ UFC.mL⁻¹) (McMAHON et al., 2008).

3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM do OEOV, NaCl, KCl, ácido acético (AA) e ácido láctico (AL) foi determinada através do método de microdiluição em caldo (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007). Uma microplaca (96 poços) foi utilizada para o ensaio de duas cepas testes. Para determinar a CIM do OEOV foi preparada uma solução inicial na concentração de 160 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ do OEOV em caldo BHI estéril (concentração ajustada para 3 mL) usando tween 80 (1%) como emulsificante. Em todos os poços de A a C (uma cepa) e de D a F (outra cepa) foram depositados 90 μL de caldo BHI com auxílio de multipipetador. A seguir, aos poços das linhas de A a F da coluna 1 foram adicionados 90 μL da solução inicial (160 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) do óleo essencial e foram realizadas diluições seriadas ($\frac{1}{2}$). Ao final 90 μL das soluções contidas nos poços das linhas A a F da coluna 10 foram retirados e desprezados. Para determinação da CIM do NaCl e KCl foram depositados em uma microplaca 90 μL de soluções de sais em caldo BHI estéril nas concentrações 600; 400; 300; 200; 150; 100; 75; 50 mg.mL⁻¹ (Figura 7). O AA e AL foram diluídos em caldo BHI estéril para obtenção das concentrações 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e foram depositadas 90 μL das soluções em cada poço da microplaca (Figura 8).

Em seguida, 10 μL de inóculo ($\sim 10^7$ UFC.mL⁻¹) foram adicionados a cada poço. Nos poços das linhas A a F da coluna 11 foram adicionados 90 μL de caldo BHI e 10 μL de inóculo ($\sim 10^7$ UFC.mL⁻¹), como controle positivo. Nos poços das linhas A a C da coluna 12 adicionou-se 100 μL de caldo BHI (controle negativo) (Figura 6). Os sistemas foram agitados e incubados a 37 °C por 24 horas.

Ao término do período de incubação, foram adicionados 30 μL de resazurina (Sigma) preparada em solução aquosa estéril (0,01%) em todos os poços. As placas foram reincubadas a 37 °C por 20 minutos, quando então foi realizada a leitura visual. A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento das cepas, ou seja, a menor concentração capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa. A resazurina não foi

utilizada para determinação da CIM dos ácidos devido ao excesso de prótons na solução. Sendo assim, o crescimento bacteriano (turbidez) foi avaliado visualmente e a CIM foi considerada a menor concentração onde não foi observado crescimento. Os testes foram realizados triplicata.

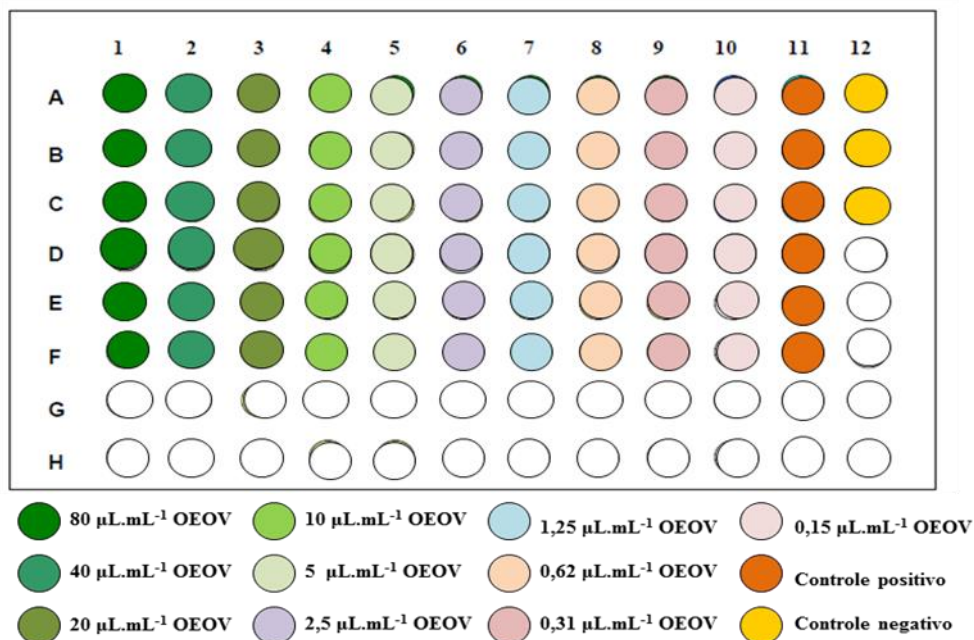


Figura 6. Configuração esquemática da microplaca para determinação da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

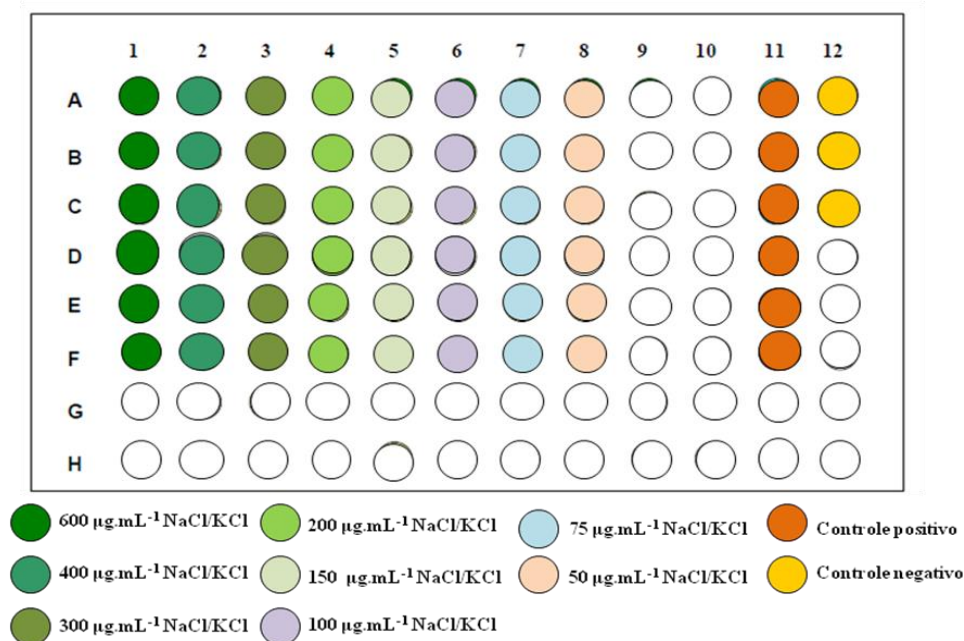


Figura 7. Configuração esquemática da microplaca para determinação da CIM do cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de potássio (KCl).

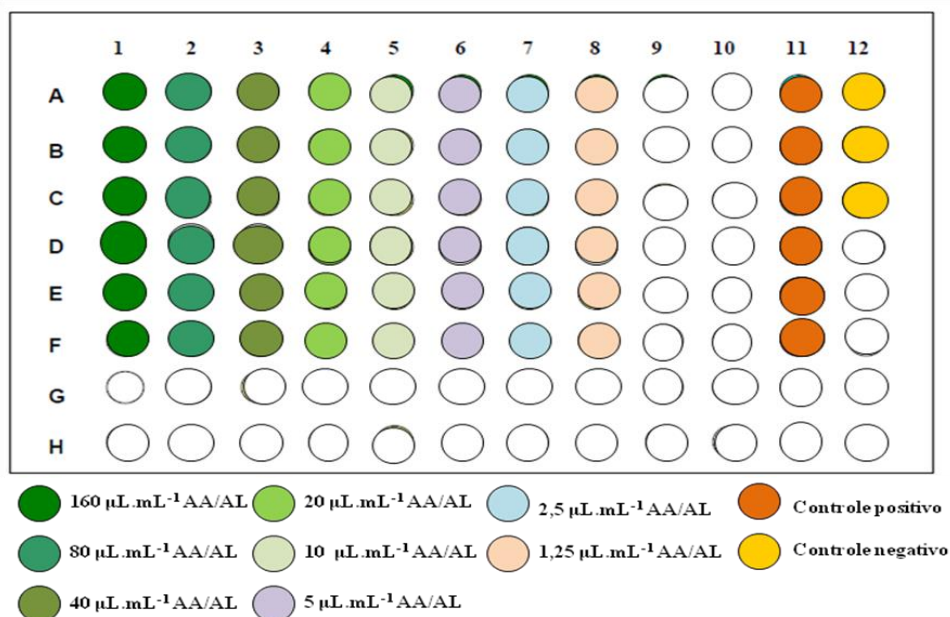


Figura 8. Configuração esquemática da microplaca para determinação da CIM do ácido acético e ácido láctico.

Todos os valores de CIM foram confirmados através de leitura da DO a 600 nm. Os valores de CIM do OVEO, NaCl, KCl, AA ou de AL foram considerados as menores concentrações em que a leitura de DO_{600} foi $< 0,01$ (McMAHON et al., 2008).

3.2.3 Ensaios de indução de tolerância bacteriana direta

A indução de tolerância direta foi realizada pela exposição das cepas teste a concentrações subletais do OEOV em caldo BHI por 72 horas, seguida pela determinação da CIM do OEOV. Para isso, 1 mL da suspensão bacteriana ($\sim 10^7$ UFC.mL⁻¹) foi inoculado em 4 mL de caldo BHI contendo o óleo essencial em quantidades apropriadas para obtenção da concentração final desejada ($\frac{1}{2}$ CIM e $\frac{1}{4}$ CIM). Esse sistema foi submetido a incubação estática a 37 °C. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, uma alíquota de cada um dos sistemas foi novamente padronizada (valor de DO_{600} igual a $0,1 \sim 10^7$ UFC.mL⁻¹ de células habitadas) e utilizada como inóculo (10 μL) para a determinação da CIM do OVEO utilizando o mesmo método de microdiluição em caldo referido anteriormente. A indução de tolerância bacteriana direta foi avaliada mediante comparação dos valores de CIM do OVEO contra as cepas

testadas antes e após o tratamento de habituação ao mesmo agente estressor. Sistemas de cultivo das cepas microbianas sem exposição ao OVEO foram ensaiados de forma semelhante (células não habituadas).

3.2.4 Ensaios de indução de tolerância bacteriana cruzada

A indução de tolerância bacteriana cruzada foi realizada através da exposição das cepas teste a quantidades subletais do OVEO em caldo BHI durante 72 horas, seguida pela determinação da CIM dos agentes antimicrobianos (NaCl, KCl, AA e AL). Para isso, 1 mL da suspensão bacteriana ($\sim 10^7$ UFC.mL⁻¹) foi inoculado em 4 mL de caldo BHI contendo o óleo essencial em quantidades apropriadas para obtenção da concentração final desejada ($\frac{1}{2}$ CIM e $\frac{1}{4}$ CIM). Esse sistema foi submetido a incubação estática a 37 °C. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, uma alíquota de cada um dos sistemas foi padronizada (valor de DO₆₀₀ igual a 0,1~ 10^7 UFC.mL⁻¹ de células adaptadas) e utilizada como inóculo (10 µL) para a determinação da CIM do NaCl, KCl, AA e AL utilizando o método de microdiluição em caldo como referido anteriormente. A indução de tolerância bacteriana cruzada foi avaliada comparando os valores de CIM de NaCl, KCl, AA e AL contra as estirpes testadas antes e após sua habituação às quantidades subletais do OVEO. Sistemas controle, onde as cepas não sofreram exposição prévia ao OVEO foram ensaiados de forma semelhante (células não habituadas).

3.2.5 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos separados, e os resultados (valores de CIM) foram expressos como valores de moda ou mediana. Nos casos onde os valores de CIM foram similares, apenas os valores modais foram considerados (McMAHON et al., 2008).

REFERÊNCIAS

AIT-OUAZZOU, A. et al. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 320–329, 2011.

ÂNGULO F.J., NARGUND V.N.; CHILLER T.C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 51, p. 374–379, 2004.

AYCICEK, H.; CAKIROGLU, S.; STEVENSON, T. H. Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. **Food Control**, v. 16, p. 531-534, 2005.

AZEREDO, G.A. et al. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541-1548, 2011.

BAJPAI, V.K.; BAEK, K.H.; KANG, S.C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722–734, 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chemistry and Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BARROS, J.C. et al. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1139–1143, 2009.

BENNETT, R. W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**. v. 68, p. 1264 – 1270, 2005.

BERGDOLL, M.S. et al. Identification of Enterotoxin E. **Infection and Immunity**, v. 4, p. 593-595, 1971.

BHATIA A.; ZAHOOR S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A Review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.1, p.188-197, 2007.

BIKELS-GOSHEN, T. et al. Staphylococcal strains adapted to Epigallocatechin Gallate (EGCG) show reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin, increased heat tolerance, and altered cell morphology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 26–31, 2010.

BLAIOTTA, G. et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719–730, 2004.

BLESA, E. et al. Microbiology and physico-chemical changes of dry-cured ham during the post-salting stage as affected by partial replacement of NaCl by other salts. **Meat Science**, v. 78, p. 135–142, 2008.

BOER, E. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 52–56, 2009.

BOOTH, I. R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 49, p. 359–378, 1985.

BORGES, M.F. et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo coalho. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1431-1438, 2008.

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

BUSTOS-MARTÍNEZ, J.A.; HAMDAN-PARTIDA, A.; GUTIÉRREZ-CÁRDENAS, M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. **Revista Biomédica**, v. 17, p. 287-305, 2006.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 1–17, 1999.

CARDOSO et al. Characterization of cooked ham containing pectin and potassium chloride. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, p. 100–108, 2013.

CEBRIÁN, G. et al. Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 26–33, 2010.

CHIANG, M.L.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Fatty acid composition, cell morphology and responses to challenge by organic acid and sodium chloride of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticu*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 179– 187, 2005.

CHUN et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809–816, 2005.

COX, S. et al. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. **Molecules**, v. 6, p. 87-91, 2001.

CREMONESI, P. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19 p. 299-305, 2005.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 263-271, 2002.

DEMIRCI, F. et al. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. **Food Control**, v.19, p. 1159–1164, 2008.

DIMITRIJEVIC, et al. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, v. 104, p. 774-782, 2007.

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

ESPINA, L. et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, p. 896-902, 2011.

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

GEMMELL, C. G.; O'DOWD, A. Regulation of protein A biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by certain antibiotics: its effect on phagocytosis by leukocytes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 12, p. 587–597, 1983.

GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 51-64, 1996.

GREENACRE, E.J.; BROCKLEHURST, T.F. The Acetic Acid Tolerance Response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 62–65, 2006.

GUARDA, A. et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144–150, 2011.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 91–97, 2008.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 29–45, 2012.

HADDADIN, R.N.S. et al. The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 1281–1291, 2010.

HAMADI, F. et al. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. **Food Control**, v. 38, p.104-108, 2014.

HARPER, N.M.; GETTY, K.J.K. Effect of salt reduction on growth of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry systems. **Journal of Food Science**, v. 77, p. M669-M674, 2012.

HAVELAAR, A.H. et al. Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S79–S94, 2010.

HECKER, M.; ENGELMANN, S.; CORDWELL, S.J. Proteomics of *Staphylococcus aureus*—current state and future challenges. **Journal of Chromatography B**, v. 787, p. 179–195, 2003.

HELANDER, L.M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3590-3595, 1998.

HOSEIN, A.M; BREIDT, F.; SMITH, C.E. Modeling the effects of sodium chloride, acetic acid, and intracellular pH on survival of *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 889–895, 2011.

HUANG, Y. et al. Evaluation of the efficacy of four weak acids as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food systems. **Food Microbiology**, v. 27, p. 33– 36, 2010.

HUANG, X. et al. Optimization on antimicrobial effects of natural compound preservative against *B. cereus* and *E. coli* by RSM. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 18, p. 383–389, 2012.

HURTATO, M.P.; DE LA PARTE, M.A.; BRITO, A. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 22, n. 2, p. 112-118, 2002.

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

ITURRIAGA, L.; OLABARRIETA, I.; MARTÍNEZ DE MARAÑÓN, I. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, p. 58–64, 2012.

JOHNSON, W. M. et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 426-430, 1991.

KAMLEH, R. et al. The effect of substitution of sodium chloride with potassium chloride on the physicochemical, microbiological, and sensory properties of Halloumi cheese. **Journal Dairy Science**, v. 95, p. 1140–1151, 2011.

KARATZAS, A.K. et al. Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 296-301, 2000.

KÉROUANTON, A. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.369–375, 2007.

KIESSLING, C.R. et al. Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates, 1999–2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 603–608, 2002.

KIM, S.Y. et al. Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. **Journal of Food Science**, v. 76, p. M41-M46, 2011.

LADO, B.H.; YOUSEF, A.E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. **Microbes and Infection**, v.4, p.433-440, 2002.

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**, v. 91, p. 453–462, 2001.

LAWRYNOWICZ-PACIOREK, M. et al. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 319-323, 2007.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 181–186, 2000.

LIN, Y.C. et al. Proinflammatory exoprotein characterization of Toxic Shock Syndrome *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry**, v. 50, p. 7157–7167, 2011.

LIN, Y.D., CHOU, C.C. Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses. **Food Microbiology**, v. 21, p. 605–610, 2004.

LINDQVIST, R.; SYLVÉN, S.; VGSHOLM, I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 155–170, 2002.

LÜCK, E.; JAGER, M. **Conservación química de los alimentos**: características, uso, efectos. 2. ed., Zaragoza: Acribia, 2002.

LV, F. et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v. 44, p. 3057–3064, 2011.

MAÑAS, P.; PAGÁN, R. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1387–1399, 2005.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H.S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v. 45, p. 713–721, 2012.

McKEEGAN, K.S.; BORGES-WALMSLEY, I.; WALMSLEY, A. Microbial and viral drug resistance mechanisms. **Trends in Microbiology**, v.10, p.8-13, 2002.

McMAHON, M.A.S. et al. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 263–268, 2008.

MOLINA-HÖPPNER, A. et al. Protective effect of sucrose and sodium treatments sublethal and lethal high-pressure chloride for *Lactococcus lactis* during. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 2013-2020, 2004.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFAÜER,, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NEMA, V.N. et al. Isolation and characterizations of heat resistant enterotoxigênico *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 29-35, 2007.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, p.S3-S15, 2010.

NORMANNO, G. et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigênico *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 290-296, 2007.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p. 191-195, 2004.

OKUBO, S. et al. The anti-haemolysin activity of tea and coffee. **Letters in Applied Microbiology**, v. 9, p. 65–66, 1989.

OMOE, K. et al. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, p. 191-198, 2005.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 414-420, 2007.

PARDO, G.; ZUFÍA, J. Life cycle assessment of food-preservation technologies. **Journal of Cleaner Production**, v. 28, p. 198-207, 2012.

PEREIRA, R.N.; VICENTE, A.A. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. **Food Research International**, v. 43, p. 1936–1943, 2010.

PERIASAMY, S. et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 1281–1286, 2012.

PINCHUK, I.V.; BESWICK, E.J.; REYES, V.E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v. 2; p. 2177-2197, 2010.

PODKOWIK, M.; BYSTRON, J.; BANIA, J. Prevalence of antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from ready-to-eat meat products. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, p. 233-237, 2012

POOLE, K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2069–2089, 2012.

PONCE, A.; ROURA, S.I.; MOREIRA, M.D.R. Essential oils as biopreservatives: different methods for the technological application in lettuce leaves. **Journal of Food Science**, v.76, p.34-40, 2011.

PULIDO, R.P. et al. Bactericidal effects of high hydrostatic pressure treatment singly or in combination with natural antimicrobials on *Staphylococcus aureus* in rice pudding. **Food Control**, v. 28, p. 19-24, 2012.

QIU, J. et al. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5846–5851, 2010.

QUESTED, T.E. et al. Trends in technology, trade and consumption likely to impact on microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S29–S42, 2010.

RAJKOVIC, A. Incidence, growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in insufficiently dried traditional beef ham “govedja prsuta” under different storage conditions. **Food Control**, v. 27, p. 369-373, 2012.

RAJKOVIC, A.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. S29–S42, 2010.

RAJU, S. et al. Increase in cell size and acid tolerance response in a stepwise adapted methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mutant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1227–1232, 2007.

RODRIGUEZ-CATURLA, M.Y. et al. Effect of pre-incubation conditions on growth and survival of *Staphylococcus aureus* in sliced cooked chicken breast. **Meat Science**, v. 92, p. 409–416, 2012.

RUSSELL, N.J. Membranes as a target for stress adaptation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 255-261, 1995.

SALLAMA, K.I.; SAMEJIMAB, K. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 37, p. 865–871, 2004.

SANDEL, M.K.; McKILLIP, J.L. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. **Food Control**, v. 15, p. 5-10, 2004.

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

SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321–324, 2007.

SCHELIN, J. et al. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 2, p. 580-592, 2011.

SCYBERT, S. et al. NaCl-sensitive mutant of *Staphylococcus aureus* has a Tn917-lacZ insertion in its ars operon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, p. 171-176, 2003.

SILVA, J.P.L. et al. Oregano essential oil: influence of the chemical composition on the inhibitory activity against *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 136-141, 2010.

SILVA, N. et al. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 19, p. 503–510, 2013.

SILVA-ANGULO, A.B. et al. Growth kinetics of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* under exposure to carvacrol and the occurrence of sublethal damage. **Food Control**, v. 37, p. 336-342, 2014.

SILVA-WEISS, A. et al. Natural additives in bioactive edible films and coatings: functionality and applications in foods. **Food Engineering Reviews**, v. 5, p. 200–216, 2013.

SIMEONI, D. et al. Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. **Food Microbiology**, v. 25, p. 196–201, 2008.

SKANDAMIS, P.N. et al. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. **Food Microbiology**, v. 25, p. 294-303, 2008.

SOFOS, J.N. Current microbiological considerations in food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, p. 87-108, 1993.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 136–141, 2012.

SOUZA, E.L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 308–311, 2010.

SPANU, V. et al. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 53–57, 2012.

STAMFORD, T.L.M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 41-45, 2006.

STEFANAKIS, M.K. et al. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. **Food Control**, v. 34, p. 539-546, 2013.

STRATFORD, M. et al. Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 37–43, 2009.

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 2707–2714, 2013.

TIWARI, B.K. et al. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5987–6000, 2009.

TRUMPOWER, B.L., GENNIS, R.B. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. **Annual Review in Biochemistry**, v. 63, p. 675–716, 1994.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4606-4610, 1999.

VIRTO, R. et al. Application of the Weibull model to describe inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by citric and lactic acid at different temperatures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 865–870, 2006.

WALLIN-CARLQUIST, N. et al. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. S69–S74, 2010.

WANG, X. et al. *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken in China. **Food Control**, v. 29, p. 103-106, 2013.

WINK, M. Medicinal Plants: A Source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 12771-12791, 2012.

WU, C.H; BERGDOLL, M.S. Stimulation of enterotoxin B production. **Infection and Immunity**, v. 3, p. 777-783, 1971.

WU, V.C.H. A review of microbial injury and recovery methods in food. **Food Microbiology**, v. 25, p. 735-744, 2008.

YANISHLIEVA, N.; MARINOVA, E.; POKORNÝ, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.108, p.776–793, 2006.

APÊNDICE

ARTIGO ORIGINAL

The habituation of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* to *Origanum vulgare* L. essential oil does not induce direct tolerance and cross-tolerance to salts and organic acids

Short ‘running title’: No bacterial tolerance induced by oregano essential oil

Contents Category: Cell and Molecular Biology of Microbes

Adassa Gama Tavares¹, Daniel Farias Marinho do Monte¹, Allan dos Reis Albuquerque², Fábio Correia Sampaio², Marciane Magnani³, José Pinto de Siqueira Júnior⁴, Evandro Leite de Souza¹

¹*Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

²*Laboratory of Oral Biology, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

³*Laboratory of Biochemistry of Foods, Department of Food Engineering, Center of Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

⁴*Laboratory of Genetics of Microorganisms, Department of Molecular Biology, Center for Sciences and Nature, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

Author for correspondence: Evandro Leite de Souza

E-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Phone number: + 55 83 3216 7807

Fax number: + 55 83 3216 7094

The work was performed in Laboratory of Food Microbiology

Federal University of Paraíba

Health Sciences Center

Department of Nutrition

58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil

SUMMARY

Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains that were isolated from foods were investigated for their ability to develop direct tolerance and cross-tolerance to sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), lactic acid (LA) and acetic acid (AA) after habituation in sublethal amounts (1/2 of the minimum inhibitory concentration, 1/2 MIC and 1/4 of the minimum inhibitory concentration - 1/4 MIC) of *Origanum vulgare* L. essential oil (OVEO). The habituation of *S. aureus* to 1/2 MIC and 1/4 MIC of OVEO did not induce direct tolerance or cross-tolerance in the tested strains. Exposing the strains to OVEO at sublethal concentrations maintained or increased the sensitivity of the cells to the tested stressing agents because the MIC values of OVEO, NaCl, KCl, LA and AA against the cells that were previously habituated to OVEO remained the same or decreased when compared with non-habituated cells. These data indicate that OVEO does not have an inductive effect on the acquisition of direct tolerance or cross-tolerance in the tested enterotoxigenic strains of *S. aureus* to antimicrobial agents that are typically used in food preservation.

INTRODUCTION

Food processing exposes spoilage and pathogenic food-related bacteria to various stress-inducing conditions, including low pH, salts or treatments with cleaners and disinfecting agents (Cebrián *et al.*, 2010). However, the use of stressing factors in food processing can cause sublethal damage to bacterial cells, and during the injury repair process, these cells could acquire new abilities to adapt to these stress-inducing agents, leading to impacts on food safety and preservation (Silva-Angulo *et al.*, 2014). These responses can also activate the intrinsic resistance mechanisms that concomitantly decrease the susceptibility of cells to other unrelated antimicrobial compounds or procedures. Cross-tolerance between stressing agents has major implications for food processing in which multiple stresses are often applied to control microbial growth and survival (Greenacre & Brocklehurst, 2006).

Staphylococcus aureus is one of the most common causes of food-borne diseases worldwide, causing a typical intoxication through the ingestion of enterotoxins that have been pre-formed in foods by enterotoxigenic strains (Wang *et al.*, 2013). Previous studies have shown that *S. aureus* is capable of developing tolerance to heat, acidic pH and salts when exposed to sublethal stress conditions (Bikels-Goshen *et al.*, 2010; Cebrián *et al.*, 2010). The tolerance acquired by *S. aureus* to many procedures used by the food industry to control bacterial growth and survival has

motivated the research and development of novel techniques to control this bacterium in foods (Luz *et al.*, 2013; Gomes Neto *et al.*, 2012).

In this context, essential oils and their related compound have received attention as alternative anti-*S. aureus* compounds to use in foods (Bakkali *et al.*, 2008). Earlier investigations revealed that *Origanum vulgare* L. essential oil (OVEO) possesses broad-spectrum antimicrobial activity (Nostro *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2009; Gomes Neto *et al.*, 2012) with a strong capacity to inhibit *S. aureus* in addition to suppressing the action of some related virulence factors in this bacterium, including enterotoxin production (Barros *et al.*, 2009). Although the anti-*S. aureus* activity of OVEO has already been reported, little attention has been paid to the response of this bacterium when exposed to sublethal amounts of this substance.

The aim of this study was to assess the effects of exposing enterotoxigenic *S. aureus* strains that were isolated from foods to sublethal OVEO concentrations for different time points on the development of bacterial direct tolerance and cross-tolerance to salts and organic acids typically used by the food industry. To the best of our knowledge, this is the first study on the induction of direct tolerance or cross-tolerance in enterotoxigenic *S. aureus* strains from foods in which the strains were submitted to OVEO habituation to modulate the MIC.

METHODS

Antimicrobial agents

The antimicrobial agents used in this study were *O. vulgare* L. essential oil (Laszlo Aromaterapia Indústria e Comércio Ltda., Minas Gerais, Brazil), sodium chloride (NaCl P.A.), potassium chloride (KCl), glacial acetic acid (AA) and lactic acid 85% (LA). The NaCl, KCl, AA and LA were obtained from Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, Brazil). All of the compounds were in accordance with the quality parameters (appearance, color, purity, odor and density) described in the accompanying technical reports.

OVEO solutions ($40 - 0.3 \mu\text{L mL}^{-1}$) were prepared in sterile brain heart infusion (BHI) broth (Himedia) with Tween 80 (1%) as an emulsifier. The given concentration of Tween 80 caused no bacterial growth inhibition. Solutions of NaCl ($600 - 50 \text{ mg mL}^{-1}$), KCl ($600 - 50 \text{ mg mL}^{-1}$), acetic acid ($160 - 1.25 \mu\text{L mL}^{-1}$) and lactic acid ($160 - 1.25 \mu\text{L mL}^{-1}$) were prepared in sterile BHI broth.

Bacterial strains

The test organisms used in this study included enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods (FRI-S-6, producing staphylococcal enterotoxins (SE) A and B, which were isolated from frozen shrimp; FRI-196-E, producing SEA and D, which were isolated from an unknown food; and FRI-326, producing SEE, which was isolated from a chicken-based meal) (Wu & Bergdoll, 1971; Bergdoll et al., 1971) and were generously provided by Dr. Merlin Bergdoll from the Food Research Institute (Madison, Wisconsin, USA). A standard type strain (ATCC 13565, producing SEA, isolated from ham) (Johnson et al., 1991) was also used as a test strain. Stock cultures were kept at 4 °C, and prior to being used in the assay, each strain was grown in BHI broth at 37 °C overnight (approx. 18 h), harvested by centrifugation (4500 g, 15 min, 4 °C), washed twice in sterile saline solution (NaCl, 0.85%) and resuspended in sterile saline solution to obtain standard cell suspensions with OD₆₀₀ values of 0.1 (c.a. 10⁷ CFU mL⁻¹) (McMahon et al., 2008).

Determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

A modified microtiter plate assay was used to determine the MIC of OVEO, NaCl, KCl, acetic acid (AA) and lactic acid (LA) (Sarker *et al.*, 2007). The 96-well plates were prepared by dispensing 90 µL of OVEO (40 to 0.3 µL mL⁻¹), salt (600 – 50 mg mL⁻¹) or acid (160 to 1.25 mL mL⁻¹) solutions into 90 µL of doubly concentrated BHI broth in each well. Finally, 10 µL of a bacterial suspension (c.a. 10⁷ CFU mL⁻¹) was added to each well. The microplate was wrapped loosely with cling film to ensure the bacteria would not become dehydrated and the OVEO would not volatilize. Each plate included a set of controls without the antimicrobial test agents. The plates were prepared in triplicate, and they were incubated at 37 °C for 24 h. After the incubation period, 30 µL of 0.01% resazurin (Inlab) was added to each well, with the exception of the assays containing AA and LA. Color changes were then assessed visually after 20 min at 37 °C. Bacterial growth was indicated by color changes in each well from purple to pink (or colorless). The lowest concentration at which no color change occurred was recorded as the MIC value. For the assays containing AA and LA, the bacterial growth (turbidity) was assessed visually, and the lowest concentration at which no growth was observed was considered the MIC value.

Assaying the induction of direct-tolerance

The induction of direct-tolerance was performed by exposing the test strains to sublethal OVEO concentrations in broth overnight, followed by a determination of the MIC values for the same stressing agent. For this measurement, 4 mL of BHI broth was inoculated with 1 mL of bacterial suspension (c.a. 10⁷ CFU mL⁻¹); thus, OVEO was added at the appropriate amount to

obtain the desired final concentration ($\frac{1}{2}$ MIC or $\frac{1}{4}$ MIC), followed by static incubation at 37 °C. An aliquot of each system was taken after 24, 48 and 72 h of incubation (and standardized again to OD₆₀₀ values of 0.1, c.a. 10^7 CFU mL⁻¹ of habituated cells) and used as inoculum (10 µL) to determine the OVEO MIC by using the same microdilution method cited above. The induction of direct tolerance in the bacteria was assessed by comparing the MIC of OVEO against those of the tested strains before and after the habituation treatment with the same stressing agent. Control systems without exposure to OVEO were assayed similarly (by non-habituation treatment).

Assaying the induction of cross-tolerance

The induction of bacterial cross-tolerance was performed by exposing the test strains to sublethal amounts of OVEO in broth overnight, followed by determination of MIC values of the assayed heterologous stressing agents (NaCl, KCl, AA and LA). For this assessment, 4 mL of BHI broth was inoculated with 1 mL of bacterial suspension (c.a. 10^7 CFU mL⁻¹); thus, the OVEO was added at an appropriate amount to obtain the desired final concentration ($\frac{1}{2}$ MIC or $\frac{1}{4}$ MIC), followed by static incubation at 37 °C. After 24, 48 and 72 h of incubation, an aliquot of each system was taken (standardized again to OD₆₀₀ values of 0.1, c.a. 10^7 CFU mL⁻¹ of habituated cells) and used as an inoculum (10 µL) to determine the MIC of the NaCl, KCl, AA and LA by using the same microdilution method cited above. The induction of bacterial cross-tolerance was assessed by comparing the MIC values of NaCl, KCl, AA and LA against the tested strains before and after the habituation treatment with sublethal amounts of OVEO. Control systems without OVEO exposure were assayed similarly (non-habituation treatment).

All observed MIC values were confirmed as the lowest concentrations of OVEO, NaCl, KCl, AA or LA at which the OD reading was < 0.01 at 660 nm (McMahon *et al.*, 2008). The assays were performed in triplicate on three separate experiments, and the results were expressed as modal or median values; where the values were the same, only the modal values were presented (McMahon *et al.*, 2008).

RESULTS AND DISCUSSION

The habituation effects of some enterotoxigenic *S. aureus* strains on the development of bacterial direct-tolerance and cross-tolerance after different intervals of exposure to sublethal concentrations of OVEO with regards to the modulation of MIC values were assessed in this study. The MIC values of OVEO against the test strains ranged from 2.5 to 10 µL mL⁻¹ (Table 1).

NaCl, KCl, AA and LA yielded MIC values of 200 mg mL⁻¹, 300 mg mL⁻¹, 2.5 µL mL⁻¹ and 10 µL mL⁻¹ against all the assayed strains.

The OVEO MIC values against the habituated cells were maintained or decreased up to five-fold when compared with the previously determined MIC values (10 µL mL⁻¹ to 0.6 µL mL⁻¹) (Table 2), indicating that there was no induction of direct tolerance in these cells following OVEO habituation over 72 h. The decreased MIC of OVEO against habituated enterotoxigenic *S. aureus* cells was related to time of exposure to the sublethal concentrations of this substance because the smaller MIC values were generally found against cells that were pre-exposed to OVEO for 72 h, when compared with non-habituated cells (control assay). During all of the assessed time intervals, the OVEO MIC values against non-habituated cells ranged from 5 to 10 µL mL⁻¹.

This lack of direct-tolerance induction in the test strains following different OVEO habituation times is interesting; previous studies showed that *S. aureus* was able to develop tolerance after being exposed to other sublethal environmental conditions. The habituation of *S. aureus* CECT 4459 from 5 min to 2 h to stress conditions caused by acid (hydrochloric acid pH 2.5), alkali (sodium hydroxide pH 12.0), hydrogen peroxide (50 mM) and heat (58 °C) in tryptone soy broth resulted in increased direct tolerance to all tested antimicrobial agents when the survivor/death curves (viable cell counts) were observed. The development of bacterial cross-tolerance to hydrogen peroxide and acid after submitting the cells to heat shock, in addition to their increased tolerance to heat and hydrogen peroxide after acid shock, was already reported (Cebrián *et al.*, 2010).

Another study assessed the increased resistance (by employing viable cell counts) of four enterotoxigenic strains of *S. aureus* (CECT 976, CECT 4459, CECT 4465 and CECT 4466 that produced SEA, B, C and D, respectively) after habituating to a high temperature (58 °C) in McIlvaine citrate phosphate buffer, and the development of heat tolerance was observed upon the entry of cells into the stationary phase of growth (Cebrián *et al.*, 2007). The susceptibility of methicillin-resistant/-sensitive *S. aureus* isolates to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil (TTEO) and to antibiotic were determined by modulating the MIC values following a 72 h habituation to sublethal TTEO concentrations in Luria-Bertani broth. This habituation led to stress-hardening with a subsequent increase in the MIC values (≥ 2 -fold increase) of TTEO and of different clinically important antibiotics (mupirocin, chloramphenicol, linezolid and vancomycin) (McMahon *et al.*, 2008).

In accordance with the direct tolerance results, the MIC values for NaCl, KCl, AA and LA against the OVEO-habituated cells were the same or decreased (two- to six-fold) in each assessed exposure time interval when compared with MIC values against non-habituated cells (control

cells) (Table 3). However, for most of the assessed time intervals, the MIC values remained the same. There was no clear time-of-habituation effect on OVEO in relation to the sensitivity of habituated cells to NaCl, KCl and LA. Otherwise, the decrease in the MIC values of AA against habituated-cells always occurred after 48 h (*S. aureus* ATCC 13565) or 72 h (*S. aureus* FRI-S-6) of exposure to sublethal amounts of OVEO.

An early study employing an overnight *S. aureus* ATCC 6538 exposure to sublethal concentrations of OVEO (2.5 and 1.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$) or carvacrol (1.25 and 0.6 $\mu\text{L mL}^{-1}$) in a meat-based broth induced no direct or cross-tolerance to NaCl (100 g l^{-1} , at 37 °C), lactic acid (pH 5.2, at 37 °C) and high temperature (45 °C) when assessed by viable cell count (growth/survival behavior) and exposed for 240 min to the stressing agents (Luz *et al.*, 2013). Gomes Neto *et al.* (2012) reported that the overnight cultivation of *S. aureus* ATCC 6538 in meat broth containing the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO), and its majority compound 1,8-cineole (CIN), at sublethal amounts (ROEO 10 and 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$; CIN 20 and 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$), induced no direct or cross-tolerance (NaCl 100 g l^{-1} ; lactic acid pH 5.2; high temperature 45 °C) in the tested bacteria when assessed by viable cell count and growth/survival behavior. The cells submitted to pre-habituation with ROEO or CIN revealed an increased sensitivity to LA, high temperature and NaCl when compared with the non-habituated cells. These investigators suggested that the repeated exposure of *S. aureus* cells to amounts of essential oils (or related compounds) lower than their MICs could cause an imbalance between the anabolism and catabolism that was sufficient to stop growth and cause the cells to be unable to maintain their viability.

The sublethal injury caused by phenolic compounds in essential oils, such as the carvacrol and thymol present in OVEO (Barros *et al.*, 2009; Luz *et al.*, 2013), can result in a damaged bacterial cell membrane, with changes in its structure and permeability, and it can interfere with the structure of the bacterial envelopes that facilitate antimicrobial compound access to the target cells (Espina *et al.*, 2013). Furthermore, an injury of the microbial cell membrane provided by sublethal concentrations of antimicrobial compounds may affect the ability of the membrane to osmoregulate the cell adequately or to exclude toxic materials (Carson *et al.*, 2002), and consequently, the decreased tolerance to salts or acids caused by OVEO may be related to membrane damage in sublethally injured bacteria. Barros *et al.* (2009) reported that the cultivation of *S. aureus* strains isolated from foods in nutrient broth containing sublethal concentrations of OVEO (0.3 and 0.15 $\mu\text{L mL}^{-1}$) for 24 h interfered with the metabolic activity of the assayed strains with a reduction in salt (NaCl) tolerance, in addition to inhibiting the activity of the enzymes lipase and coagulase and enterotoxin production. These researchers stated that the decreased salt tolerance could be related to membrane damage

caused by OVEO in sublethally injured *S. aureus* cells. However, the ability of essential oils, including OVEO, to suppress enzyme synthesis and activity in *S. aureus* resulted in blocked protein synthesis (Nostro *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2010; Gomes Neto *et al.*, 2012). This action could also be related to the difficulty of the different enterotoxigenic strains of *S. aureus* in developing direct tolerance or cross-tolerance under the conditions used in this study.

CONCLUSIONS

The results from this study confirm that OVEO is an effective anti-staphylococcal substance because exposing enterotoxigenic *S. aureus* strains to sublethal amounts of OVEO caused no direct tolerance and cross-tolerance induction to stressing agents, such as NaCl, KCl, LA and AA. These compounds are typically applied in food conservation systems to control microbial growth and survival. Exposing the test strains to sublethal concentrations of OVEO maintained or increased susceptibility to the same stressing agent and to the assayed heterologous stressing agents, suggesting that OVEO had no impact on the induction of tolerance in enterotoxigenic strains of *S. aureus*.

REFERENCES

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils-A review. *Food Chem Toxicol* **46**, 446–475.
- Barros, J. C., Conceição, M. L., Gomes Neto, N. J., Costa, A. C. V., Siqueira Júnior, J. P., Basílio Junior, I. D. & Souza, E. L. (2009).** Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT - Food Sci Technol* **42**, 1139–1143.
- Bergdoll, M. S., Borja, C. R., Robbins, R. N. & Weiss, K. F. (1971).** Identification of Enterotoxin E. *Infect Immun* **4**, 593–595.
- Bikels-Goshen, T., Landau, E., Saguy, S. & Shapira, R. (2010).** Staphylococcal strains adapted to epigallocatechin gallate (EGCG) show reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin, increased heat tolerance, and altered cell morphology. *Int J Food Microbiol* **138**, 26–31.

Carson, C. F., Mee, B. J. & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assay and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1914–1920.

Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S. & Mañas, P. (2007). Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *Int J Food Microbiol* **118**, 304–311.

Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S. & Mañas, P. (2010). Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. *Int J Food Microbiol* **140**, 26–33.

Espina, L., García-Gonzalo, D., Laglaoui, A., Mackey, B. & Pagán, R. (2013). Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *Int J Food Microbiol* **161**, 23–30.

Greenacre, E. J. & Brocklehurst, T. F. (2006). The acetic acid tolerance response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella Typhimurium*. *Int J Food Microbiol* **112**, 62–65.

Gomes Neto, N. J., Luz, I. S., Tavares, A. G., Honorio, V. G., Magnani, M. & Souza, E. L. (2012). *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its majority compound 1,8-cineole at sublethal amounts induce no direct and cross protection in *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. *Foodborne Pathog Dis* **9**, 1071–1076.

Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E., Pollard, D. R. & Rozee, K. R. (1991). Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**, 426–430.

Luz, I. S., Gomes Neto, N. J., Tavares, A. G., Nunes, P. C., Magnani, M. & Souza, E. L. (2013). Lack of, induction of direct protection or cross-protection in *Staphylococcus aureus* by sublethal concentrations of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol in a meat-based medium. *Arch Microbiol* **195**, 587–593.

McMahon, M. A. S., Tunney, M. M., Moore, J. E., Blair, I. S., Gilpin, D. F. & McDowell, D. A. (2008) Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *Lett Appl Microbiol* **47**, 263–268.

Nostro, A., Bisignano, G., Cannatelli, M. A., Crisafi, G., Germano, M. P. & Alonzo, V. (2001). Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* **17**, 517–520.

Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Roccaro, A. S. & Alonzo, V. (2004). Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett* **230**, 191–195.

Oliveira, C. E. V., Stamford, T. L. M., Gomes Neto, N. J. & Souza, E. L. (2010). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *Int J Food Microbiol* **137**, 312–316.

Sarker, S. D., Nahar, L. & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* **42**, 321–324.

Silva-Angulo, A. B., Zanini, S. F.; Rodrigo, D.; Rosenthal, A. & Martinez, A. (2014). Growth kinetics of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* under exposure to carvacrol and the occurrence of sublethal damage. *Food Control* **37**, 336–342.

Souza, E. L., Barros, J. C., Gomes Neto, N. J., Conceição, M. L. & Costa, A. C. V. (2009). Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Braz J Microbiol* **40**, 386–392.

Wang, X., Tao, X., Xia, X., Yang, B., Xi, M., Meng, J., Zhang, J. & Xu, B. (2013). *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken in China. *Food Control* **29**, 103–106.

Wu, C.-H., Bergdoll, M. S. (1971). Stimulation of enterotoxin B production. *Infect Immun* **3**, 777–783.

Table 1. The minimum inhibitory concentration of the essential oil from *O. vulgare* L. against different enterotoxigenic strains of *S. aureus* that were isolated from foods

Strains	MIC of OVEO ($\mu\text{L mL}^{-1}$)
<i>S. aureus</i> FRI-S-6	2.5
<i>S. aureus</i> FRI-196-E	2.5
<i>S. aureus</i> FRI-326	10
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	10

MIC: Minimum Inhibitory Concentration; OVEO: *O. vulgare* L. essential oil.

Table 2. The minimum inhibitory concentration of the essential oil from *O. vulgare* L. against different enterotoxigenic strains of *S. aureus* that were isolated from foods, with or without habituation to the same stressing agent for 72 h

Strains	Treatment	MIC ($\mu\text{L mL}^{-1}$)		
		24 h*	48 h*	72 h*
<i>S. aureus</i> FRI-S-6	Control (0 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	5.0	5.0	2.5
	$\frac{1}{2}$ MIC OVEO (1.25 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	2.5	1.25	0.6
	$\frac{1}{4}$ MIC OVEO (0.6 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	2.5	1.25	0.6
<i>S. aureus</i> FRI-196-E	Control (0 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	5.0	2.5	2.5
	$\frac{1}{2}$ MIC OVEO (1.25 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	0.6	0.6	0.6
	$\frac{1}{4}$ MIC OVEO (0.6 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	0.6	0.3	0.6
<i>S. aureus</i> FRI-326	Control (0 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	10	5	5
	$\frac{1}{2}$ MIC OVEO (5 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	1.25	0.6	0.6
	$\frac{1}{4}$ MIC OVEO (2.5 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	0.6	0.6	0.6
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	Control (0 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	10	5	5
	$\frac{1}{2}$ MIC OVEO (5 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	1.25	0.6	0.6
	$\frac{1}{4}$ MIC OVEO (2.5 $\mu\text{L OVEO mL}^{-1}$)	1.25	0.6	0.6

* Hours of previous habituation or not in the assayed sublethal concentrations of *O. vulgare* L. essential oil; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; OVEO: *O. vulgare* L. essential oil.

Table 3. The minimum inhibitory concentrations of sodium chloride, potassium chloride, acetic acid and lactic acid against enterotoxigenic strains of *S. aureus* that were isolated from foods, with or without habituation to the essential oil from *O. vulgare* L. for 72 h

Strains	Treatment	Sodium chloride			Potassium chloride			Acetic acid			Lactic acid		
		MIC (mg mL ⁻¹)			MIC (mg mL ⁻¹)			MIC (μL mL ⁻¹)			MIC (μL mL ⁻¹)		
		24 h*	48 h*	72 h*	24 h*	48 h*	72 h*	24 h*	48h*	72h*	24 h*	48h*	72h*
<i>S. aureus</i> FRI-S-6	Control (0 μL OVEO mL ⁻¹)	200	200	200	300	200	300	2.5	2.5	2.5	10	5	5
	½ MIC OVEO (1.25 μL OVEO mL ⁻¹)	150	50	100	200	200	300	2.5	2.5	1.25	10	5	5
	¼ MIC OVEO (0.6 μL OVEO mL ⁻¹)	150	50	75	200	300	300	2.5	2.5	1.25	10	5	5
<i>S. aureus</i> FRI-196-E	Control (0 μL OVEO mL ⁻¹)	200	200	150	300	300	300	2.5	2.5	2.5	10	5	5
	½ MIC OVEO (1.25 μL OVEO mL ⁻¹)	150	150	75	300	300	150	2.5	2.5	2.5	10	5	5
	¼ MIC OVEO (0.6 μL OVEO mL ⁻¹)	150	200	150	300	300	300	2.5	2.5	2.5	10	5	5
<i>S. aureus</i> FRI-326	Control (0 μL OVEO mL ⁻¹)	200	150	150	300	300	300	2.5	2.5	2.5	10	5	5
	½ MIC OVEO (5 μL OVEO mL ⁻¹)	50	50	100	50	50	100	2.5	2.5	2.5	5	5	5
	¼ MIC OVEO (2.5 μL OVEO mL ⁻¹)	100	150	100	200	200	200	2.5	2.5	2.5	10	5	5
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	Control (0 μL OVEO mL ⁻¹)	150	150	200	300	300	300	2.5	2.5	2.5	10	5	5
	½ MIC OVEO (5 μL OVEO mL ⁻¹)	50	50	100	50	50	50	2.5	1.25	1.25	5	5	5
	¼ MIC OVEO (2.5 μL OVEO mL ⁻¹)	100	100	150	150	200	200	2.5	1.25	1.25	10	5	5

* Hours of previous habituation (or not) to *O. vulgare* L. essential oil at the assayed sublethal concentrations; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; OVEO: *O. vulgare* L. essential oil.

ANEXO

CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL



Universidade Federal de Minas Gerais
 Instituto de Ciências Exatas
 Departamento de Química / Colegiado de Extensão
 Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

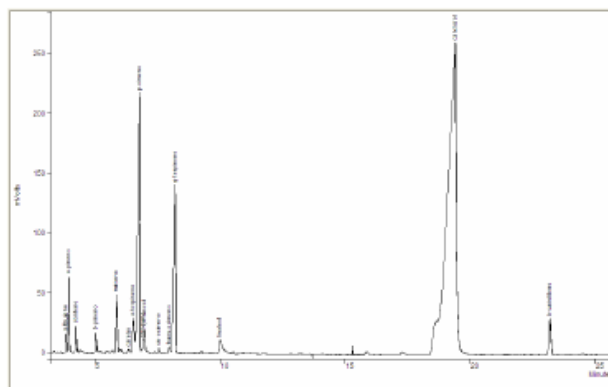
Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

Nome comercial: Orégano orgânico.
 Lote: szb1206
 Nomenclatura botânica: Origanum vulgare.
 Extração: Destilação por arraste a vapor.
 Método de cultivo: orgânico certificado.
 Parte da planta: folhas.
 Origem: Hungria.

Composição Química:

Pico	Constituinte ID	%
1	α -thujeno	0,4
2	α -pineno	1,8
3	canfeno	0,7
4	β -pineno	0,6
5	mirceneno	1,9
6	careno	0,1
7	α -terpineno	1,6
8	p-cimeno	13,9
9	limoneno	0,3
10	1,8-cineol	0,6
11	cis-ocimeno	0,2
12	trans-ocimeno	0,3
13	γ -terpineno	7,8
15	linalool	1,1
18	carvacrol	66,9
19	β -cariofileno	1,6



Dra. Vany Ferraz
 Laboratório de Cromatografia
 Departamento de Química – UFMG
 vanyferraz@ufmg.br
 Belo Horizonte, 20/10/2008

Método de análise:
 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
 Coluna: HP1 25m x 0,25mm (HP). Temperaturas: Coluna: 40°C (3min), 3°C/min, até 150°C.
 Injetor: 250°C Split: 1/200. Detetor FID: 250°C. V. volume de injeção: 1 μ l (conc 0,5% em hexano)

Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos