



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Influência de compostos de origem natural em microrganismos de origem alimentar e clínica

Adriana Raquel Duarte Oliveira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Fernanda Domingues
Coorientador: Doutora Susana Ferreira

Covilhã, junho de 2016

Agradecimentos

Ao terminar esta etapa sinto-me grata às pessoas que de alguma forma tornaram este trabalho possível, desde já, um bem-haja a todos.

Começar por agradecer à Universidade da Beira Interior e ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde por terem possibilitado a execução do presente trabalho.

À Professora Doutora Fernanda Domingues, pela orientação, pela atenção e constante encorajamento, mas também por todos os conhecimentos que transmitiu.

À Doutora Susana Ferreira, pela orientação, pelo tempo despendido, pela paciência, pela motivação e amizade que transmitiu.

Às minhas colegas de laboratório, pelo carinho, companheirismo e amizade que transmitiram, agradecendo de forma especial à Sofia, pela boa disposição, preocupação e constante incentivo, e à Beatriz, por me ouvir, pela companhia e paciência na hora de almoço.

À Mestre Joana Tomás pelos conhecimentos de estatística que transmitiu.

Aos meus colegas do Centro de Investigação em Ciências da Saúde pelas suas palavras de incentivo e pelos momentos de descontração.

Às minhas amigas, Inês, Margarida, Vera e Mariana pela amizade e apoio, agradecendo especialmente à Inês e à Margarida por terem estado sempre disponíveis quando mais precisei.

À minha família, em especial à minha prima Carolina, tio e padrinho Zé e tia Sandra por todo o apoio e carinho.

À minha mãe e ao meu pai, os dois grandes pilares da minha vida, pelo apoio incondicional e pela constante motivação. Sem eles nada disto seria possível.

Ao Alípio, por me fazer sorrir, pela compreensão e por acreditar sempre em mim.

Resumo

O uso indiscriminado dos agentes antimicrobianos, nomeadamente antibióticos e biocidas, levou ao desenvolvimento de resistências em bactérias de origem alimentar e hospitalar. Estas resistências representam uma ameaça à saúde pública, pois reduzem a eficácia dos mesmos compostos, aumentando desta forma a mortalidade e a morbilidade. Assim, torna-se fundamental o estudo de novos compostos antimicrobianos no controlo do crescimento e disseminação dos mesmos agentes patogénicos. Os compostos de origem natural têm sido apresentados como alternativas promissoras aos agentes antimicrobianos atualmente utilizados, não só como possíveis conservantes alimentares, mas também como adjuvantes do processo de desinfeção de superfícies. Em alguns casos, a exposição das bactérias a concentrações subinibitórias dos compostos naturais pode levar a adaptação aos mesmos e ao desenvolvimento de resistências homólogas e/ou cruzadas a outros agentes. Neste trabalho, foi avaliada a influência de concentrações subinibitórias de resveratrol sobre bactérias problemáticas, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* relativamente ao desenvolvimento de resistência homóloga e cruzada a antibióticos, habitualmente utilizados no tratamento de infeções causadas por estas bactérias, e a um desinfetante frequentemente utilizado no sector alimentar. Foi ainda avaliado, se as mesmas concentrações de resveratrol poderiam levar a uma proteção celular contra condições adversas, nomeadamente stress ácido e térmico. Os resultados sugeriram, de um modo geral, que o resveratrol não levou ao desenvolvimento de resistência homóloga nem cruzada, evidenciado, no entanto, um aumento da tolerância ao stress térmico e ácido em *L. monocytogenes*, mas para *S. aureus* este comportamento não foi muito evidente. Estes resultados apoiam a possibilidade da utilização do resveratrol como conservante alimentar. Por outro lado, a desinfeção representa um processo fundamental no controlo e disseminação dos microrganismos, sendo também relevante encontrar novas alternativas para colmatar a falta de antimicrobianos eficazes na eliminação de bactérias problemáticas na prática clínica. Assim, no presente trabalho foi também avaliado o potencial sinérgico do linalool, composto maioritário do óleo essencial de coentros, em combinação com desinfetantes habitualmente utilizados em ambiente hospitalar, sobre *Acinetobacter baumannii* e *S. aureus*. Em *A. baumannii*, foi observado que o linalool em combinação com o cloreto de benzalcónio ou a clorohexidina digluconato tem um efeito sinérgico, e em combinação com o ácido peracético ou o hipoclorito de sódio tem um efeito aditivo. No caso do *S. aureus* evidenciou-se um efeito aditivo para todas as interações. Assim, o linalool apresenta potencial em futuras combinações com desinfetantes.

Palavras-chave

Resveratrol, linalool, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, adaptação, proteção celular, sinergismo.

Abstract

The indiscriminate use of antimicrobials, namely antibiotics and biocides, has led to the development of resistance in foodborne and hospital pathogens. This resistance represents a serious threat to public health, because it reduces the overall effectiveness of antimicrobials, thereby increasing mortality and morbidity. Thus, it becomes extremely relevant to study new antimicrobial compounds that can control the growth and spread of these pathogens. Natural products have been considered as promising alternatives to the antimicrobial agents currently used, not only as possible food preservatives but also as adjuvants for the disinfection process of surfaces. In some cases, exposure of the bacteria to subinhibitory concentrations of natural compounds can lead to adaptations to the same products and to the development of homologous and/or cross-resistance to other agents. In this study, the influence of subinhibitory concentrations of resveratrol on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* was studied, by evaluating the development of homologous resistance or cross-resistance to the antibiotics commonly used to treat infections caused by these bacteria as well as to one disinfectant often used in the food sector. The development of cellular protection against adverse conditions, including acid and heat stress, by the influence of the same resveratrol concentrations was also evaluated. In general, the results suggest that resveratrol did not lead to homologous or cross-resistance development, nonetheless evidencing an increased tolerance to acid and heat stress in *L. monocytogenes*, although this behaviour was not very evident for *S. aureus*. These results, thus, support the possibility of using resveratrol as a food preservative. Similarly, disinfection represents a fundamental process in the control and spread of microorganisms, being extremely important to find new alternatives to overcome the lack of effective antimicrobial agents that can control or eliminate problematic bacteria in clinical practice. Thus, in the present study, the synergistic potential of linalool, the major compound of essential oil of coriander, in combination with disinfectants commonly used in hospitals was evaluated against *Acinetobacter baumannii* and *S. aureus*. In *A. baumannii*, it was observed that linalool in combination with benzalkonium chloride or chlorhexidine digluconate had a synergistic effect, and in combination with peracetic acid or sodium hypochlorite presented an additive effect. In the case of *S. aureus* an additive effect was demonstrated for all interactions. For these reasons, the linalool presents potential for future combinations with disinfectants.

Keywords

Resveratrol, linalool, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, adaptation, cell protection, synergism.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Breve introdução	1
1.2. Resistência aos antimicrobianos	1
1.2.1. Resistência a antibióticos	2
1.2.2. Resistência aos biocidas	5
1.3. Bactérias associadas à área alimentar	7
1.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	8
1.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.4. Bactérias problemáticas na prática clínica	10
1.4.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	10
1.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.5. Compostos de origem natural	13
1.5.1. Resveratrol	14
1.5.2. Linalool	16
Capítulo 2 - Objetivos	19
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	20
3.1. Microrganismos	20
3.2. Armazenamento e preparação das estirpes	20
3.3. Agentes antimicrobianos	20
3.4. Reagentes	21
3.5. Equipamentos	21
3.6. Avaliação da adaptação ao resveratrol e desenvolvimento de resistências cruzadas	22
3.6.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	22
3.6.2. Determinação da concentração mínima bactericida (CMB)	23
3.6.3. Adaptação das estirpes ao resveratrol	23
3.6.4. Determinação da concentração mínima inibitória após adaptação das estirpes	24
3.6.5. Avaliação da tolerância a condições adversas	24
3.6.5.1. Tolerância ao ácido	24
3.6.5.2. Tolerância ao calor	25
3.7. Avaliação do potencial sinérgico entre linalool e desinfetantes	25
3.7.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	25
3.7.2. Ensaio de sinergismo	25
3.8. Análise estatística	26
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	27

4.1.	Atividade antimicrobiana do resveratrol	27
4.1.1.	Concentração Mínima Inibitória do resveratrol	27
4.1.2.	Concentração Mínima Bactericida do resveratrol.....	27
4.1.3.	Adaptação de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> ao resveratrol	28
4.1.4.	Concentração Mínima Inibitória do resveratrol e de outros antimicrobianos ...	31
4.1.5.	Avaliação da tolerância a condições adversas de pH e temperatura.....	34
4.2.	Avaliação do potencial sinérgico entre linalool e desinfetantes	46
Capítulo 5 - Conclusões.....		51
Capítulo 6 - Perspetivas futuras		53
Bibliografia		54

Lista de Figuras

- Figura 1:** Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos. Adaptado de (Willey et al., 2008). 3
- Figura 2:** Estrutura química dos isômeros *trans* e *cis*-resveratrol. (Gambini et al., 2015) 14
- Figura 3:** Estrutura química do linalool. (Letizia et al., 2003) 17
- Figura 4:** Processo global realizado para avaliar a influência do resveratrol sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes* (CMI: concentração mínima inibitória; CMB: concentração mínima bactericida). 22
- Figura 5:** Efeito do pH (2,4) em *S. aureus* após a 4ª passagem da adaptação a 1/4 × CMI (A) e a 1/2 × CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controle do crescimento (CC), controle do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV). 36
- Figura 6:** Curva de sobrevivência em pH ácido (2,4) para *S. aureus* após a 4ª passagem da adaptação a 1/4 × CMI (A) e 1/2 × CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controle do crescimento (CC), controle do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV). 37
- Figura 7:** Efeito do pH (2,4) em *L. monocytogenes* após a 4ª passagem da adaptação a 1/4 × CMI (A) e a 1/2 × CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controle do crescimento (CC), controle do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV). 38
- Figura 8:** Curvas de sobrevivência em pH ácido (2,4) para *L. monocytogenes* após a 4ª passagem da adaptação a 1/4 × CMI (A) e 1/2 × CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controle do crescimento (CC), controle do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV). 39
- Figura 9:** Efeito da temperatura (55 °C) em *S. aureus* após a 4ª passagem da adaptação a 1/4 × CMI (A) e a 1/2 × CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controle do crescimento (CC), controle do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV). 40
- Figura 10:** Curvas de sobrevivência a incubação a 55 °C para *S. aureus* após a 4ª passagem da adaptação a 1/4 × CMI(A) e 1/2 × CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controle do crescimento (CC), controle do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV). 41
- Figura 11:** Efeito da temperatura (55 °C) em *L. monocytogenes* após a 4ª passagem da adaptação a 1/4 × CMI (A) e a 1/2 × CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controle do crescimento (CC), controle do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV). 42

Figura 12: Curvas de sobrevivência a uma incubação a 55 °C para *L. monocytogenes* após a 4ª passagem da adaptação a 1/4 × CMI (A) e 1/2 × CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controle do crescimento (CC), controle do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV). 43

Figura 13: Curvas representativas do efeito do linalool em combinação com desinfetantes contra *A. baumannii*. 48

Figura 14: Curvas representativas do efeito do linalool em combinação com desinfetantes contra *S. aureus*. 49

Lista de Tabelas

Tabela 1: Agentes antimicrobianos utilizados no trabalho laboratorial.	20
Tabela 2: Lista dos reagentes utilizados no trabalho laboratorial.	21
Tabela 3: Lista de equipamentos utilizados.	21
Tabela 4: Variação no crescimento de <i>S. aureus</i> a concentrações subinibitórias e inibitórias de resveratrol.	29
Tabela 5: Variação no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> a concentrações subinibitórias e inibitórias de resveratrol.	30
Tabela 6: Concentração mínima inibitória ($\mu\text{g/mL}$) dos agentes antimicrobianos contra <i>S. aureus</i> após a quarta passagem das células em $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$ resveratrol (CC: controlo do crescimento; CS: controlo do solvente; RV: ensaio com resveratrol).	32
Tabela 7: Concentração mínima inibitória ($\mu\text{g/mL}$) dos agentes antimicrobianos contra <i>L. monocytogenes</i> após a quarta passagem das células em $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$ resveratrol (CC: controlo do crescimento; CS: controlo do solvente; RV: ensaio com resveratrol).	33
Tabela 8: Concentração Mínima Inibitória (CMI) do linalool e dos desinfetantes contra <i>A. baumannii</i> e <i>S. aureus</i> .	46
Tabela 9: Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) do linalool em combinação com os desinfetantes e respetivos efeitos.	47

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CC	Controlo do crescimento
CIF	Concentração inibitória fracionada
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
CMB	Concentração mínima bactericida
CS	Controlo do solvente
DGS	Direção Geral da Saúde
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPS	Substância exopolimérica
ICIF	Índice da concentração inibitória fracionada
LMG	<i>BCCM/LMG Bacteria collection</i>
MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>
MHA	<i>Mueller-Hinton Agar</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
QS	<i>Quorum-sensing</i>
RAM	Resistência aos antimicrobianos
rpm	Rotações por minuto
RV	Ensaio com resveratrol
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UFC	Unidades formadoras de colónias
WHO	<i>World Health Organization</i>

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Breve introdução

Em ambientes de produção alimentar e ambientes hospitalares, os microrganismos são expostos a várias condições adversas, nomeadamente, agentes antimicrobianos, diferentes pHs e temperaturas, congelamento, descongelamento, desidratação, entre outros (Apolónio et al., 2014), que podem afetar a viabilidade celular, reduzindo ou até mesmo eliminando a maioria dos microrganismos. No entanto, as células microbianas desenvolvem mecanismos que as protegem das condições de stress, podendo levar à aquisição de resistências (Cebrián et al., 2010). Assim, é crucial encontrar alternativas eficazes para controlar o crescimento e a consequente disseminação de microrganismos de origem alimentar e clínica.

1.2. Resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos (RAM) refere-se à capacidade de um microrganismo patogénico para resistir aos efeitos de um agente quimioterapêutico/antimicrobiano ao qual era suscetível (Wallinga et al., 2015). A RAM é considerada como uma das ameaças mais graves para a saúde individual e coletiva, sendo que as organizações nacionais e internacionais reforçam a necessidade urgente na tomada de medidas (Littmann and Viens, 2015). Trata-se dum problema complexo que afeta não só a saúde humana e animal, como também o meio ambiente, a agricultura e a economia (Littmann and Viens, 2015). Estima-se que a RAM leva a 25000 mortes por ano e os custos associados são superiores a 1,5 biliões de euros (EMEA and ECDC, 2009).

Um antimicrobiano é um agente natural ou sintético que destrói ou inibe o crescimento de microrganismos. Alguns destes compostos são usados em objetos inanimados, tais como desinfetantes e esterilizantes; outros são utilizados em organismos vivos, são exemplo destes os antissépticos, que são aplicados por via tópica, ou os antibióticos, que são administrados de forma a controlarem ou tratarem infeções bacterianas “*in vivo*” (Madigan et al., 2012; Willey et al., 2008).

O uso excessivo e/ou indevido dos antimicrobianos durante os últimos anos tem sido associado a um processo evolucionário acelerado que conduziu a resistências bacterianas (Andersson and Hughes, 2012). Os antibióticos, por exemplo, têm sido usados em diferentes áreas, nomeadamente na medicina humana e veterinária, mas também na agricultura (Rodríguez-Rojas et al., 2013). No entanto são ainda utilizados, de forma exagerada, na pecuária e na aquacultura, como promotores do crescimento, profiláticos e agentes terapêuticos de

infecções. Esta utilização massiva aumentou a pressão seletiva sobre microrganismos comensais e patogênicos, que podem ser transmitidos aos seres humanos através da cadeia alimentar ou, indiretamente, por exemplo, pela poluição ambiental dos efluentes agrícolas (Roca et al., 2015). Num contexto clínico, a metabolização dos antibióticos pelos seres humanos não é completa, e uma grande parte pode ser excretada nas fezes e na urina (Meek et al., 2015). Como a taxa de degradação dos antibióticos é lenta, as estações de tratamento de águas residuais são consideradas como fonte de bactérias resistentes. Após o tratamento, estas águas podem ser utilizadas, levando a uma disseminação das resistências bacterianas, uma vez que os genes de resistência são transferidos a outras bactérias (von Wintersdorff et al., 2016). Assim, e num contexto ambiental, a propagação das resistências atinge os ambientes envolventes, nomeadamente terrenos, águas de lagos e até mesmo sedimentos dos rios (Fick et al., 2009; Kristiansson et al., 2011). Desta forma, as bactérias resistentes podem fluir entre diferentes ambientes, incluindo humanos, animais, solos e águas, resultando numa disseminação de bactérias patogênicas altamente resistentes (Andersson and Hughes, 2012). Devido ao aumento das resistências bacterianas e à diminuição da eficácia dos antibióticos no tratamento de infeções bacterianas, a resistência aos antibióticos tem sido considerada como sinónimo de RAM (Wallinga et al., 2015).

1.2.1. Resistência a antibióticos

A descoberta inovadora de que substâncias produzidas por fungos e bactérias poderiam inibir o crescimento de outras bactérias transformou a medicina. Estas substâncias, que mais tarde passaram a ser designadas de antibióticos, foram utilizadas no tratamento de inúmeros casos de infeção, que era a principal causa de morte durante a II Guerra Mundial. Nos anos seguintes houve uma redução significativa da mortalidade e milhões de vidas foram salvas, devido à utilização de antibióticos (Paphitou, 2013).

Os antibióticos matam ou inibem o crescimento das bactérias, sendo assim classificados segundo o seu efeito como bactericidas ou bacteriostáticos, respetivamente. Idealmente possuem uma toxicidade seletiva, pois exercem a sua função a concentrações suficientemente baixas de forma a evitar danos indesejáveis no hospedeiro (Willey et al., 2008). Um antibiótico pode ser eficaz contra vários tipos de bactérias, sendo denominado de antibiótico de amplo espectro, ou contra apenas um tipo, neste caso classificado como de espectro estreito (Madigan et al., 2012). Pode ainda ser estabelecida uma classificação dos antibióticos por classes onde são agrupados de acordo com o seu mecanismo de ação, isto é, o modo como interagem com o alvo celular, nomeadamente com a parede celular, a membrana celular, a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos (Fernández et al., 2011).

O peptidoglicano é um componente importante da parede das bactérias e por isso a sua síntese é um alvo particularmente eficaz para os antibióticos (Willey et al., 2008). Assim, a inibição da síntese do peptidoglicano enfraquece a parede celular que pode levar consequentemente à lise da célula. Os β -lactâmicos, como a ampicilina, inativam enzimas

que intervêm na síntese do peptidoglicano, enquanto os glicopéptidos, como a vancomicina, ligam-se diretamente a precursores do peptidoglicano bloqueando a reação de transpeptidação (Madigan et al., 2012). Antibióticos como as polimixinas ligam-se à membrana celular causando uma ruptura, e conseqüentemente a alteração da permeabilidade da mesma. Por outro lado, a inibição da síntese proteica pode ocorrer pela ligação de aminoglicósidos (gentamicina) ou de macrólidos (eritromicina) às diferentes subunidades do ribossoma. A ciprofloxacina, que pertence ao grupo das quinolonas, inibe as topoisomerases bacterianas, impedindo assim o superenrolamento do ADN (Fernández et al., 2011; Willey et al., 2008).

Existem vários mecanismos que levam à resistência aos antibióticos (Figura 1), designadamente o impedimento do acesso ou alteração do alvo do antibiótico (1), degradação, por ação enzimática, do antibiótico devido a modificações ou quebras na molécula (2), alteração do antibiótico (3) e expulsão da droga para fora da célula pelas bombas de efluxo (4) (Fernández et al., 2011; Willey et al., 2008).

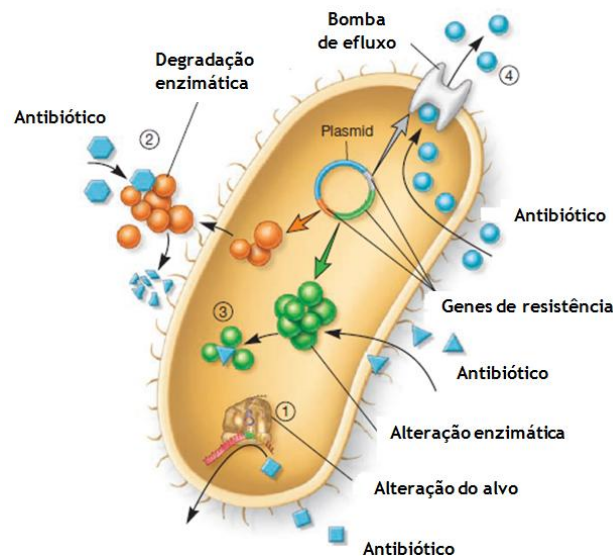


Figura 1: Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos. Adaptado de (Willey et al., 2008).

Entre os principais tipos de resistência aos antibióticos tem-se a intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca compreende todas as propriedades inerentes fornecidas pelas características de um determinado microrganismo que limita a ação dos antimicrobianos. A presença da membrana externa com baixa permeabilidade em bactérias Gram-negativas, e as bombas de efluxo observadas em várias bactérias, são dois exemplos deste tipo de resistência (Fernández and Hancock, 2012). A resistência adquirida ocorre quando um microrganismo que originalmente era suscetível se torna resistente, por

incorporação de material genético ou por mutações (Fernández and Hancock, 2012). Os genes de resistência aos antibióticos são transferidos horizontalmente entre bactérias através de três principais mecanismos: conjugação, transformação e transdução. No primeiro caso é necessário contacto célula-a-célula, através do qual o ADN é transferido da célula dadora para a recetora. A transformação é a captação, integração e expressão funcional de fragmentos de ADN extracelular, enquanto na transdução a transferência da informação genética é mediada por um bacteriófago (von Wintersdorff et al., 2016). Por outro lado, ainda a ocorrência de mutações espontâneas no cromossoma bacteriano pode tornar as bactérias resistentes aos antibióticos. Tais mutações levam a uma alteração do alvo do antibiótico, o que resulta conseqüentemente na incapacidade de ligação do antibiótico ao alvo bacteriano (Willey et al., 2008).

A resistência adaptativa envolve um aumento temporário na capacidade da bactéria sobreviver a um determinado antibiótico. Este tipo de resistência está associada a alterações na expressão de genes e/ou proteínas quando existe um ambiente desencadeador destes mecanismos, como por exemplo, a exposição a condições de stress como alterações de pH, temperatura, concentração de iões e, muito importante, a exposição a doses subletais de antimicrobianos. (Fernández and Hancock, 2012; Fernández et al., 2011). Ao contrário das resistências intrínsecas e adquiridas, que são estáveis, irreversíveis e independentes do ambiente, a resistência adaptativa por sua vez é de natureza transitória, reversível após a remoção da condição de indução, e por isso, dependente do ambiente envolvente. Devido à sua natureza transitória, a resistência adaptativa é difícil de detetar e tem sido desconsiderada em muitos casos (Fernández et al., 2011). No entanto, diversos estudos têm demonstrado que a incubação de um microrganismo num meio suplementado com concentrações subinibitórias de um antibiótico torna as células mais resistentes a exposições subsequentes desse antibiótico, e nalguns casos, também a outros antimicrobianos da mesma ou de diferente classe (resistência cruzada) (Kohanski et al., 2010; Kumari et al., 2014; Langsrud et al., 2004).

Apesar de não estar totalmente claro, a resistência adaptativa parece funcionar como uma ponte entre a resistência intrínseca e adquirida (Sandoval-Motta and Aldana, 2016). As populações bacterianas que são expostas a antibióticos por longos períodos de tempo são mais resistentes do que as que não foram. Tal pode ser devido a alterações epigenéticas que permitem que as populações sobrevivam mais tempo para desenvolver uma resistência mais estável (Adam et al., 2008). Motta e seus colaboradores também verificaram que as mutações no ADN, que aumentam a eficiência das bombas de efluxo, podem ser adquiridas aumentando a estabilidade da resistência (Motta et al., 2015).

1.2.2. Resistência aos biocidas

Os biocidas, outro grupo de antimicrobianos, têm um papel fulcral no controle e disseminação de microrganismos patogênicos (Gerba, 2015). Contudo, a ampla utilização dos biocidas poderá agir como uma pressão seletiva para as bactérias resistentes aos antimicrobianos (Machado et al., 2013), sendo que, nos últimos anos tem sido sugerido uma possível conexão entre a resistência aos antibióticos e aos biocidas, porém ainda é um assunto que se mantém em discussão (Coelho et al., 2013; Oggioni et al., 2013).

Os biocidas, que são usados em antissépticos, desinfetantes e conservantes, podem ser aplicados em diferentes ambientes, nomeadamente serviços de saúde humana e animal, domicílios, instalações das indústrias alimentares e respetivo ambiente de processamento alimentar (Coelho et al., 2013). Define-se como antisséptico, uma substância que impede o crescimento ou a ação de microrganismos inibindo a sua atividade ou destruindo-os. Este termo é utilizado para preparações aplicadas por via tópica (CDC, 2008). Por outro lado, um desinfetante é um agente geralmente químico, mas pode também ser físico, que elimina a maioria dos microrganismos patogênicos em objetos inanimados (CDC, 2008). Estes agentes são não-específicos e podem ser bactericidas, fungicidas, viricidas ou a combinação destes, já que normalmente os desinfetantes contêm um ou mais agentes antimicrobianos em concentrações que podem afetar um ou múltiplos alvos celulares (Ortega Morente et al., 2013). Ao contrário dos antibióticos, que afetam processos fisiológicos (por exemplo a síntese do peptidoglicano), os desinfetantes afetam vários componentes celulares (por exemplo proteínas, ácidos nucleicos e constituintes da parede celular) através de reações físicas e ou químicas. Além disso, enquanto os antibióticos são utilizados para tratar infeções causadas por espécies bacterianas específicas ou um grupo delas, os desinfetantes não atuam contra microrganismos específicos (Cerf et al., 2010). É de salientar que a desinfecção apenas destrói a maioria dos microrganismos, ao contrário da esterilização que elimina todas as formas de vida microbiana (CDC, 2008; Ortega Morente et al., 2013). Por último, são denominados de conservantes os compostos incorporados em produtos farmacêuticos, cosméticos ou outros, de forma a prevenir a contaminação e desenvolvimento microbiano (Russell, 2003).

O mecanismo de ação de um biocida pode ser definido de acordo com a estrutura bacteriana contra a qual tem a sua principal atividade. Desta forma, os biocidas possuem três níveis de interação: com estruturas extracelulares, nomeadamente membrana externa e parede celular; com a membrana citoplasmática; e com os constituintes citoplasmáticos (Ortega Morente et al., 2013).

Os componentes citoplasmáticos não são os primeiros alvos dos biocidas, pois estes têm que penetrar a célula para alcança-los. Todavia, agentes oxidantes, como ácido peracético e peróxido de hidrogénio, têm múltiplos alvos celulares e moleculares, incluindo, disrupção das membranas celulares, desnaturação de proteínas, inibição de enzimas, e cuja ação em última instância leva à morte celular (CDC, 2008; Ortega Morente et al., 2013).

As bactérias Gram-negativas são normalmente menos suscetíveis aos biocidas que as Gram-positivas, devido à presença da membrana externa na sua estrutura da parede celular. Contudo, compostos catiónicos, como a clorohexidina e o cloreto de benzalcônio, interagem com as cargas negativas da membrana externa e da parede celular, danificando-as. Assim, estes compostos promovem a sua própria captação de modo a alcançarem os seus outros alvos no interior da célula, mas causando também uma disrupção da membrana citoplasmática levam à consequente perda dos componentes intracelulares. O hipoclorito de sódio oxida enzimas, inibe a síntese de proteínas mas também pode induzir a lise celular por efeito ao nível da parede celular (CDC, 2008; Ortega Morente et al., 2013).

Diversos fatores afetam a atividade do biocida, nomeadamente a sua concentração, o período de contacto, o pH do meio envolvente, a presença de matéria orgânica, e também as condições do microrganismo, principalmente a forma como existem na natureza, isolada ou em comunidade. Os biocidas têm um intervalo de pH ótimo de atividade, sendo que os compostos catiónicos são mais ativos a pH alcalino, enquanto hipocloritos são mais potentes a pH ácido. Por outro lado, a interação com a matéria orgânica, como sangue ou pus, pode afetar adversamente a eficácia de muitos biocidas (Russell, 2003). De destacar, que a concentrações baixas ou subinibitórias, a ação do biocida pode mesmo ser reduzida a um único alvo, assim desta forma, as bactérias podem adaptar-se e tornar-se resistentes (Ortega Morente et al., 2013). Numa outra perspectiva, é sabido que os microrganismos podem existir numa forma isolada (células planctónicas) mas também em comunidades (biofilmes) (Richards and Melander, 2009). Os biofilmes são portanto comunidades de microrganismos que aderem a superfícies bióticas ou abióticas, formando agregados densos de uma ou mais espécies, envoltos por uma substância exopolimérica (EPS) que é constituída por várias biomoléculas com origem bacteriana e do próprio ambiente envolvente (Buckingham-Meyer et al., 2007). Os biofilmes, sendo estruturas muito mais complexas e dinâmicas que as células planctónicas tornam-se mais difíceis de erradicar pelos biocidas (Cerf et al., 2010).

A resistência aos biocidas ainda não está claramente definida (Coelho et al., 2013), no entanto, alguns autores sugerem que os mecanismos de resistência a biocidas devem ser análogos aos dos antibióticos (Coelho et al., 2013; Ortega Morente et al., 2013).

A possível conexão entre a resistência aos antibióticos e aos biocidas é um tema que tem gerado interesse na comunidade científica mas numa forma controversa (Coelho et al., 2013; Oggioni et al., 2013). No ano de 2012 realizou-se, em Lisboa, uma conferência internacional de investigação antimicrobiana, onde o tema foi abordado. Todos os oradores concordaram que o uso e excessivo e/ou inadequado dos biocidas pode constituir um risco para a seleção de resistência aos mesmos. Todavia, os investigadores concordaram que o uso e a diminuição da suscetibilidade das bactérias aos biocidas não apresentam um risco, até agora, no desenvolvimento de resistência a antibióticos (Oggioni et al., 2013).

1.3. Bactérias associadas à área alimentar

Os antimicrobianos são agentes fundamentais no controlo dos microrganismos, evitando ou minimizando a contaminação de superfícies, alimentos, águas, medicamentos, tecidos vivos, entre outros. No entanto, o amplo uso e o abuso destes compostos levou ao desenvolvimento de resistências, tornando o controlo e o tratamento de infeções uma tarefa bastante difícil (Andersson and Hughes, 2012; Coelho et al., 2013). O sector alimentar e clínico são os de maior relevância pois são as áreas onde os microrganismos, e o subsequente desenvolvimento de resistências, podem trazer problemas acrescidos. A possível contaminação de alimentos pode originar doenças, afetando um elevado número de pessoas, e consequentemente conduzir a um problema de saúde pública (WHO, 2015). Além disso, a resistência aos antimicrobianos também compromete a segurança alimentar, já que o alimento pode conter uma bactéria patogénica resistente, ou a resistência pode ser transmitida de uma bactéria comensal do alimento para uma que é patogénica para o ser humano (Viegas, 2010).

As doenças transmitidas por alimentos são uma causa de morbidade e de mortalidade em todo o mundo e estão associadas a elevados custos socioeconómicos (WHO, 2015). Estas resultam, principalmente, da ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogénicos ou por toxinas bacterianas. No primeiro caso, os microrganismos patogénicos colonizam e crescem no interior do hospedeiro, que posteriormente levam a uma infeção. Por outro lado, o microrganismo pode secretar toxinas no alimento que ao ser consumido dá origem a uma intoxicação, na qual não é requerida a presença do microrganismo produtor. Em alternativa, o microrganismo pode apenas produzir a toxina no interior do hospedeiro, sendo assim designada de toxinfecção (Willey et al., 2008).

As doenças de origem alimentar surgem devido a diversos fatores, nomeadamente alimentos crus contaminados, armazenamento e refrigeração inadequados, alimentos mal cozinhados, contaminação cruzada entre alimentos crus e cozinhados, pouca higiene dos manipuladores e/ou das superfícies (Viegas, 2010). A contaminação pode ocorrer durante ou após o processamento dos alimentos, e até mesmo no ambiente doméstico (EFSA and ECDC, 2015; Viegas, 2010).

Há diversos microrganismos que podem ser agentes causais de doenças de origem alimentar. *Campylobacter* e *Salmonella* surgem como os mais predominantes (EFSA and ECDC, 2015), mas *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* também têm gerado alguma preocupação pelas doenças que provocam. A infeção causada por *L. monocytogenes*, designada por listeriose, é uma doença de baixa prevalência, no entanto apresenta elevadas taxas de hospitalização e de mortalidade quando comparada com infeções causadas por outras bactérias patogénicas (Denny and McLauchlin, 2008). Em 2014, a taxa de mortalidade da listeriose foi de 15 %, enquanto da campilobacteriose e salmonelose foi de 0.01 % e 0,15 %, respetivamente (EFSA and ECDC, 2015). Por outro lado, *Staphylococcus aureus* é uma das

bactérias Gram-positivas mais patogénicas, pois possui vários fatores de virulência, como por exemplo a capacidade de produzir toxinas termorresistentes que quando ingeridas através dos alimentos causam gastroenterite (Bellio et al., 2016; Kong et al., 2016). Em 2014 detetou-se que 7,5 % de todos os surtos de doenças de origem alimentar correspondia a intoxicações por *S. aureus* (EFSA and ECDC, 2015).

1.3.1. *Listeria monocytogenes*

O género *Listeria* inclui 15 espécies, sendo a espécie *L. monocytogenes* responsável pela listeriose (den Bakker et al., 2014; Donovan, 2015). Em 2014, foram relatados 2161 casos de listeriose na União Europeia, em que a taxa de mortalidade foi 15 % e a taxa de hospitalização de 98,9 %. O número de casos, na Europa, têm vindo aumentar desde 2008, no entanto, não existem dados em Portugal devido à falta de um sistema de vigilância (EFSA and ECDC, 2015).

L. monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva com forma de bacilo que cresce na presença ou ausência de oxigénio (anaeróbia facultativa). Apresenta motilidade, pois possui flagelos polares, e a nível bioquímico é catalase positiva e oxidase negativa (Donovan, 2015). Esta é uma bactéria de natureza ubiqüitária, podendo ser encontrada em diversos ambientes, incluindo, água, solo e alimentos, e que consegue sobreviver e crescer em condições adversas, nomeadamente a temperaturas entre -2 a 42 °C, baixos pHs e elevada concentração de sal (Ferreira and Domingues, 2016; Payeras-Cifre and Hernandez-Milian, 2014).

A listeriose está normalmente associada ao consumo de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*, tais como, carne, peixe, legumes, queijos e leite não pasteurizado. Após a ingestão destes, a bactéria liga-se à superfície das células gastrointestinais, atravessando assim a barreira intestinal. Uma vez na corrente sanguínea, a bactéria é distribuída para vários tecidos. No interior das células, a bactéria liberta listeriolisinas de modo a romper a membrana vacuolar, evitando assim a morte intracelular e iniciando o processo de divisão. Por outro lado, tem a capacidade de promover a formação de protuberâncias da célula hospedeira para as células circundantes, ocorrendo conseqüentemente a disseminação célula-a-célula. Através desta, as bactérias movem-se entre várias células hospedeiras sem existir contacto com o meio extracelular e permitindo ainda a evasão do sistema imunitário (Donovan, 2015; Payeras-Cifre and Hernandez-Milian, 2014). Em indivíduos imunocompetentes, a listeriose é caracterizada por uma gastroenterite febril, que inclui febre, náuseas, vômitos, diarreias e mialgias. Porém, a doença pode ser mais severa para as populações de risco, nomeadamente idosos, grávidas, recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos. Para estas populações a infeção pode originar septicémia, meningite e aborto (Allen et al., 2016; Donovan, 2015).

A desinfecção das superfícies no processamento alimentar é uma das tecnologias implementadas no controlo da bactéria. No entanto, por vezes pode ocorrer uma exposição a concentrações subletais de desinfetantes, que quando repetida e/ou prolongada pode

promover o desenvolvimento de resistência a esses compostos (Allen et al., 2016). Na literatura tem sido descrito que a resistência de *L. monocytogenes* aos compostos de amônio quaternário, sobretudo ao cloreto de benzalcônio, é devida ao aumento da atividade das bombas de efluxo (Romanova et al., 2006; Tamburro et al., 2015; To et al., 2002). Durante a desinfecção, parte da população pode persistir nos ambientes de processamento alimentar, tornando difícil a sua erradicação (Knudsen et al., 2013). Esta persistência pode estar associada à aptidão de *L. monocytogenes* para formar biofilmes (Ferreira and Domingues, 2016). Nestes, as bactérias estão protegidas de vários fatores ambientais, nomeadamente raios ultravioleta, ácido, dessecação e agentes antimicrobianos, tolerando melhor as elevadas concentrações de desinfetantes, o que dificulta a descontaminação das superfícies (Da Silva and De Martinis, 2013).

1.3.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é um agente patogénico responsável por muitas intoxicações alimentares. Em 2014 foram detetados, na União Europeia, 393 surtos de origem alimentar causados por enterotoxinas estafilocócicas, verificando-se um ligeiro aumento quando comparado a 2013 (386 surtos). De realçar que em Portugal, no ano de 2014, foram registados 2 surtos, onde se contabilizaram 106 casos de intoxicação, dos quais resultaram 22 hospitalizações mas sem nenhum óbito declarado (EFSA and ECDC, 2015).

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa e com forma de cocos. Esta pertence à flora saprófita do ser Humano, encontrando-se no nariz, na conjuntiva, na pele e na boca (Willey et al., 2008). Apesar disto, pode tornar-se patogénica em determinadas condições, sendo assim encarado como um microrganismo oportunista (Kadariya et al., 2014).

Considerando que *S. aureus* faz parte do microbioma normal do Homem, este pode ser transferido para alimentos pela manipulação dos mesmos, que se forem mantidos à temperatura ambiente durante algum tempo, poderá levar à produção de toxinas. Estas são enterotoxinas termorresistentes e por isso, mesmo que o alimento seja sujeito a elevadas temperaturas durante a sua confeção, as bactérias serão destruídas mas as toxinas não, levando a uma possível intoxicação alimentar independentemente da correta confeção. Os sintomas da doença, que incluem náuseas, vómitos, diarreia e fortes dores abdominais, são sentidos pouco tempo depois da ingestão do alimento, pois é prescindível o crescimento do microrganismo (Willey et al., 2008). A manifestação dos sintomas depende sobretudo das condições de saúde do indivíduo e da quantidade de toxina presente no alimento ingerido (Gustafson et al., 2014).

Existem vários fatores que afetam o crescimento de *S. aureus* e a produção das toxinas, nomeadamente, temperatura, pH, condições de higiene, entre outros. *S. aureus* cresce num intervalo alargado de temperatura, 7 a 48,5 °C, porém a temperatura ótima de crescimento encontra-se entre 30 e 37 °C. Ainda que as temperaturas de refrigeração sejam utilizadas

durante toda a cadeia alimentar, desde o processamento dos alimentos até à sua distribuição, no armazenamento de alimentos previamente confeccionados, a temperatura ultrapassa frequentemente os 7°C, o que pode levar conseqüentemente ao crescimento da bactéria e à produção das respetivas toxinas (Gustafson et al., 2014; Kadariya et al., 2014). Relativamente ao pH, o crescimento da bactéria bem como a produção das toxinas é ótima a um pH de 7. No entanto, a pHs ácidos *S. aureus* consegue sobreviver, enquanto a produção da toxina é prevenida (Gustafson et al., 2014). *S. aureus* também pode colonizar equipamentos e utensílios, apesar dos humanos serem os principais veículos de transmissão de bactéria para o alimento, durante a sua manipulação (Gustafson et al., 2014). Na indústria alimentar, *S. aureus* pode aderir a superfícies e formar biofilmes, dos quais há uma posterior libertação e disseminação de células planctónicas quando os alimentos estão a ser manipulados (Gustafson et al., 2014; Richards and Melander, 2009).

1.4. Bactérias problemáticas na prática clínica

De modo semelhante à área alimentar, na prática clínica também existem microrganismos que são responsáveis por diversas infeções adquiridas na comunidade e nos hospitais (nosocomiais) e que são fonte de grande preocupação. Em ambientes de cuidados de saúde, a abundância e a diversidade de microrganismos resistentes leva a uma necessidade constante no controlo da disseminação dos mesmos de modo a evitar a infeção em pacientes, profissionais de saúde e conseqüentemente à comunidade em geral (DGS, 2016). Em Portugal, no ano de 2014, constatou-se que o número de óbitos por infeções associadas a cuidados de saúde foi cerca de sete vezes maior que o número de mortes por acidentes de viação. Em 2012, verificou-se que a prevalência de infeções hospitalares (10,5 %) foi maior que média europeia (6,1 %). Este problema relaciona-se ainda com o aumento de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos (DGS, 2016).

S. aureus e *Acinetobacter baumannii* são microrganismos que frequentemente causam infeções adquiridas em ambientes clínicos (ECDC, 2015). Embora nos últimos anos as percentagens de resistência em *A. baumannii* e *S. aureus* terem sido maiores que 50 %, começa-se agora a verificar um decréscimo das mesmas. No entanto, ainda são considerados microrganismos “problema”, visto que Portugal pertence ao grupo de países com maiores taxas de resistências em *A. baumannii* e *S. aureus* (DGS, 2016).

1.4.1. *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii é uma bactéria aeróbia, Gram-negativa e com a forma de cocobacilo (Nwugo et al., 2012), de natureza ubíqua, é encontrada na água, no solo, na pele humana e em equipamentos médicos (Espinal et al., 2012), e como é um microrganismo oportunista tem a capacidade de causar infeções nosocomiais, isto é, infeções adquiridas em ambientes

hospitalares (Alves et al., 2016). Esta bactéria está normalmente associada a pneumonias, infecções do trato urinário e nos locais de incisão cirúrgica, infecções de feridas e queimaduras (ECDC, 2015; Tomaras et al., 2003). Os pacientes que se encontram nas unidades de cuidados intensivos são os mais suscetíveis, devido ao elevado número de procedimentos médicos invasivos a que são sujeitos (Kawamura-Sato et al., 2008).

O uso excessivo e indevido de antibióticos contribui para que *A. baumannii* tenha desenvolvido resistências a esses agentes (Fernández et al., 2011). O aumento de estirpes resistentes de *A. baumannii* a antibióticos mostra, a grande capacidade desta bactéria na resposta à pressão seletiva ambiental. Este microrganismo possui vários mecanismos de resistência a diferentes grupos de antibióticos, nomeadamente, β -lactâmicos, aminoglicósidos, quinolonas, sendo assim considerada uma bactéria multirresistente (Peleg et al., 2008). Recentemente, mas de forma pouco frequente, tem-se verificado uma panresistência, isto é, resistência a todos os antibióticos existentes, em isolados de *A. baumannii* (Inchai et al., 2015). Assim, o tratamento de infecções causadas por este agente patogénico torna-se bastante difícil.

Por outro lado, *A. baumannii* consegue sobreviver durante longos períodos não só nas superfícies corporais, como também nas superfícies do ambiente hospitalar (Kawamura-Sato et al., 2008; Tomaras et al., 2003), sendo por isso, a desinfeção um processo fundamental no controlo da infeção. Existem várias fontes hospitalares que têm sido associadas à transmissão de infeções causadas pela bactéria, nomeadamente, transdutores de pressão reutilizáveis, humidificadores, equipamentos de ar condicionado, mas também almofadas e colchões (Beggs, 2006). Jawad e colaboradores verificaram que o tempo médio de sobrevivência de *A. baumannii* numa superfície seca (lamela de vidro) foi aproximadamente 27 dias (Jawad et al., 1998). Esta capacidade para sobreviver em superfícies secas é um fator importante no seu comportamento epidemiológico devido a aquisição de resistência à dessecação (Beggs, 2006). Por outro lado, a capacidade de *A. baumannii* para formar biofilmes em condições de dessecação pode também estar associado à sua elevada capacidade de sobrevivência permitindo que a bactéria persista nos ambientes hospitalares, e contribuindo para o desenvolvimento de infeções nosocomiais (Espinal et al., 2012). A EPS presente nos biofilmes, sendo altamente hidratada, previne a dessecação letal mas também protege as células das variações de humidade, assim como pode também contribuir para a resistência a diversos antimicrobianos, nomeadamente antibióticos e desinfetantes (Alves et al., 2016; Espinal et al., 2012).

Para que os desinfetantes atuem de forma apropriada é necessário que sejam usados nas concentrações corretas e nos tempos adequados (Kawamura-Sato et al., 2008). Porém, na prática clínica nem sempre são seguidas as indicações dadas pelos fabricantes destes agentes antimicrobianos (Liu et al., 2014). Wisplinghoff e colaboradores verificaram uma redução da suscetibilidade de isolados clínicos de *A. baumannii* a desinfetantes, como a clorohexidina,

quando estes foram diluídos ou quando o tempo de contacto foi reduzido. Para além disso, os níveis residuais dos desinfetantes podem proporcionar uma vantagem seletiva e levar à disseminação da bactéria (Wisplinghoff et al., 2007).

De salientar que a transmissão da bactéria pode ocorrer entre hospitais através de pacientes colonizados, isto é, pacientes que transportam a bactéria sem manifestações clínicas. A disseminação da mesma pode ser observada quer a nível regional, ou pode até mesmo atingir a escala nacional (Peleg et al., 2008).

1.4.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria que causa não só doenças de origem alimentar, como também é responsável por muitas infeções adquiridas quer na comunidade quer em ambientes hospitalares. Pode ser o agente causador de pequenas infeções de pele mas também pode provocar pneumonias fatais (DeLeo et al., 2010). Por outro lado, sendo um microrganismo comensal, pode colonizar assintomaticamente indivíduos saudáveis que podem representar um risco de disseminação de infeções por este microrganismo (DeLeo et al., 2010).

A patogénese de infeções causadas por *S. aureus* depende da expressão dos fatores de virulência, nomeadamente a produção de proteínas que auxiliam na adesão das bactérias aos tecidos dos hospedeiros, a secreção de toxinas extracelulares e enzimas que destroem células do hospedeiro, evitando assim a defesa imunitária do mesmo. Desta forma, torna-se possível o crescimento e a disseminação levando à conseqüente infeção (Kong et al., 2016)

S. aureus adquiriu facilmente resistência a antibióticos, sendo que a primeira resistência descrita foi à penicilina. Dois anos depois da introdução da metilina para tratar *S. aureus* resistente à penicilina, foi relatado *Meticillin-resistant S. aureus* (MRSA) (Ribeiro de Souza da Cunha and Ustulin, 2011). A vancomicina foi posteriormente introduzida, contudo *S. aureus* também conseguiu adquirir resistência (Ribeiro de Souza da Cunha and Ustulin, 2011).

S. aureus possui também a capacidade de sobreviver em equipamentos médicos, como por exemplo, cateteres e próteses de válvulas cardíacas, através da formação de biofilmes. Estes, por sua vez, podem levar a infeções graves que podem implicar a remoção ou substituição do dispositivo (Kiedrowski and Horswill, 2011). Como estas intervenções envolvem inúmeros riscos e complicações, é necessário evitar a sua formação.

Os microrganismos presentes nas superfícies hospitalares podem também ser transmitidos para as mãos dos auxiliares e profissionais de saúde, pacientes e respetivas visitas, originando infeções cruzadas e possíveis epidemias (Yuen et al., 2015). As superfícies que são repetidamente manipuladas são os principais reservatórios de MRSA em ambientes hospitalares, sendo que as camas das enfermarias e os seus respetivos componentes são os locais frequentemente contaminados pelo mesmo microrganismo, no entanto, também pode contaminar maçanetas de portas, medidores de pressão arterial, teclados dos computadores

entre outros (Yuen et al., 2015). Tais fatos reforçam a necessidade de encontrar agentes antimicrobianos mais eficazes.

1.5. Compostos de origem natural

A medicina tradicional, particularmente a fitoterapia, tem desempenhado um papel importante na saúde e bem-estar do ser humano. Os medicamentos fitoterapêuticos são a forma mais antiga da medicina e são fundamentais para os sistemas medicinais específicos de cada cultura, particularmente na China e na Índia (Mehta et al., 2015). Atualmente, mais de 25 % das drogas farmacêuticas derivam de produtos de origem natural utilizadas devido às suas diferentes propriedades, nomeadamente, sedativas, analgésicas, antitússicas, entre outras (Lubbe and Verpoorte, 2011). Por outro lado, os compostos de origem natural podem ser desenvolvidos como nutracêuticos, como por exemplo os componentes da uva vermelha pelas suas propriedades antioxidantes. Os óleos essenciais, constituídos por inúmeros compostos das plantas, têm várias atividades biológicas e por isso são usados em diferentes indústrias, designadamente, na indústria alimentar como agentes aromatizantes, na cosmética como agentes de fragrância e na indústria farmacêutica pelas suas propriedades funcionais, principalmente a atividade antimicrobiana (Lubbe and Verpoorte, 2011). Assim, tendo em conta as diversas propriedades e as possibilidades de aplicação dos compostos de origem natural, têm havido um interesse crescente da sua utilização como agentes antimicrobianos na indústria alimentar e farmacêutica.

Os alimentos frescos, designadamente, carne, peixe, marisco e produtos hortícolas possuem um tempo de armazenamento limitado, mesmo quando já se encontram prontos a comer ou prontos a cozinhar. Assim sendo, a adição de conservantes sintéticos é vista como necessária para evitar a deterioração e o crescimento de bactérias nos mesmos (Sultanbawa, 2011). Contudo, o uso destes agentes é interpretado de forma negativa pelos consumidores (Dhiman et al., 2016) e a identificação de novos agentes implica elevados custos e algumas dificuldades técnicas (Allen et al., 2016). Assim, a utilização de compostos naturais para reduzir bactérias patogénicas nos alimentos parece ser uma alternativa promissora. Para além disso, os compostos naturais são considerados como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e são mais facilmente aceites pelos consumidores (Campos et al., 2011). Neste sentido, o uso de agentes antimicrobianos de origem natural, como conservantes alimentares, começa a emergir de modo a prolongar a vida de armazenamento do alimento bem como melhorar a segurança alimentar (Sultanbawa, 2011). Os óleos essenciais de especiarias, nomeadamente de orégãos, tomilho e manjerona mostraram ter atividade sobre *S. aureus*, podendo ser usados na produção alimentar em alternativa aos conservantes sintéticos, limitando o crescimento das bactérias e ao mesmo tempo aumentar o período de validade de alguns alimentos (Marques et al., 2015; Pesavento et al., 2015).

Relativamente ao sector clínico, os compostos de origem natural mostram ser uma alternativa promissora para colmatar a falta de agentes antimicrobianos eficazes no controlo e tratamento de infeções causadas por microrganismos resistentes. Diversos óleos essenciais, como por exemplo o de coentros e de eucalipto, mostraram ter atividade antibacteriana sobre estirpes de *A. baumannii* mesmo a baixas concentrações, demonstrando um elevado potencial antimicrobiano (Luís et al., 2016; Silva et al., 2011b).

1.5.1. Resveratrol

O resveratrol (3,4',5,-trihidroxiestilbeno) é um polifenol natural presente nas uvas e seus derivados, pistácios, amendoins, amoras, mirtilos, chocolate negro, entre outros, encontrando-se contudo em maior concentração nas sementes e na pele das uvas. Desta forma, o vinho tinto destaca-se pelo seu elevado conteúdo do composto, uma vez que durante a sua produção, todo o bago é sujeito a fermentação. A extração do resveratrol, bem como a sua solubilidade é facilitada pela formação do álcool durante a fermentação das uvas (Fernández-Mar et al., 2012; Gambini et al., 2015).

O resveratrol é uma fitoalexina de baixo peso molecular, 228,25 g/mol, que é produzido quando as plantas são sujeitas a condições adversas, principalmente, quando existe um *stress* biótico, como por exemplo o ataque de microrganismos, ou abiótico como tratamentos químicos (Fernández-Mar et al., 2012; Gambini et al., 2015).

A estrutura química do resveratrol contém uma ligação dupla que dá origem a duas formas isoméricas, *cis* e *trans* (Figura 2). O isómero *trans* é a forma predominante na natureza e mais estável a nível estereoquímico, porém a isomerização *cis* pode ocorrer quando o isómero *trans* é exposto à luz solar ou artificial (Gambini et al., 2015).

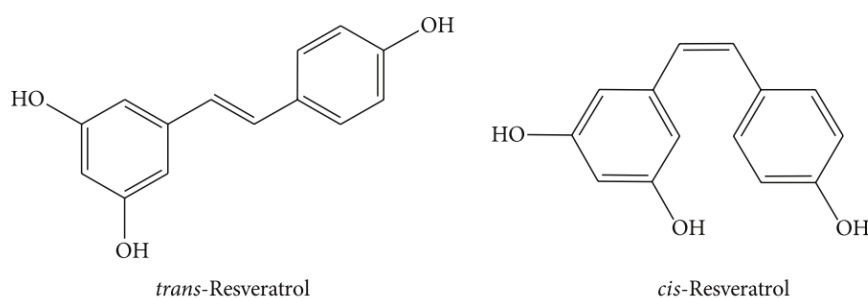


Figura 2: Estrutura química dos isómeros *trans* e *cis*-resveratrol. (Gambini et al., 2015)

Dadas as suas características físicas e químicas, o resveratrol pode atuar em diversos tipos de células através de vários mecanismos de ação atuando em diferentes alvos celulares. Dado que é pouco solúvel em água pode atravessar passivamente as membranas celulares (Brittes et al., 2010) ou pode mesmo interagir com os recetores de membrana, cujas interações podem levar a ativação de vias de sinalização que desencadeiam mecanismos intracelulares

(Gambini et al., 2015). Desta forma, o resveratrol exerce diversos benefícios sobre a saúde humana, atuando como agente antioxidante, cardioprotetor, anticancerígeno, antidiabético, neuroprotetor e anti-envelhecimento. Este composto possui também propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas (Gambini et al., 2015; Paulo et al., 2011).

O resveratrol apresenta atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Lee and Lee, 2014; Paulo et al., 2010). Vários estudos demonstram que o modo de ação do resveratrol pode ser bacteriostático (Ferreira and Domingues, 2016; Paulo et al., 2010), mas também bactericida (Ferreira et al., 2014; Martini et al., 2011; Nawrocki et al., 2013), dependendo dos microrganismos envolvidos, da concentração de resveratrol e da fase de crescimento em que as células se encontram (Ferreira et al., 2014; Paulo et al., 2010). Paulo e colegas verificaram a ação bacteriostática do resveratrol sobre várias bactérias, nomeadamente *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *S. aureus* (Paulo et al., 2010). Ferreira e colaboradores verificaram que o resveratrol possuía atividade bactericida sobre *Arcobacter*, tendo observado uma diminuição da sua atividade metabólica e um decréscimo do conteúdo de ADN intracelular, o que poderá significar que o resveratrol esteja envolvido na inibição da síntese do ADN (Ferreira et al., 2014). Para além disso, o resveratrol pode também atuar como um inibidor das bombas de efluxo (Ferreira et al., 2014), demonstrando assim a sua possível ação sobre diversos alvos celulares.

Ferreira e Domingues verificaram que o resveratrol possui atividade antimicrobiana sobre *L. monocytogenes* quer no seu estado planctónico quer em biofilmes. Sendo que esta bactéria contamina carnes e legumes, as investigadoras avaliaram a eficácia antimicrobiana do resveratrol em modelos alimentares (alface e frango) e mostraram que o composto inibiu o desenvolvimento de crescimento de *L. monocytogenes* em ambos os sistemas modelos (Ferreira and Domingues, 2016). Desta forma, o resveratrol apresenta um elevado potencial para ser utilizado como conservante alimentar alternativo no controlo de microrganismos que normalmente contaminam alimentos, agindo também como um antioxidante natural.

Numa outra perspetiva, na agricultura, após a colheita dos frutos há uma maior possibilidade do apodrecimento dos mesmos devido à senescência natural e ao ataque dos microrganismos. Por isso, durante o armazenamento é necessário aplicar pesticidas sintéticos, mas que contudo trazem riscos à saúde humana e efeitos indesejáveis ao ambiente. A utilização de moléculas produzidas pelas plantas como defesa contra pragas parece ser uma solução plausível para controlar a deterioração dos frutos (Jiménez et al., 2005). Jiménez e colaboradores aplicaram exogenamente uma solução de resveratrol em uvas, e outros frutos que normalmente não acumulam este metabolito, nomeadamente, maçãs, abacates, pimentos e tomates. Verificaram que a aplicação exógena de resveratrol reduziu o crescimento de fungos e aumentou o tempo de armazenamento sem afetar a qualidade nutricional da fruta. Mostraram também que o resveratrol reduz as perdas de água quer pela

preservação da integridade da pele da fruta, quer pela produção dum revestimento que rodeia o fruto, atuando como agente impermeabilizante (Jiménez et al., 2005).

1.5.2. Linalool

De forma semelhante ao resveratrol, os óleos essenciais também têm sido descritos como importantes agentes antimicrobianos naturais no controlo de diversos microrganismos. Estes são constituídos por vários componentes voláteis resultantes do metabolismo secundário de plantas aromáticas e medicinais (Faleiro M.L., 2011). Os óleos essenciais podem ser extraídos, normalmente por destilação, de várias partes das plantas, nomeadamente, folhas, flores e frutos (Calo et al., 2015), sendo que a composição do óleo essencial depende não só de que parte é que é extraído, mas também da localização geográfica e das condições climáticas do local de origem das plantas (Muñoz-Bertomeu et al., 2007).

O coentro (*Coriandrum sativum*) é uma planta utilizada como especiaria na culinária, sendo que o óleo essencial obtido a partir das suas sementes é usado na perfumaria, na cosmética mas também como ingrediente alimentar e agente aromatizante em preparações farmacêuticas (Duarte et al., 2012; Silva et al., 2011b). O óleo essencial de coentros apresenta atividade antifúngica e antibacteriana, nomeadamente contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) e Gram-negativas (*A. baumannii*) (Silva et al., 2011a, 2011b). A nível bacteriano, Silva e colaboradores sugeriram que o principal mecanismo de ação do óleo essencial de coentros é a permeabilização da célula, resultando no comprometimento de outras funções celulares, que em última instância pode levar à morte celular (Silva et al., 2011b).

Os óleos essenciais podem conter entre 20 a 60 componentes e por isso são considerados misturas naturais complexas. Contudo, existem compostos que se destacam por se encontrarem em concentrações superiores em relação aos restantes (Bakkali et al., 2008). O linalool é um desses exemplos, já que é o componente maioritário de alguns óleos essenciais, principalmente o de *C. sativum* (64,38 %) e *Ocimum basilicum* (42,1 %) (Silva et al., 2011a; Snoussi et al., 2016). Para além destes, o óleo essencial de *Lavandula latifolia* também possui uma elevada concentração de linalool, entre 15,1 % a 54,7 %, dependendo da região onde a lavanda foi colhida (Muñoz-Bertomeu et al., 2007). De um modo geral, os compostos principais são os que fornecem as propriedades biológicas dos óleos essenciais, sendo que alguns estudos demonstraram que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada com a atividade dos seus componentes maioritários (Bakkali et al., 2008; Calo et al., 2015; Herman et al., 2015).

A atividade antimicrobiana dum óleo essencial pode ser maior ou menor consoante os seus constituintes e as suas respetivas concentrações. Nalguns casos a atividade do óleo essencial é maior do que os seus constituintes ativos. Um estudo mostrou que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* teve maior atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos do que o linalool (Herman et al., 2015). Todavia, o contrário também pode ocorrer, sendo que no mesmo estudo os investigadores verificaram que o linalool possuiu maior atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* do que o óleo essencial de *Lavandula angustifolia*, com 36,97 % de linalool (Herman et al., 2015). Um outro estudo evidenciou a maior eficácia do linalool sobre estirpes clínicas de *C. albicans*, comparativamente ao óleo essencial de *L. angustifolia*. Observou-se também que em estirpes de referência de *C. albicans* o linalool teve um ação fungicida em 30 segundos, enquanto o óleo essencial necessitou de 15 min (D'Auria et al., 2005). Por outro lado, dentro do mesmo óleo podem existir compostos que possuem maior eficácia comparativamente aos restantes. Numa investigação mais recente, o linalool apresentou melhor atividade antibacteriana contra estirpes de *A. baumannii*, quando comparado a outros compostos presentes no óleo essencial de *C. sativum* (Alves et al., 2016).

O linalool é um álcool monoterpreno (Figura 3) utilizado como ingrediente de cosméticos, nomeadamente, perfumes, champôs, sabonetes, cremes e também em produtos domésticos, principalmente detergentes (Herman et al., 2015; Letizia et al., 2003). O linalool apresenta atividade antioxidante e anti-inflamatória, mas também antifúngica e antibacteriana, sendo ativo contra bactérias Gram-positivas e negativas (Alves et al., 2016; Duarte et al., 2015b; Herman et al., 2015; Peana et al., 2002).

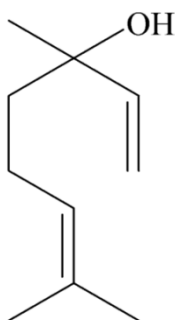


Figura 3: Estrutura química do linalool. (Letizia et al., 2003)

De entre as diversas propriedades do linalool, este demonstrou inibir o *quorum-sensing* (QS) (Duarte et al., 2015b), que é um sistema de comunicação entre bactérias, que permite que comuniquem e funcionem como uma entidade única, protegendo-as de condições adversas (Mukherji and Prabhune, 2014) e parece estar envolvido na formação de biofilmes. Neste sentido, ao interferir com o sistema QS o linalool pode alterar a regulação da formação de biofilmes. Tal foi verificado na investigação de Alves e colegas, em que o linalool inibiu não

só a formação de biofilmes como também dispersou biofilmes pré-estabelecidos de *A. baumannii* (Alves et al., 2016). Porém, em biofilmes bacterianos o efeito do linalool depende não só da concentração utilizada, mas também do microrganismo, sendo que em bactérias Gram-negativas o linalool apresenta melhor atividade comparativamente a Gram-positivas (Alves et al., 2016; Budzyńska et al., 2011). Assim, dado que o linalool apresenta atividade antimicrobiana e antibiofilme, o mesmo parece ser uma alternativa promissora aos agentes antimicrobianos frequentemente usados.

Na literatura, têm sido descritas algumas interações entre o linalool e outros constituintes de óleos essenciais, mas também entre o linalool e óleos essenciais. Bassolé e colegas verificaram uma interação sinérgica entre o linalool e o eugenol contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e uma interação aditiva entre o linalool e o mentol contra as mesmas bactérias (Bassolé et al., 2010). Por outro lado, Herman e colegas observaram uma interação sinérgica entre o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e o linalool contra *P. aeruginosa*, com a mesma combinação desencadeando um efeito aditivo contra *E. coli* e *S. aureus* (Herman et al., 2015). Os mesmos investigadores concluem que a adição do linalool a óleos essenciais não só melhora substancialmente a eficácia antimicrobiana como também permite a redução das concentrações utilizadas de ambos, podendo-se assim tirar partido dos seus efeitos sinérgicos e aditivos (Herman et al., 2015).

Tendo também em conta as atividades antimicrobianas descritas, o linalool apresenta potencial no controlo de microrganismos, nomeadamente bactérias consideradas problemáticas a nível hospitalar. Assim, torna-se importante o estudo do potencial sinérgico de linalool e desinfetantes, como forma de aumentar a eficácia do desinfetante.

Capítulo 2 - Objetivos

O objetivo global deste trabalho foi a exploração da possível aplicação de resveratrol e linalool como agentes de controlo de bactérias patogénicas, fornecendo dados para o desenvolvimento futuro de aplicações destes compostos naturais.

Nos últimos anos, tem-se dado foco à investigação relativa à possível utilização dos compostos de origem natural para reduzir a contaminação ou desenvolvimento de bactérias patogénicas nos alimentos. Contudo, pouco se conhece sobre os mecanismos de resistência homóloga e resistência cruzada relativa a compostos naturais. Assim, numa primeira parte este trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

- Esclarecer se o uso de concentrações subletais de resveratrol pode influenciar o desenvolvimento de resistência a antibióticos e desinfetantes em *L. monocytogenes* e *S. aureus*.
- Avaliar se baixas concentrações de resveratrol podem induzir proteção celular em condições adversas, nomeadamente baixo pH e temperatura elevada.

Por outro lado, sabe-se que os desinfetantes são indispensáveis no controlo da infeção em ambientes clínicos. No entanto, tem-se verificado um aumento das resistências dos microrganismos a estes produtos. Assim, torna-se fundamental a pesquisa de novos agentes antimicrobianos, bem como novas combinações. Deste modo, tem-se como objetivo específico:

- Avaliar o possível efeito sinérgico entre o linalool e desinfetantes, utilizados habitualmente na prática clínica, em *S. aureus* e *A. baumannii*.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. Microrganismos

No trabalho laboratorial foram utilizadas três estirpes de referência, nomeadamente *Acinetobacter baumannii* LMG 1025 e *Listeria monocytogenes* LMG 16779 obtidas da coleção BCCM/LMG *Bacteria collection*, e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3.2. Armazenamento e preparação das estirpes

As estirpes utilizadas foram armazenadas em tubos criogénicos a uma temperatura de - 80 °C em meio adequado com glicerol, de forma a minimizar o risco de alteração da suscetibilidade aos antimicrobianos (CLSI, 2012). Antes da realização dos ensaios, as estirpes foram subcultivadas em meio *Tryptic Soy Agar* (TSA) ou *Mueller-Hinton Agar* (MHA), dependendo do método e/ou do microrganismo, por forma a obter uma cultura pura e garantir o crescimento ótimo.

3.3. Agentes antimicrobianos

Para a realização deste trabalho utilizaram-se vários agentes antimicrobianos, nomeadamente antibióticos, desinfetantes e compostos de origem natural, que se encontram na tabela 1.

Tabela 1: Agentes antimicrobianos utilizados no trabalho laboratorial.

	Agente antimicrobiano	Grau de pureza	Fornecedor
Antibióticos	Ampicilina (sal de sódio)	-	Nzytech
	Eritromicina	-	Sigma-Aldrich
	Hidroclorato de vancomicina	-	Sigma-Aldrich
Desinfetantes	Ácido peracético	39 %	Sigma-Aldrich
	Cloreto benzalcónio	-	Sigma-Aldrich
	Clorohexidina digluconato	20 %	Sigma-Aldrich
	Hipoclorito de sódio	10-15 % de cloro disponível	Sigma-Aldrich
Compostos de origem natural	Resveratrol	>98 %	TCL
	Linalool	97 %	Sigma-Aldrich

3.4. Reagentes

Para além dos agentes antimicrobianos, foram utilizados outros reagentes que se apresentam na tabela 2.

Tabela 2: Lista dos reagentes utilizados no trabalho laboratorial.

Reagente	Grau de pureza	Fornecedor
Agar	-	Conda
<i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	-	Merck KGaA
<i>Mueller-Hinton Broth</i> (MHB)	-	Liofilchem
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Fisher Chemical
Cloreto de sódio	-	Fisher Chemical
Ácido clorídrico	37 %	Fisher Chemical

3.5. Equipamentos

Para a elaboração de todos os procedimentos, também foi necessário recorrer a alguns equipamentos que se encontram descritos na tabela 3.

Tabela 3: Lista de equipamentos utilizados.

Equipamento	Marca e Modelo
Autoclave	Uniclave 88
Balança analítica	Sartorius CP 225 D
Balança de precisão	KERN PLJ 510 - 3M
Contador de colónias	P-Selecta Digital S
Banho térmico	Nahita Digital Water Bath 601/12
Densitómetro	Biosan DEN-1B McFarland Densitometer
Estufa (37 °C)	Binder
Espectrofotómetro	Pharmacia Biotech - Ultrospec 3000
Incubador Orbital	Aralab - Agitorb 200
Medidor de pH	Thermo Scientific Orion Star A211 pH Meter
Micro-centrífuga	Hettich Mikro 200 R V1.08

3.6. Avaliação da adaptação ao resveratrol e desenvolvimento de resistências cruzadas

A influência de utilização de concentrações subinibitórias de resveratrol no desenvolvimento de resistência a agentes antimicrobianos e aquisição de proteção contra condições adversas foi avaliada em duas bactérias de relevância no sector alimentar, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. O processo global encontra-se esquematizado na figura 4.

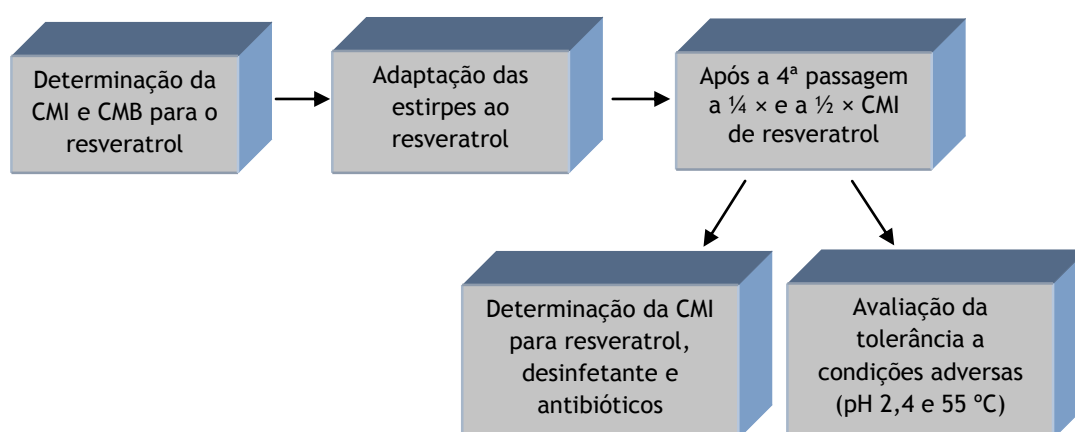


Figura 4: Processo global realizado para avaliar a influência do resveratrol sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes* (CMI: concentração mínima inibitória; CMB: concentração mínima bactericida).

3.6.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para o resveratrol foi efetuada pelo método de microdiluição, segundo a norma M07-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com algumas alterações (CLSI, 2012). Para tal realizaram-se diluições sucessivas (1:2) do resveratrol, numa placa estéril de 96 poços, contendo 50 µL de meio *Tryptic Soy Broth* (TSB). O intervalo de concentrações testadas de resveratrol foi de 400 a 3,125 µg/mL. De forma a aumentar a solubilidade do resveratrol, o composto foi previamente dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo que a concentração final deste composto nunca excedeu 2 % (v/v). As bactérias foram cultivadas em meio TSA, e incubadas a 37 °C durante cerca de 24 h. Após este período, procedeu-se à suspensão das bactérias numa solução de cloreto de sódio (0,85 %), e ajustou-se a turbidez da suspensão a 0,5 unidades de McFarland. De seguida, o inóculo foi diluído em meio TSB de modo a obter uma suspensão celular com aproximadamente 1×10^6 UFC/mL. Assim, após a distribuição de 50 µL de inóculo diluído, cada poço continha uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL. Como controlo positivo utilizaram-se poços com meio TSB e inóculo e como controlo negativo utilizaram-se poços

com meio e resveratrol. A placa foi incubada a 37 °C durante 16 a 20 h. Definiu-se como CMI, a concentração mais baixa de resveratrol que inibiu o crescimento das bactérias detetado a olho nu. Os ensaios foram efetuados em triplicado realizando-se pelo menos três ensaios independentes.

3.6.2. Determinação da concentração mínima bactericida (CMB)

Após os ensaios da determinação da CMI, de forma a avaliar a CMB, foram pipetados 20 µL de cada poço, sem crescimento, para placas de TSA. Incubaram-se as placas *overnight* a 37 °C. Posteriormente contaram-se o número de colónias que cresceram a partir de cada poço e determinaram-se as unidades formadoras de colónias por mL (UFC/mL). A CMB foi considerada como a concentração mais baixa de resveratrol que levou a uma redução de 99,9 % em relação ao inóculo inicial (Paulo et al., 2010).

3.6.3. Adaptação das estirpes ao resveratrol

A adaptação das estirpes ao resveratrol foi efetuada conforme descrito por Apolónio e colegas, com algumas alterações (Apolónio et al., 2014). As estirpes bacterianas foram repicadas para placas de meio TSA, e incubadas a 37 °C durante 15 h. Após este período, foram inoculados 10 mL de meio TSB, num erlenmeyer de 50 mL, e incubados num orbital a 37 °C, 250 rpm, durante aproximadamente 15 h. No fim da incubação, centrifugaram-se 300 µL de cada cultura a $2790 \times g$, durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o depósito celular ressuspensionado em meio TSB suplementado com 50 µg/mL de resveratrol ($\frac{1}{4} \times$ CMI). Por sua vez, este foi utilizado para inocular 10 mL de meio TSB suplementado com a mesma concentração de resveratrol. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 24 h. Durante quatro dias, as células foram transferidas sequencialmente para meio fresco de TSB (suplementado com 50 µg/mL de resveratrol), procedendo como descrito. O crescimento bacteriano foi acompanhado, a cada passagem, pela medição da densidade ótica a 600 nm às 0 h e às 24 h de incubação. Após quatro passagens na mesma concentração de resveratrol, as bactérias foram transferidas para meio TSB suplementado com o dobro da concentração anterior, ou seja, 100 µg/mL ($\frac{1}{2} \times$ CMI), e assim sucessivamente até haver ausência de crescimento bacteriano (Apolónio et al., 2014). Tal como na subseção 3.6.1. a concentração de DMSO nunca excedeu os 2 % (v/v). Os ensaios foram acompanhados por um controlo do crescimento em que as bactérias cresceram apenas em meio TSB, e um controlo de solvente em que as células cresceram na presença de DMSO à concentração usada no ensaio. Realizaram-se pelo menos três ensaios independentes.

3.6.4. Determinação da concentração mínima inibitória após adaptação das estirpes

Para determinação da CMI do resveratrol, desinfetante e antibióticos, ao longo do ensaio da adaptação ao resveratrol, procedeu-se de modo semelhante ao anteriormente descrito no ponto 3.6.1, com a exceção de que o inóculo foi preparado usando a suspensão celular do ensaio de adaptação ao resveratrol. Para tal, centrifugou-se 1 mL de cada suspensão (8000 × g, 5 min, 4 °C), removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o depósito celular em solução salina (NaCl a 0,85%), acertando-se posterior o inóculo a 0,5 unidades de MacFarland.

Os intervalos de concentração testados foram 400-6,25 µg/mL para o resveratrol, 16-0,25 µg/mL para o cloreto de benzalcónio, 16-0,008 µg/mL para a ampicilina e eritromicina, e 64-0,031 µg/mL para a vancomicina.

3.6.5. Avaliação da tolerância a condições adversas

Após a 4ª passagem a $\frac{1}{4}$ e a $\frac{1}{2}$ × CMI de resveratrol (concentrações subinibitórias), as células adaptadas foram sujeitas a condições adversas: pH ácido (2,4) e temperatura de 55 °C. Para tal, recolheram-se as células por centrifugação (5 min, 4 °C) de um volume adequado das suspensões celulares. Os depósitos celulares foram lavados com meio TSB uma vez antes da sua suspensão em meio TSB a uma concentração de cerca de 10^8 UFC/mL.

3.6.5.1. Tolerância ao ácido

Com o objetivo de avaliar a tolerância das células a condições ácidas, usou-se uma metodologia previamente descrita por Lundén et al. (2008) acidificando meio TSB a um pH de 2,4 com ácido hidrocloreídrico a 1 M (Lundén et al., 2008). Foram pipetados 4950 µL de meio acidificado para tubos de vidro e adicionou-se 50 µL das suspensões para os respetivos tubos, tendo sido mantidos a uma temperatura de 25 °C durante todo o procedimento. A viabilidade celular foi acompanhada pela recolha de amostras aos tempos de incubação de 0, 5, 10, 15 e 30 min para *S. aureus*; e 0, 30, 60 e 120 min para a *L. monocytogenes*. Para contagem das células viáveis, procedeu-se à realização de diluições sucessivas de 1:10 em tampão fosfato salino a pH 7,5 (*Phosphate buffered saline - PBS*) em placa de 96 poços, posteriormente pipetaram-se 10 µL de cada poço e inocularam-se placas de TSA. As UFC foram contadas após a incubação das placas a 37 °C durante 48 h. O ensaio foi realizado usando células resultantes do método da adaptação, tendo sido também acompanhado pelos controlos do crescimento e do solvente. Realizaram-se pelo menos três ensaios independentes.

3.6.5.2. Tolerância ao calor

Para avaliar a resposta das células a stress térmico, submeteram-se a uma temperatura de 55°C, para tal procedeu-se de modo semelhante ao método anteriormente descrito, com algumas diferenças (Lundén et al., 2008). Foram pipetados 4950 µL de meio TSB não acidificado para tubos de vidro e adicionou-se 50 µL das suspensões para os respetivos tubos, tendo estes sido incubados a uma temperatura de 55 °C num banho de água termostaticado. A viabilidade celular foi acompanhada pela recolha de amostras aos tempos de incubação de 0, 10, 20, 30 e 40 min para *S. aureus* e 0, 10, 20, 30, 40 e 60 min para a *L. monocytogenes*. As diluições das amostras foram efetuadas em meio TSB, e a contagem de células viáveis realizada de acordo com o descrito no ponto 3.6.5.1.

3.7. Avaliação do potencial sinérgico entre linalool e desinfetantes

O potencial sinérgico entre o linalool e desinfetantes foi avaliado determinando-se inicialmente as concentrações mínimas inibitórias (CMI) para os vários agentes antimicrobianos, sendo que posteriormente recorreu-se ao método de *checkerboard* de forma a estudar possíveis efeitos sinérgicos.

3.7.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A determinação da CMI para linalool e desinfetantes (ácido peracético, cloreto de benzalcónio, clorohexidina digluconato e hipoclorito de sódio) foi realizada de forma semelhante ao descrito na subsecção 3.6.1., usando-se o meio MHB tal como descrito pela norma M07-A9 (CLSI, 2012), suplementado com DMSO numa concentração máxima de 2 % (v/v) por forma a aumentar a solubilidade do linalool. As concentrações testadas foram 32 a 0,25 µL/mL para o linalool; 0,078 a $6,09 \times 10^{-4}$ % (v/v) para o ácido peracético; 32 a 0,25 µg/mL para o cloreto de benzalcónio; 0,020 a $3,75 \times 10^{-5}$ % (v/v) para a clorohexidina digluconato; e 5 a 0,039 % (v/v) para o hipoclorito de sódio.

3.7.2. Ensaio de sinergismo

Para avaliar o possível efeito sinérgico entre o linalool e os desinfetantes, recorreu-se ao método de *checkerboard*. Para tal foi necessário preparar duas placas de 96 poços. Numa delas realizaram-se as diluições sucessivas do linalool na direção horizontal, enquanto na outra fizeram-se as diluições sucessivas do desinfetante em estudo na direção vertical, utilizando-se meio MHB para efetuar as diluições de cada composto. As concentrações testadas para o linalool e para cada desinfetante foram escolhidas consoante os valores de CMI determinados

anteriormente. Após a preparação das placas, transferiu-se 50 µL de cada coluna da segunda placa (com o desinfetante) para a coluna correspondente da primeira placa (com o linalool). A partir de uma cultura bacteriana, cultivada em MHA, realizou-se uma suspensão celular em solução salina a 0,85%, ajustando-se a turbidez a 0,5 unidades de MacFarland e fez-se uma diluição 1:67 do inóculo em meio MHB. Adicionou-se 50 µL do inóculo diluído a todos os poços, de modo a obter uma concentração celular final de 5×10^5 UFC/mL e 150 µL de volume final por cada poço. O controlo negativo continha apenas 150 µL de meio MHB, enquanto o controlo positivo era constituído por 100 µL de meio MHB e 50 µL de inóculo. Incubou-se a placa a 37 °C durante 16 a 20 h (Duarte et al., 2012). Após o período de incubação, registaram-se os valores da CMI de cada composto isolado e na combinação.

A concentração inibitória fracionada (CIF) é definida pelo rácio entre a CMI na combinação dos dois compostos e a CMI do composto sozinho. Dado que, cada *checkerboard* gera diferentes combinações, utilizou-se os valores de CIF das combinações mais eficazes para calcular o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF). A natureza da interação entre o linalool e cada desinfetante foi definido pelo ICIF, e resulta da soma da CIF do linalool e do desinfetante (equação 1).

$$\begin{aligned} \text{ICIF} &= \text{CIF linalool} + \text{CIF desinfetante} \\ &= \frac{\text{CMI linalool combinação}}{\text{CMI linalool isolado}} + \frac{\text{CMI desinfetante combinação}}{\text{CMI desinfetante isolado}} \quad (1) \end{aligned}$$

O efeito da interação entre os dois compostos foi considerado sinérgico quando $\text{ICIF} \leq 0,5$; aditivo quando $0,5 < \text{ICIF} \leq 1$; subtrativo quando $1 < \text{ICIF} < 4$ e antagónico quando $\text{ICIF} \geq 4$ (Duarte et al., 2012). Realizaram-se pelo menos três replicados independentes.

3.8. Análise estatística

Os dados relativos ao efeito da adaptação ao resveratrol no crescimento bacteriano e à avaliação da aquisição de proteção contra condições adversas em *S. aureus* e *L. monocytogenes*, foram analisados estatisticamente, recorrendo ao GraphPad Prism 6.01, para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) utilizando ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4.1. Atividade antimicrobiana do resveratrol

4.1.1. Concentração Mínima Inibitória do resveratrol

L. monocytogenes e *S. aureus* são duas das espécies bacterianas que têm suscitado preocupação na área alimentar, pois a contaminação de alimentos pelas mesmas pode originar doenças que são uma das causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (WHO, 2015). Dado o aumento de resistências dos microrganismos aos vários grupos de agentes antimicrobianos, atualmente disponíveis, torna-se fundamental encontrar alternativas eficazes. O resveratrol foi apresentado e recomendado como potencial conservante alimentar devido às suas propriedades antimicrobianas contra *S. aureus* (Paulo et al., 2010) e *L. monocytogenes* (Ferreira and Domingues, 2016), logo é importante estudar a capacidade de adaptação e desenvolvimento de resistências por parte destes microrganismos a este composto.

Para avaliar a suscetibilidade de uma determinada bactéria a um agente antimicrobiano podem ser utilizados métodos de diluição em meio sólido ou em meio líquido. O método mais comum é a diluição em meio líquido, onde se incorpora diferentes concentrações do agente em estudo em tubos ou em placas de 96 poços. O inóculo é adicionado e após incubação determina-se a concentração mínima inibitória (CMI), que é definida como a concentração mais baixa do agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo (CLSI, 2012). Neste trabalho, testou-se um intervalo de concentrações de resveratrol entre 400 a 3,125 µg/mL, sendo que a 200 µg/mL foi determinada como a CMI para *S. aureus* ATCC 25923 e *L. monocytogenes* LMG 16779, o que está de acordo com o previamente descrito (Ferreira and Domingues, 2016; Paulo et al., 2010).

4.1.2. Concentração Mínima Bactericida do resveratrol

Após a determinação da CMI, procedeu-se a um subcultivo dos poços onde não se observava crescimento visível para meio sólido na ausência de agente antimicrobiano. A concentração mínima bactericida é definida como a concentração necessária para reduzir em 99,9% o inóculo inicial (Paulo et al., 2010). Pelos resultados obtidos, verificou-se que a CMB para as duas espécies, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, foi maior que 400 µg/mL. Devido à baixa solubilidade do resveratrol não foi possível testar concentrações superiores a 400 µg/mL aquando da determinação da CMI, e assim não foi possível determinar a CMB. Esta limitação no intervalo a testar devido à baixa solubilidade do composto já também tinha sido previamente verificada por Paulo e colaboradores (Paulo et al., 2010).

4.1.3. Adaptação de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* ao resveratrol

O resveratrol possui várias propriedades benéficas para a saúde humana, podendo atuar como agente antioxidante, cardioprotetor, anticancerígeno, antidiabético, neuroprotetor e anti-envelhecimento (Gambini et al., 2015). Para além destas, o resveratrol também possui atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (Lee and Lee, 2014; Paulo et al., 2010). Contudo não se sabe se a utilização de concentrações subinibitórias deste composto pode levar a adaptação a condições adversas, bem como a resistência homóloga e cruzada, podendo assim condicionar a sua aplicação como conservante a nível da indústria alimentar.

Para avaliar a influência da exposição contínua das bactérias *S. aureus* e *L. monocytogenes* ao resveratrol na aquisição de resistência ao mesmo, as estirpes bacterianas foram submetidas a passagens sequenciais na presença de concentrações subinibitórias de resveratrol. Os ensaios foram iniciados com resveratrol numa concentração de $\frac{1}{4} \times CMI$, ou seja, 50 µg/mL. Após quatro passagens, as células foram expostas ao dobro da concentração de resveratrol (100 µg/mL), e assim sucessivamente. O crescimento foi acompanhado pela medição da DO às 0 h e às 24 h, utilizando o meio de cultura como branco. Os ensaios deram-se por terminados quando houve ausência de crescimento bacteriano, isto é, quando a DO às 24 h foi igual à DO às 0 h. A variação no crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* a concentrações subinibitórias e inibitórias de resveratrol, ou seja a capacidade de adaptação destas espécies ao resveratrol, encontra-se indicada nas tabelas 4 e 5, respetivamente.

Tabela 4: Variação no crescimento de *S. aureus* a concentrações subinibitórias e inibitórias de resveratrol.

Passagem	Concentração de Resveratrol			
	¼ × CMI	½ × CMI	1 × CMI	1,5 × CMI
CC				
1º	4,830 ± 0,119 ^b	27,529 ± 1,215 ^{a,b}	29,044 ± 0,525 ^a	29,632 ± 0,962
2º	25,604 ± 1,018 ^a	28,849 ± 0,434 ^b	28,388 ± 0,613 ^a	
3º	25,182 ± 1,354 ^a	26,491 ± 0,670 ^{a,b}	28,107 ± 1,348 ^a	
4º	25,471 ± 1,820 ^a	25,391 ± 1,922 ^a	28,062 ± 0,929 ^a	
CS				
1º	4,746 ± 0,219 ^b	26,778 ± 2,339 ^a	28,418 ± 1,252 ^a	30,389 ± 0,354
2º	24,657 ± 1,457 ^a	28,021 ± 2,029 ^a	29,042 ± 2,262 ^a	
3º	26,911 ± 1,077 ^a	26,478 ± 0,765 ^a	28,950 ± 0,820 ^a	
4º	24,747 ± 1,260 ^a	24,374 ± 1,770 ^a	27,728 ± 0,597 ^a	
RV				
1º	4,846 ± 0,020 ^b	28,581 ± 0,601 ^a	2,699 ± 0,203 ^{a,c}	NG*
2º	23,974 ± 1,050 ^c	26,946 ± 0,968 ^a	4,572 ± 1,266 ^{a,c}	
3º	25,825 ± 0,862 ^a	27,025 ± 2,709 ^a	25,006 ± 1,293 ^b	
4º	25,418 ± 0,239 ^{a,c}	26,523 ± 0,595 ^a	25,118 ± 0,657 ^b	

*A variação no crescimento está representada como o rácio entre a DO às 24 h e a DO às 0 h. NG significa ausência de crescimento (*No Growth*). Os dados são apresentados como resultado da média de pelo menos três replicados independentes ± o desvio padrão. Para cada ensaio [controlo do crescimento (CC), controlo do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV)] os dados em coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (P<0,05).

Para além da análise estatística que se fez entre as várias passagens de cada ensaio, procedeu-se também a uma análise comparativa entre todos os ensaios. Na avaliação da influência do solvente no crescimento verificou-se que não há diferença significativa entre os controlos (p>0,05), o que significa que o DMSO que tinha a função de aumentar a solubilidade do resveratrol, não interferiu no crescimento bacteriano.

Pela análise da tabela 4, verifica-se que a exposição a concentrações subinibitórias de resveratrol induziu uma adaptação de *S. aureus* ao composto, conseguindo-se observar um decréscimo acentuado do crescimento da 4ª passagem a ½ × MIC para a 1ª passagem a 1 × CMI de resveratrol, porém, da 2ª para a 3ª passagem a 1 × MIC verifica-se um aumento significativo no crescimento (p<0,0001), que se mantém até à 4ª passagem. Contudo, o crescimento cessou a 1,5 × CMI. Por outro lado, verificou-se que a exposição a 1 × CMI de resveratrol levou a uma diminuição significativa do crescimento comparativamente aos controlos, principalmente na 1ª e na 2ª passagem (p<0,0001).

A exposição consecutiva a um agente antimicrobiano pode levar a uma seleção de uma porção da população bacteriana que se tornará mais tolerante ao mesmo durante o processo de adaptação, nomeadamente devido a alterações características da resistência adaptativa, como por exemplo uma sobre-expressão de bombas de efluxo. O comportamento observado para *S. aureus* a $1 \times$ CMI, em que da segunda para a terceira passagem se observa um aumento do crescimento, pode então estar associado a alterações celulares indicativas de uma adaptação ao resveratrol. De facto, a atividade das bombas de efluxo foi previamente descrita como um mecanismo de resistência a este composto em bactérias Gram-negativas, *Arcobacter butzleri* e *Arcobacter cryaerophilus* (Ferreira et al., 2014). Contudo, no caso do *S. aureus*, o crescimento acabou por cessar quando se aumentou a concentração de resveratrol para $1,5 \times$ CMI, possivelmente, porque adaptação não se tornou suficientemente estável para que desencadeasse uma resistência a concentrações superiores.

Tabela 5: Variação no crescimento de *L. monocytogenes* a concentrações subinibitórias e inibitórias de resveratrol.

Passagem	Concentração de resveratrol		
	$\frac{1}{4} \times$ CMI	$\frac{1}{2} \times$ CMI	$1 \times$ CMI
CC			
1º	8,326 ± 0,090 ^b	29,891 ± 4,006 ^a	33,819 ± 0,422 ^{a,b}
2º	23,509 ± 2,408 ^a	30,473 ± 0,665 ^a	31,125 ± 0,602 ^a
3º	27,928 ± 4,756 ^a	32,138 ± 1,377 ^a	39,603 ± 5,605 ^b
4º	30,518 ± 1,161 ^a	28,646 ± 1,915 ^a	
CS			
1º	8,462 ± 0,201 ^b	28,491 ± 0,519 ^a	33,367 ± 2,396 ^a
2º	24,687 ± 3,396 ^a	31,169 ± 1,047 ^a	31,592 ± 1,919 ^a
3º	28,503 ± 2,990 ^a	29,692 ± 2,417 ^a	39,554 ± 1,363 ^b
4º	31,223 ± 2,175 ^a	29,336 ± 2,546 ^a	
RV			
1º	8,241 ± 0,162 ^b	21,810 ± 1,562 ^a	8,537 ± 0,999
2º	23,261 ± 2,374 ^a	31,050 ± 1,254 ^b	2,991 ± 0,677
3º	26,573 ± 1,780 ^a	24,724 ± 4,368 ^{a,c}	NG*
4º	31,250 ± 1,770 ^c	25,921 ± 0,154 ^{a,b}	

*A variação no crescimento está representada como o rácio entre a DO às 24 h e a DO às 0 h. NG significa ausência de crescimento (*No Growth*). Os dados são apresentados como resultado da média de pelo menos três replicados independentes ± o desvio padrão. Para cada ensaio [controlo do crescimento (CC), controlo do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV)] os dados em coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

L. monocytogenes, de forma semelhante mas menos pronunciada que *S. aureus*, também aumentou o seu crescimento ao longo das passagens por exposição contínua a concentrações subinibitórias de resveratrol como é indicado na tabela 5, tendo conseguido sobreviver às primeiras duas passagens a 1 × CMI de resveratrol. Constatou-se que a 1ª e 2ª passagem de exposição a 1 × CMI de resveratrol são significativamente diferentes ($p < 0,0001$) dos controlos. Num estudo semelhante, Luz e colegas verificaram que a exposição de *L. monocytogenes* a concentrações crescentes (ciclos de 24 horas) de óleo essencial de orégãos e de carvacrol levou a um aumento na capacidade de sobrevivência até 2 × CMI e 1 × CMI, respetivamente (Luz et al., 2012).

Uma das possíveis explicações para o facto de o resveratrol não ter exercido uma atividade antimicrobiana tão eficaz, pode estar relacionada com o facto de as células no início de cada passagem já estarem provavelmente em fase estacionária, já que cada passagem da adaptação das células ao resveratrol durou 24 horas. Na verdade, sabe-se que as células que se encontram na fase exponencial estão mais ativas metabolicamente, designadamente no que diz respeito à síntese de ADN e também já foi previamente descrito que o mecanismo de ação do resveratrol em *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* poderia estar associado à inibição da síntese deste ácido nucleico, tendo-se verificado que as células que estavam mais ativas foram as mais suscetíveis ao composto (Ferreira et al., 2014). Assim sendo, pode pressupor-se que não exerceu uma atividade antimicrobiana tão eficaz como se as células se encontrassem na fase exponencial de crescimento, sendo prolongado o crescimento durante duas passagens a 1 × CMI, no entanto, sem indicação de desenvolvimento de resistência adaptativa.

De salientar que *S. aureus* teve a capacidade de superar as quatro passagens a 1 × CMI, enquanto *L. monocytogenes* cessou o seu crescimento na 3ª passagem. Tal pode ser devido ao facto de a DO às 0 h para *L. monocytogenes* ter sido sempre inferior à de *S. aureus*, assim as passagens sucessivas terão sido iniciadas com uma menor concentração de células, o que fez com que houvesse uma maior disponibilidade do resveratrol para exercer o seu efeito antibacteriano sobre uma menor concentração de células, já que a inibição da bactéria é proporcional à quantidade de antimicrobiano disponível para cada bactéria a um determinado tempo de exposição (Udekwu et al., 2009).

4.1.4. Concentração Mínima Inibitória do resveratrol e de outros antimicrobianos

Sabe-se que a exposição dos microrganismos a concentrações subletais de um determinado agente antimicrobiano pode levar à resistência ao mesmo agente, designada por resistência homóloga, ou pode levar à resistência a outros agentes antimicrobianos diferentes, denominada por resistência cruzada (Bikels-Goshen et al., 2010; Cebrián et al., 2010).

Os compostos de amónio quaternário são amplamente utilizados na indústria alimentar para higienizar e desinfetar não só os equipamentos, mas também as superfícies que contactam com os alimentos (Magalhães et al., 2016). Por outro lado, as penicilinas são os antibióticos comumente usados para tratar infeções causadas por *S. aureus*, principalmente a ampicilina, enquanto a eritromicina e a vancomicina são antibióticos usados no tratamento de infeções causadas por MRSA (Rayner and Munckhof, 2005). Estes mesmos antibióticos podem ser utilizados no tratamento de infeções causadas por *L. monocytogenes* (Donovan, 2015). Assim torna-se importante verificar se o uso de concentrações subletais de resveratrol influencia a resistência a um dos desinfetantes geralmente utilizados no setor alimentar, bem como aos antibióticos utilizados para tratar infeções causadas por *S. aureus* e por *L. monocytogenes*. Desta forma, para avaliar o possível desenvolvimento de resistências cruzadas, procedeu-se à determinação das CMI destes agentes antimicrobianos, utilizando-se como inóculos, as suspensões celulares resultantes do ensaio da adaptação ao resveratrol. As CMI obtidas dos vários agentes antimicrobianos para *S. aureus* e *L. monocytogenes* encontram-se nas tabelas 6 e 7, respetivamente.

Tabela 6: Concentração mínima inibitória ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos agentes antimicrobianos contra *S. aureus* após a quarta passagem das células em $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2} \times$ CMI resveratrol (CC: controlo do crescimento; CS: controlo do solvente; RV: ensaio com resveratrol).

Antimicrobiano	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	4ª P a $\frac{1}{4} \times$ CMI			4ª P a $\frac{1}{2} \times$ CMI		
	CC	CS	RV	CC	CS	RV
Resveratrol	200	200	200	200	200	200
Cloreto de benzalcónio	4	4	4	4	4	4
Ampicilina	1	1	1	1	1	1
Eritromicina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Vancomicina	2	2	2	2	2	2

Pela análise da tabela 6, verifica-se que a exposição de *S. aureus* a concentrações subletais de resveratrol não induziu adaptação ou aumento de tolerância ao desinfetante, cloreto de benzalcónio, nem aos antibióticos comumente utilizados na clínica para tratar infeções por esta bactéria. Para além disso, a exposição das células a uma concentração subinibitória superior não levou ao aumento dos valores de CMI. Podendo concluir-se que o resveratrol não levou ao desenvolvimento de resistência cruzada. Observa-se também que o valor de CMI para o resveratrol manteve-se igual entre os controlos do crescimento e do solvente, e o próprio ensaio com o resveratrol, indicando que não ocorreu desenvolvimento de resistência adaptativa.

Tabela 7: Concentração mínima inibitória ($\mu\text{g/mL}$) dos agentes antimicrobianos contra *L. monocytogenes* após a quarta passagem das células em $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$ resveratrol (CC: controlo do crescimento; CS: controlo do solvente; RV: ensaio com resveratrol).

Antimicrobiano	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
	4 ^a P a $\frac{1}{4} \times \text{CMI}$			4 ^a P a $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$		
	CC	CS	RV	CC	CS	RV
Resveratrol	200	200	200	200	200	200
Cloreto de benzalcónio	2	2	4	4	4	4
Ampicilina	1	1	1	1	1	1
Eritromicina	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Vancomicina	1	1	1	1	1	1

Analisando a tabela 7 pode verificar-se que também para a *L. monocytogenes* o valor da CMI para o resveratrol manteve-se constante no decorrer da adaptação ao mesmo, isto é, não houve alteração entre o ensaio propriamente dito e os controlos do crescimento e do solvente, quer a $\frac{1}{4}$ quer a $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$ de resveratrol, e o mesmo se verifica para os antibióticos. Concluindo-se assim que a exposição de *L. monocytogenes* a concentrações subinibitórias de resveratrol não induziu resistência homóloga, relativamente ao resveratrol, nem cruzada, em relação aos antibióticos. Contudo, para a determinação do CMI do cloreto de benzalcónio, observou-se uma CMI de 2 $\mu\text{g/mL}$ para a quarta passagem das células para o controlo do crescimento e do solvente, enquanto para o ensaio com $\frac{1}{4} \times \text{CMI}$ de resveratrol a CMI do cloreto de benzalcónio foi de 4 $\mu\text{g/mL}$, percebendo-se assim a existência de um desenvolvimento de resistência cruzada. Para além disso, parece ter ocorrido uma alteração celular que levou a que com o aumento das passagens ocorresse um aumento da CMI do cloreto de benzalcónio de 2 $\mu\text{g/mL}$ para 4 $\mu\text{g/mL}$ para os controlos de crescimento e de solvente.

Os compostos de amónio quaternário são biocidas catiónicos e são frequentemente usados no sector clínico e alimentar (To et al., 2002). A resistência da *L. monocytogenes* aos compostos de amónio quaternário, sobretudo ao cloreto de benzalcónio, tem sido descrita na literatura (Aase et al., 2000; Romanova et al., 2006; Tamburro et al., 2015). Está igualmente descrito que após a exposição de *L. monocytogenes* ao cloreto de benzalcónio pode existir uma sobre-expressão de genes envolvidos na biossíntese do peptidoglicano e ácidos teicóicos ou a sobre-expressão de bombas efluxo que levam à resistência ao mesmo (Fox et al., 2011; Romanova et al., 2006). No presente trabalho, apesar das células dos controlos não estarem expostas ao resveratrol, poderá ter ocorrido um aumento da estabilidade da parede celular que poderá ter levado a uma alteração da permeabilidade das células, induzindo uma aumento da resistência ao cloreto de benzalcónio.

Tsai e colaboradores avaliaram o efeito do resveratrol na proteção das células epiteliais da córnea à citotoxicidade causada pela moxifloxacina e pelo cloreto de benzalcónio, verificando que o resveratrol protegia as células epiteliais dos efeitos citotóxicos causados por estes compostos (Tsai et al., 2015). A moxifloxacina é geralmente usada no tratamento de infeções oculares ou como agente profilático antes ou depois das cirurgias oculares, enquanto o cloreto de benzalcónio é o conservante mais frequentemente adicionado a soluções oftálmicas comerciais, no entanto, ambos compostos apresentam toxicidade para as células epiteliais da córnea. A produção de espécies reativas de oxigénio está associada à citotoxicidade por parte destes dois compostos, e os investigadores verificaram que o resveratrol, sendo um composto antioxidante, protegeu as células epiteliais dos efeitos citotóxicos causados pela moxifloxacina e pelo cloreto de benzalcónio (Tsai et al., 2015). Considerando, o efeito antioxidante do resveratrol, apesar de no presente trabalho terem sido utilizadas células bacterianas, poderá ter ocorrido um mecanismo semelhante ao descrito por Tsai e colegas, tendo o resveratrol exercido um efeito protetor sobre as células de *L. monocytogenes* do stress oxidativo causado pelo cloreto de benzalcónio. Observações semelhantes foram efetuadas num estudo em que se constatou que o resveratrol interfere com ação letal de vários agentes antimicrobianos em *S. aureus* e *Escherichia coli*, devido a uma redução das espécies reativas de oxigénio (Liu et al., 2016).

4.1.5. Avaliação da tolerância a condições adversas de pH e temperatura

Na indústria alimentar, os agentes ácidos e a energia térmica são importantes fatores na eliminação de microrganismos, incluindo *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Cebrián et al., 2010; Lundén et al., 2008). *L. monocytogenes* é frequentemente sujeita a stress ácidos e térmicos durante a manufatura e/ou a manipulação dos alimentos e durante os procedimentos de sanitização (Lundén et al., 2008). Este microrganismo consegue sobreviver e crescer em condições adversas, nomeadamente a temperaturas elevadas e baixos pHs, sendo que a tolerância ao ácido e ao calor pode influenciar a sobrevivência nas superfícies e nos alimentos (Lundén et al., 2008; Payeras-Cifre and Hernandez-Milian, 2014). Em relação a *S. aureus* pouco se sabe acerca da sua capacidade para desenvolver respostas de resistência a condições de stress (Cebrián et al., 2010), ainda que seja capaz de crescer num largo intervalo de temperatura (7 a 48,5 °C) e pH (4,2 a 9,3) (Gustafson et al., 2014). Está descrito que podem existir combinações protetoras de stress subletais e letais, nomeadamente pH ácido-temperatura e temperatura-pH ácido (Cebrián et al., 2010).

O uso de compostos antimicrobianos de origem natural como alternativa aos agentes antimicrobianos comerciais é considerado como seguro, no entanto a exposição de bactérias patogénicas a esses compostos pode levar a uma resposta adaptativa, e por isso, alterar a sua sensibilidade a antibióticos e a outras condições desfavoráveis (Bikels-Goshen et al., 2010; Burt, 2004). Assim, torna-se fundamental perceber se a exposição de *S. aureus* e *L.*

monocytogenes a concentrações subinibitórias de resveratrol pode induzir proteção cruzada a condições adversas.

De forma a avaliar se baixas concentrações de resveratrol podem induzir proteção celular em condições adversas de pH e temperatura, as células de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, obtidas a partir do ensaio de adaptação foram expostas a um baixo pH (2,4) e a uma temperatura elevada (55 °C). Ao longo do tempo foram recolhidas amostras para acompanhar a viabilidade celular. Os resultados obtidos encontram-se representados nas figuras 5 e 7 (ácido), 9 e 11 (temperatura).

Para uma melhor avaliação da tolerância das estirpes ao ácido e à temperatura, de modo a comparar o ensaio com o resveratrol e os controlos do crescimento e do solvente, foi determinado o tempo de redução decimal, também designado por *D-value*, que corresponde ao tempo necessário para eliminar 90 % da população bacteriana exposta a uma dada condição (Mazzola et al., 2003). A determinação foi efetuada a partir do inverso negativo do declive da regressão linear das curvas de sobrevivência, ou seja, $\log(\text{UFC/mL})$ em função do tempo (Mazzola et al., 2003). Assim, os tempos de redução decimal foram determinados para *S. aureus* e *L. monocytogenes* quando sujeitos a um pH ácido (2,4) ou a uma temperatura elevada (55 °C), após a quarta passagem com $\frac{1}{4}$ ou $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$ de resveratrol e respetivos controlos, estando as curvas de sobrevivência representadas nas figuras 6 e 8 (ácido), 10 e 12 (temperatura).

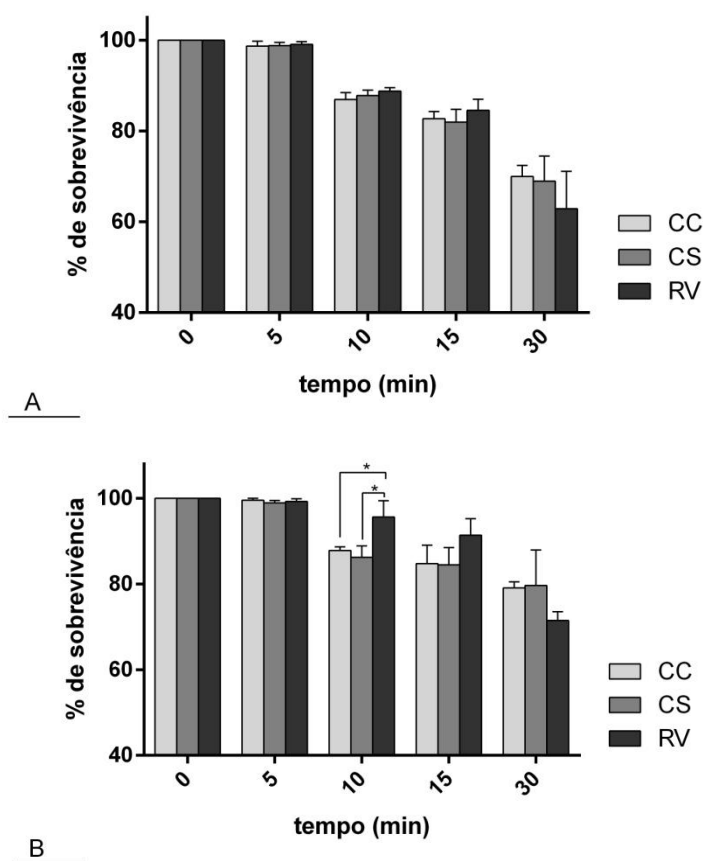


Figura 5: Efeito do pH (2,4) em *S. aureus* após a 4ª passagem da adaptação a 1/4 x CMI (A) e a 1/2 x CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controlo do crescimento (CC), controlo do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV).

Pela análise da figura 5 verifica-se que a exposição de *S. aureus* a baixas concentrações de resveratrol, em geral, não induziu proteção celular ao ácido. Para os ensaios relativos a 1/4 x CMI de resveratrol verificou-se que os controlos não apresentam diferença significativa entre si e relativamente ao ensaio com resveratrol. No entanto, nos ensaios correspondentes a 1/2 x CMI de resveratrol, aos 10 min de incubação com o ácido observa-se diferença estatística entre os controlos e o ensaio com o resveratrol ($p < 0,05$). Globalmente foi observado um aumento nas percentagens de sobrevivência, verificando-se significância estatística entre os ensaios com o resveratrol correspondente a 1/2 x CMI (Fig. 5A) e a 1/4 x CMI (Fig. 5B) aos 30 minutos ($p < 0,05$). Tal pode ser justificado, pelo facto das células se terem adaptado às condições a que foram sujeitas, nomeadamente ao resveratrol. Contudo, quer para os ensaios relativos a 1/4 ou a 1/2 x CMI de resveratrol, aos 30 minutos observa-se uma menor percentagem de sobrevivência no ensaio com resveratrol comparativamente aos controlos, embora sem significado estatístico ($p > 0,05$). Esta tendência é confirmada pela determinação do *D-value* (figura 6), obtendo-se tempos de redução decimal superiores para os ensaios relativos a 1/2 x CMI (19,80 min para o controlo do crescimento; 20,20 min para o controlo do solvente e 16,05

min para o ensaio com resveratrol) do que para $\frac{1}{4} \times$ CMI de resveratrol (14,66 min para CC; 14,37 min para CS e 12,05 min para RV). Verificando-se assim, que a $\frac{1}{2} \times$ CMI de resveratrol foi necessário um tempo superior para eliminar 90 % da população bacteriana, tanto para os controles como para o ensaio propriamente dito. Também neste caso, tal como observado no crescimento se verifica uma alteração celular que aumenta a capacidade de sobrevivência de *S. aureus* com as passagens do microrganismo mesmo na ausência de resveratrol.

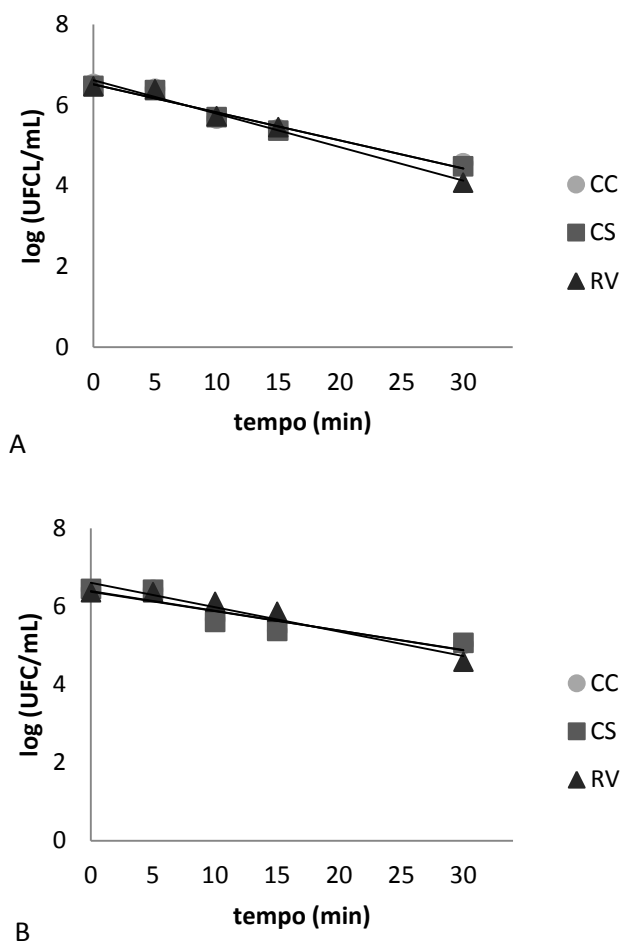


Figura 6: Curva de sobrevivência em pH ácido (2,4) para *S. aureus* após a 4ª passagem da adaptação a $\frac{1}{4} \times$ CMI (A) e $\frac{1}{2} \times$ CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controle do crescimento (CC), controle do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV).

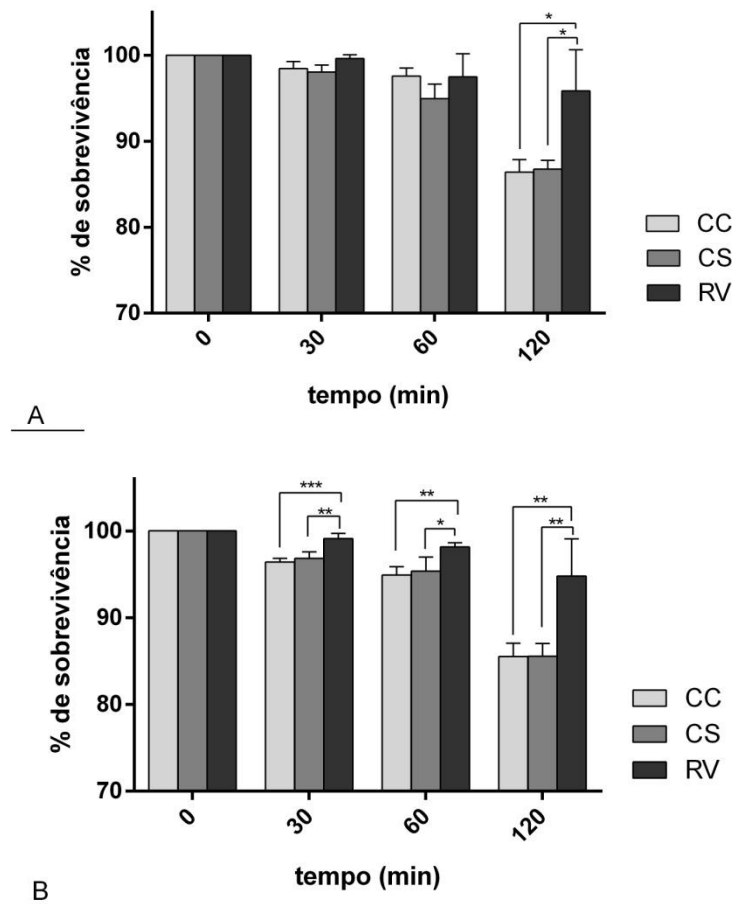


Figura 7: Efeito do pH (2,4) em *L. monocytogenes* após a 4ª passagem da adaptação a $1/4 \times$ CMI (A) e a $1/2 \times$ CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controle do crescimento (CC), controle do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV).

Relativamente a *L. monocytogenes*, para os ensaios relativos a $1/4 \times$ CMI verificou-se um aumento significativo da percentagem de sobrevivência aos 120 min entre os ensaios com células provenientes dos controlos e do ensaio com o resveratrol, sem se observar uma redução significativa entre o ensaio com o resveratrol ao tempo 0, que corresponde a 100 % de sobrevivência, e aos 120 min em que se obteve 95,8 % de sobrevivência. Contudo, a $1/2 \times$ CMI, aos 30, 60 e 120 min, observam-se maiores percentagens de sobrevivência no ensaio com o resveratrol comparativamente aos controlos. Verificou-se uma pequena redução significativa da sobrevivência entre os 0 (100 %) e os 120 min (94,7 %) do ensaio com o resveratrol ($p < 0,05$), mas em relação aos controlos obteve-se aproximadamente 15 % de redução da sobrevivência entre o início e o final do ensaio ($p < 0,0001$).

Ao determinar o *D-value* (figura 8) verificou-se que não houve uma redução decimal até aos 120 min. No entanto, entre os 0 e 120 minutos foi observada uma redução logarítmica para os controlos de 0,92 e 0,96 para os ensaios correspondentes a $1/4$ e $1/2 \times$ CMI de resveratrol, enquanto no caso da experiência efetuada com células provenientes do ensaio com o

resveratrol obteve-se uma redução logarítmica menor (0,45 e 0,19 para a os ensaios relativos a $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2} \times$ CMI de resveratrol). Assim pode concluir-se que a exposição a concentrações subinibitórias de resveratrol proporcionou um incremento da sobrevivência das células de *L. monocytogenes* quando sujeita a stress ácido (pH de 2,4), a qual parece aumentar com a exposição.

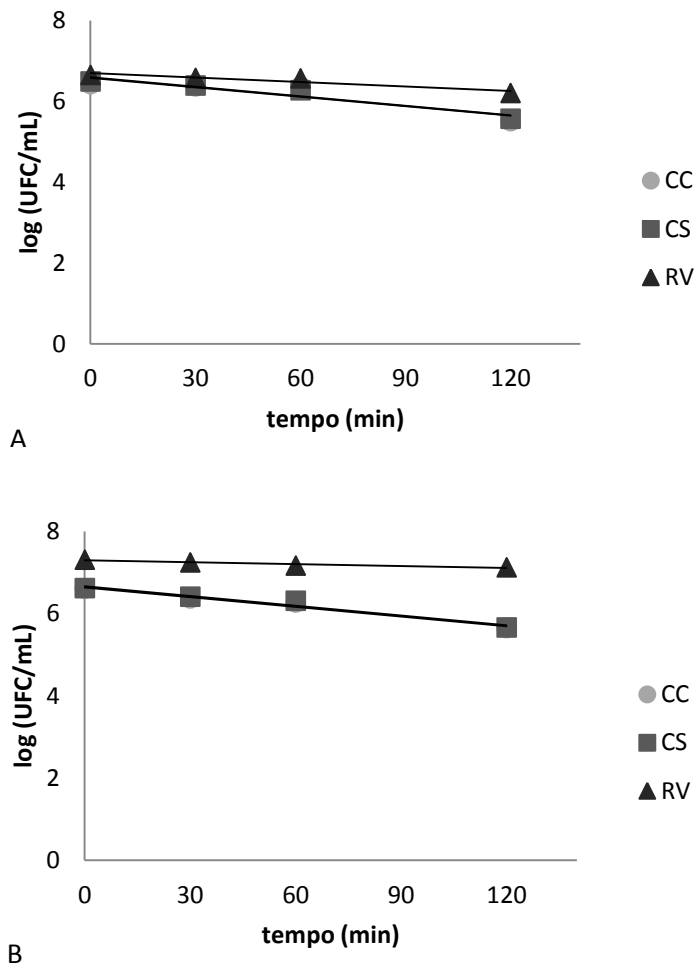
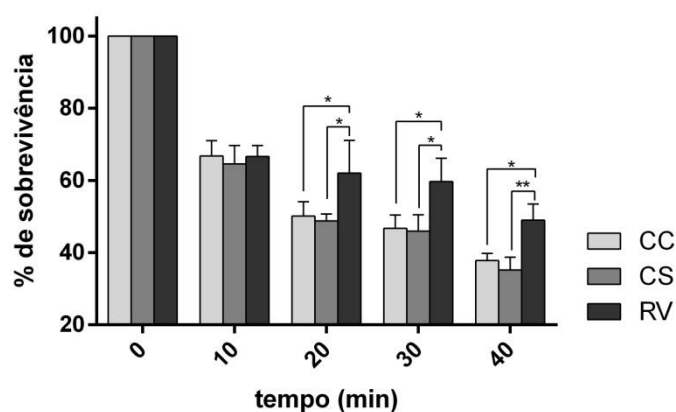
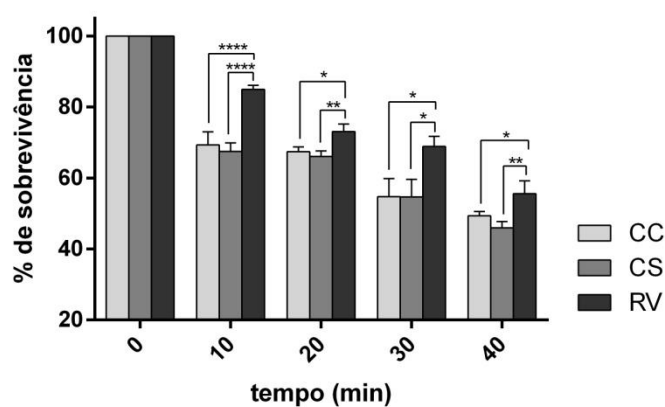


Figura 8: Curvas de sobrevivência em pH ácido (2,4) para *L. monocytogenes* após a 4ª passagem da adaptação a $\frac{1}{4} \times$ CMI (A) e $\frac{1}{2} \times$ CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controlo do crescimento (CC), controlo do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV).



A



B

Figura 9: Efeito da temperatura (55 °C) em *S. aureus* após a 4ª passagem da adaptação a $1/4 \times$ CMI (A) e a $1/2 \times$ CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controlo do crescimento (CC), controlo do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV).

Pela análise da figura 9, verifica-se que a exposição prévia a baixas concentrações de resveratrol permitiu um posterior aumento da sobrevivência das células de *S. aureus* quando expostas ao choque térmico (temperatura de 55 °C) em comparação aos controlos. Aos 10 minutos dos ensaios de stress térmico com células provenientes da adaptação com $1/2 \times$ CMI de resveratrol observou-se um aumento significativo na percentagem de sobrevivência ($p < 0,0001$) entre os controlos e o ensaio com o resveratrol, contudo essa diferença foi decrescendo ao longo do tempo. Verificou-se também que as percentagens de sobrevivência para os controlos e para o ensaio com resveratrol a $1/2 \times$ CMI são superiores do que a $1/4 \times$ CMI. A mesma tendência foi observada no ensaio com pH ácido (figura 5). Cada uma destas percentagens de sobrevivência, aos 40 min, foi comparada estatisticamente com o tempo 0 e constatou-se uma diminuição significativa da sobrevivência ($p < 0,0001$), salientando a elevada redução da viabilidade celular, tanto para os controlos como para o ensaio com o resveratrol.

Os tempos de redução decimal a $\frac{1}{4} \times$ CMI foram: 10,82 min para o controlo do crescimento; 10,98 min para o controlo do solvente e 14,39 min para o ensaio com resveratrol; para $\frac{1}{2} \times$ CMI ocorreu um aumento respetivamente para: 13,26 min para o CC; 12,63 min para o CS e 14,97 min para o RV, o que está de acordo com os resultados da viabilidade celular.

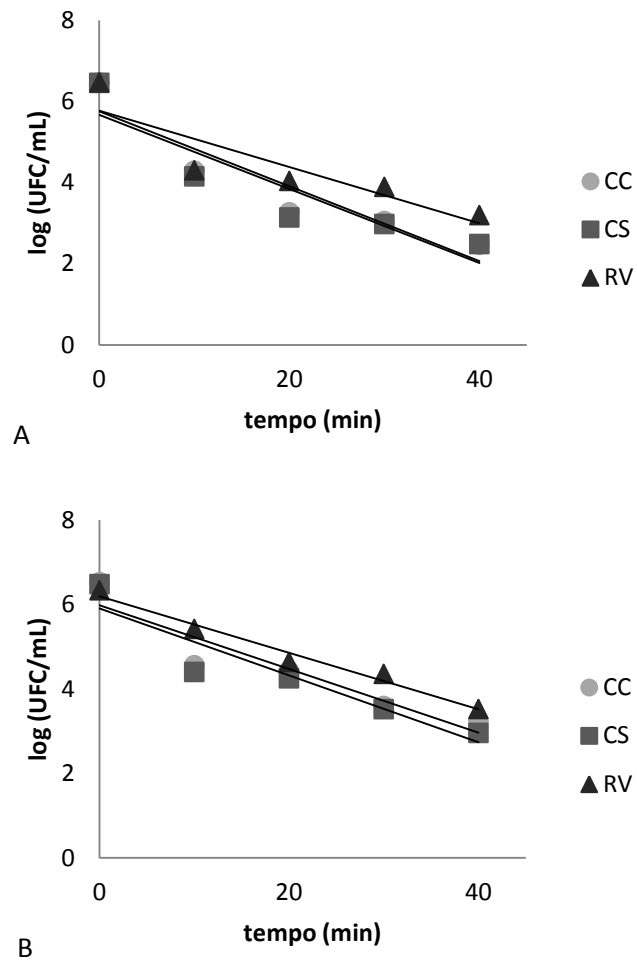
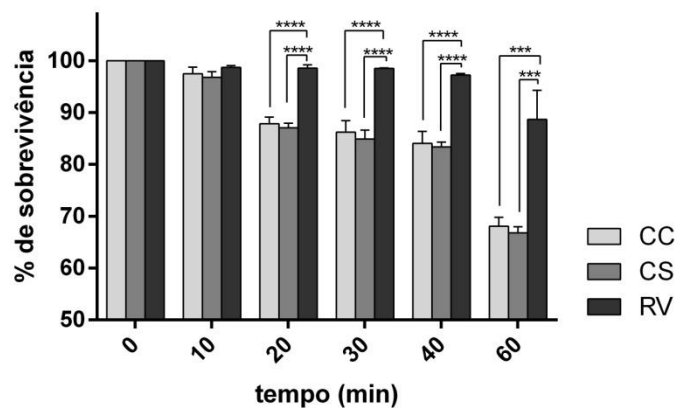
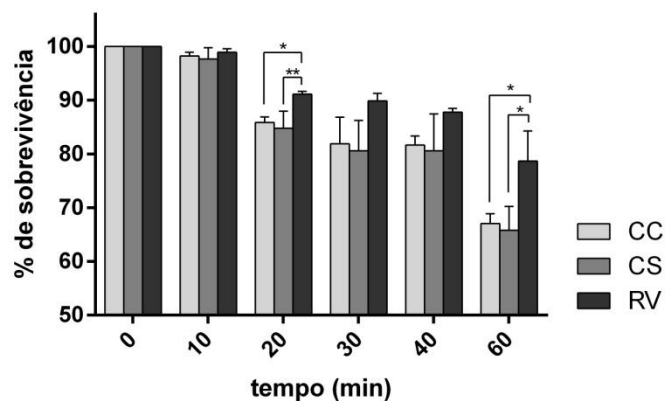


Figura 10: Curvas de sobrevivência a incubação a 55 °C para *S. aureus* após a 4ª passagem da adaptação a $\frac{1}{4} \times$ CMI(A) e $\frac{1}{2} \times$ CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controlo do crescimento (CC), controlo do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV).



A



B

Figura 11: Efeito da temperatura (55 °C) em *L. monocytogenes* após a 4^a passagem da adaptação a 1/4 x CMI (A) e a 1/2 x CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controle do crescimento (CC), controle do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV).

Analisando a figura 11 (A), observa-se um aumento significativo da percentagem de sobrevivência de *L. monocytogenes* quando sujeita a um stress térmico, aos tempos 20, 30, 40 min ($p < 0,0001$) e 60 min ($p < 0,001$) entre os ensaios realizados com células provenientes dos controlos e o ensaio de adaptação ao resveratrol, realçando que a prévia exposição de *L. monocytogenes* a uma concentração de 1/4 x CMI de resveratrol conduziu a um posterior aumento da percentagem de sobrevivência quando sujeitas ao choque térmico. Contudo, analisando a figura 11 (B) verifica-se que proteção celular induzida pela exposição a 1/2 x CMI de resveratrol não é tão evidente como para 1/4 x CMI. Para além disso, verificou-se, entre os 0 e os 120 min, uma maior redução da viabilidade celular a 1/2 x CMI (cerca de 20 %) do que a 1/4 x CMI (cerca de 10 %) no ensaio como o resveratrol.

Os tempos de redução decimal para o controlo do crescimento e do solvente, correspondentes a uma adaptação a $\frac{1}{4} \times$ CMI de resveratrol, foram 30,03 e 28,74 min respetivamente, contudo para o ensaio com resveratrol não houve uma redução decimal até aos 60 min. No entanto, a $\frac{1}{2} \times$ CMI verificou-se que aos 39,92 min no ensaio com resveratrol, 90 % da população bacteriana foi eliminada, enquanto no controlo do crescimento ocorreu aos 27,62 min e no controlo do solvente ocorreu aos 26,95 min, demonstrando um aumento do tempo necessário para ocorrer uma redução decimal após exposição prévia de *L. monocytogenes* ao resveratrol.

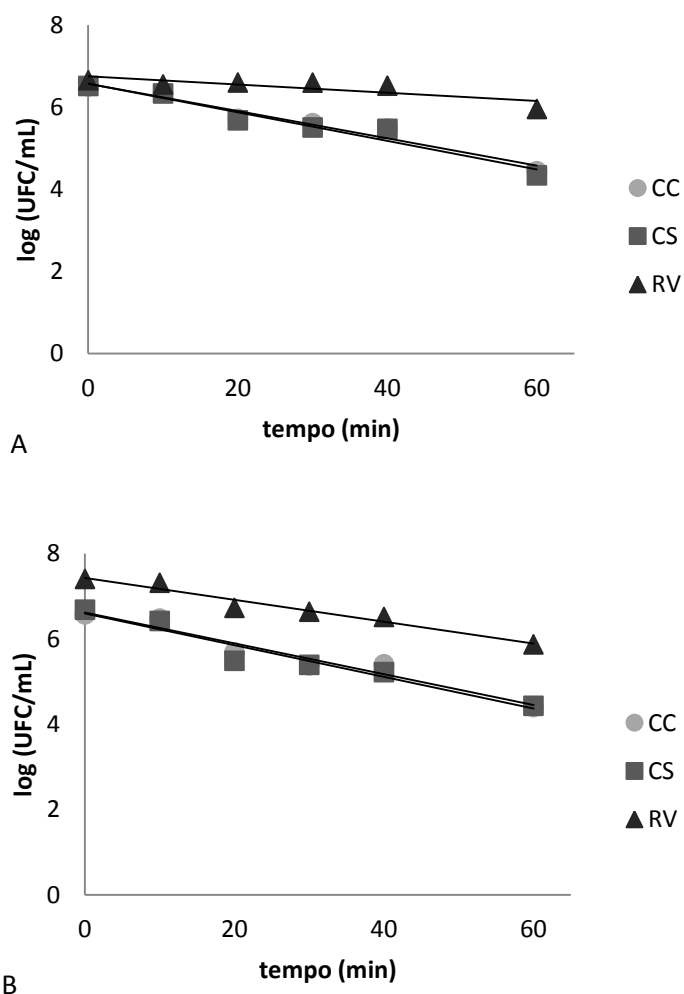


Figura 12: Curvas de sobrevivência a uma incubação a 55 °C para *L. monocytogenes* após a 4ª passagem da adaptação a $\frac{1}{4} \times$ CMI (A) e $\frac{1}{2} \times$ CMI de resveratrol (B) ao longo do tempo. Controlo do crescimento (CC), controlo do solvente (CS) e ensaio com resveratrol (RV).

No presente trabalho, a exposição de *S. aureus* a concentrações subinibitórias de resveratrol não levou a uma resistência homóloga, nem resistência cruzada a outros agentes antimicrobianos, nomeadamente a antibióticos (ampicilina, eritromicina e vancomicina) e ao desinfetante, cloreto de benzalcónio. Contudo, o resveratrol induziu uma proteção às células que foram incubadas a uma temperatura de 55 °C, tendo-se verificado que a redução da viabilidade celular foi maior nos controlos e o resveratrol proporcionou aproximadamente 50 % de sobrevivência no final do ensaio (40 min). Num estudo semelhante, Bikels-Goshen e colaboradores investigaram se a curta exposição (2 horas) de estirpes de *S. aureus* a concentrações subletais de galato de epigallocatecina, o composto maioritário do extrato de chá verde, poderia levar a adaptação e à resistência cruzada. De facto, os autores verificaram que a exposição ao agente antimicrobiano levou a uma resistência significativa a antibióticos que têm como alvo a parede celular, designadamente a ampicilina e a vancomicina. Para além disso, constataram também que as células adaptadas à epigallocatecina galato foram mais tolerantes a uma temperatura de 55 °C (Bikels-Goshen et al., 2010).

Relativamente à tolerância ao ácido, após a exposição de *S. aureus* a concentrações subinibitórias de resveratrol verificou-se que aos 30 min observou-se uma menor percentagem de sobrevivência para o ensaio realizado com células adaptadas ao resveratrol. Tais observações indicam que o resveratrol não induziu proteção cruzada ao ácido. Silva da Luz e colegas, submeteram *S. aureus* a um pH 5,2 após a exposição *overnight* a concentrações subletais de óleo essencial de orégãos e de carvacrol (composto fenólico maioritário do mesmo óleo) utilizando um meio à base de carne como substrato para o cultivo das bactérias, tendo verificado que, também neste caso, o óleo essencial de orégãos e o carvacrol não induziram proteção cruzada a pH ácido (Silva Da Luz et al., 2013). Num outro estudo, Cebrián e colegas verificaram que *S. aureus* é capaz de desenvolver resistência homóloga a pH ácido após a exposição subletal do mesmo *stress* (pH 4,5 por 2 horas) (Cebrián et al., 2010). Contudo, verificaram que a presença concomitante do antibiótico cloranfenicol, que inibe a síntese de proteínas, no meio com o ácido impediu completamente o desenvolvimento de resistência pH ácido, sendo que os investigadores sugeriram que a síntese de proteínas é necessária para o desenvolvimento duma resposta de resistência (Cebrián et al., 2010). O desenvolvimento de resistência homóloga após o choque ácido é geralmente associada à síntese de proteínas *acid shock proteins* (Cebrián et al., 2010). No presente estudo, o resveratrol poderá ter originado uma alteração metabólica nas células de *S. aureus* que não permitiu que desenvolvessem uma proteção cruzada ao stress ácido.

Quanto à *L. monocytogenes* verificou-se que a exposição a concentrações subinibitórias de resveratrol induziu uma pequena proteção ao ácido. Esta proteção não é substancialmente significativa, pois a incubação das células durante 2 horas num meio acidificado (pH 2,4) não provocou uma redução decimal nem para os controlos nem para o ensaio com o resveratrol, no entanto, observou-se uma percentagem de sobrevivência superior aos 120 min no ensaio

com resveratrol comparativamente aos controlos. Por outro lado, a proteção cruzada a temperatura elevada é mais evidente, principalmente a $\frac{1}{4} \times$ CMI. De um modo geral, verificou-se que a exposição de *L. monocytogenes* a concentrações subinibitórias de resveratrol levou a uma proteção cruzada ao stress térmico. Sendo que o desenvolvimento duma resposta de resistência cruzada entre diferentes agentes requer alterações celulares e/ou de proteínas induzidas pelo agente ao qual as células foram adaptadas (Cebrián et al., 2010), pode sugerir-se que a adaptação ao resveratrol poderá levar a alterações celulares estruturais ou de síntese proteica que terão um papel nesta diminuição de suscetibilidade.

Assim, o desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas no controlo e eliminação dos microrganismos em alimentos frescos é extremamente importante não só devido aos custos associados às doenças de origem alimentar, mas também com o intuito de aumentar o tempo de vida útil destes produtos (Duarte et al., 2015a). No entanto, quando se pretende aplicar um composto de origem natural é importante saber como é que a exposição de células bacterianas a baixas concentrações de agentes antimicrobianos naturais se comportam (Bikels-Goshen et al., 2010), tendo em conta não só o possível desenvolvimento de resistência aos mesmos compostos como também a outros compostos ou condições adversas.

O resveratrol tem sido proposto como uma potencial alternativa aos conservantes sintéticos da indústria alimentar (Duarte et al., 2015a, 2015c; Ferreira and Domingues, 2016), tornando-se por isso pertinente avaliar o seu potencial de resistência adaptativa ou cruzada. Neste trabalho, demonstrou-se que apesar de haver um ligeiro aumento da tolerância de *S. aureus* e *L. monocytogenes* ao resveratrol, de forma global não se verificou o desenvolvimento de resistências cruzadas com antibióticos ou cloreto de benzalcónio. Apesar do aumento da tolerância ao stress térmico e ácido no caso da *L. monocytogenes*, para *S. aureus* este comportamento não foi evidente.

4.2. Avaliação do potencial sinérgico entre linalool e desinfetantes

O processo de desinfecção é fundamental no controlo da disseminação dos microrganismos patogénicos, contudo a ampla utilização dos mesmos levou ao desenvolvimento de resistências bacterianas (Gerba, 2015; Machado et al., 2013), o que torna importante encontrar alternativas para colmatar a falta de agentes antimicrobianos eficazes no controlo de microrganismos resistentes. Os compostos de origem natural têm demonstrado atividade antimicrobiana e a sua combinação com desinfetantes tem sido descrita na literatura (Hendry et al., 2012, 2009; Karpanen et al., 2008). O linalool sendo o componente maioritário de alguns óleos essenciais, principalmente o de *C. sativum* e *O. basilicum* (Silva et al., 2011a; Snoussi et al., 2016), apresenta atividade sobre bactérias Gram-positivas e negativas, bem como atividade antibiofilme sobre *A. baumannii* (Alves et al., 2016; Herman et al., 2015). Desta forma, o linalool representa uma possível alternativa no controlo de bactérias patogénicas. Assim torna-se importante avaliar o potencial sinérgico entre o linalool e desinfetantes frequentemente utilizados, contra bactérias problemáticas a nível hospitalar, como *A. baumannii* e *S. aureus*. Neste trabalho, selecionaram-se desinfetantes com diferentes alvos celulares e por isso com diferentes mecanismos de ação. O mecanismo de ação do ácido peracético baseia-se na desnaturação de proteínas e disrupção da permeabilidade da parede celular (CDC, 2008). O hipoclorito de sódio por sua vez oxida enzimas, leva à perda do conteúdo intracelular das células bacterianas, diminui a captação de nutrientes e inibe a síntese de proteínas (CDC, 2008). O cloreto de benzalcónio e a clorohexidina pertencem ao grupo dos compostos catiónicos e interagem com as cargas negativas presentes nas membranas e na parede celular, danificando-as, promovendo assim a sua própria captação de modo a alcançarem o interior da célula, mas causando também uma disrupção da membrana citoplasmática levam à conseqüente perda dos componentes intracelulares (Ortega Morente et al., 2013).

Inicialmente procedeu-se à determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) para o linalool e para os desinfetantes contra *A. baumannii* e *S. aureus* (tabela 8).

Tabela 8: Concentração Mínima Inibitória (CMI) do linalool e dos desinfetantes contra *A. baumannii* e *S. aureus*.

	CMI	
	<i>A. baumannii</i>	<i>S. aureus</i>
Linalool (µL/mL)	2	8
Ácido peracético (%)	0,020	0,020
Hipoclorito de sódio (%)	0,625	1,25
Cloreto de benzalcónio (µg/mL)	16	2
Clorohexidina digluconato (%)	0,0006	0,00015

Pela análise da tabela 8, verifica-se que a CMI do linalool para *S. aureus* é superior à CMI de *A. baumannii*. Sendo um álcool, o linalool funciona como um solvente de lípidos (Kalily et al., 2016), aumentando a porosidade da membrana externa presente na bactéria e daí ser necessário uma menor concentração para inibir *A. baumannii*. Contudo, as bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, são caracterizadas pela camada densa de peptidoglicano (Ortega Morente et al., 2013), e desta forma o linalool tem maior dificuldade em exercer o seu efeito. A mesma tendência foi descrita por Budzyńska e colaboradores, tendo verificado que a CMI do linalool para *S. aureus* foi superior à CMI de *E. coli* (Budzyńska et al., 2011).

Para avaliar o potencial sinérgico entre o linalool e os desinfetantes recorreu-se ao método do *checkerboard*. O termo *checkerboard* surge a partir do padrão que é gerado pelas várias diluições dos dois agentes antimicrobianos que estão a ser estudados (Schwalbe et al., 2007). Os resultados relativos a este ensaio encontram-se na tabela 9 e nas figuras 13 (*A. baumannii*) e 14 (*S. aureus*), apresentando os índices da concentração inibitória fracionada e os respetivos efeitos do linalool em combinação com os desinfetantes.

Tabela 9: Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) do linalool em combinação com os desinfetantes e respetivos efeitos.

	<i>A. baumannii</i>		<i>S. aureus</i>	
	ICIF	Efeito	ICIF	Efeito*
Ácido peracético (%)	0,600	Aditivo	1	Aditivo
Hipoclorito de sódio (%)	0,750	Aditivo	1	Aditivo
Cloreto de benzalcónio (µg/mL)	0,500	Sinergismo	0,750	Aditivo
Clorohexidina digluconato (%)	0,500	Sinergismo	0,633	Aditivo

*Sinergismo: $ICIF \leq 0,5$; aditivo: $0,5 < ICIF \leq 1$; subtrativo: $1 < ICIF < 4$; antagonismo: $ICIF \geq 4$ (Duarte et al., 2012).

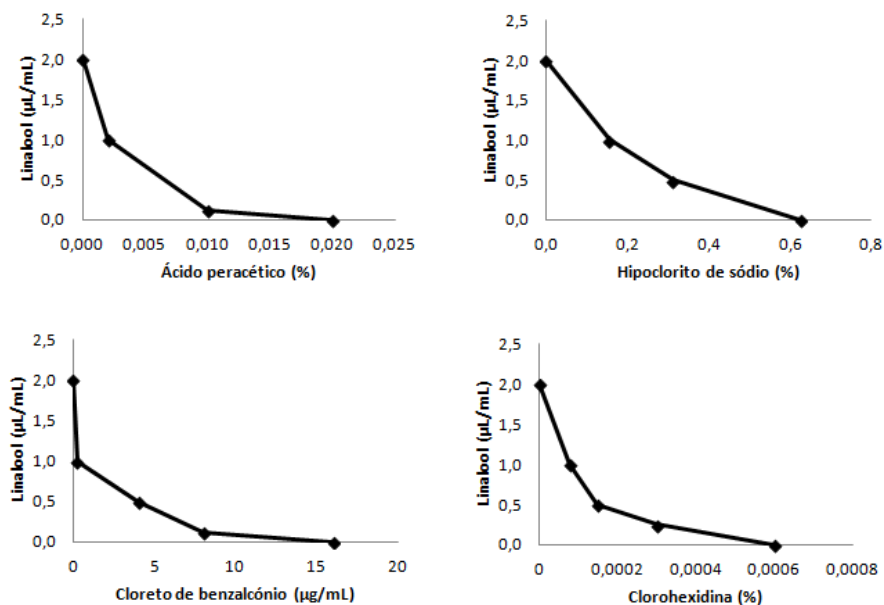


Figura 13: Curvas representativas do efeito do linalool em combinação com desinfetantes contra *A. baumannii*.

Analisando a figura 13, observam-se duas curvas direcionadas para a esquerda, evidenciando um perfil típico de sinergismo, entre o linalool e o cloreto de benzalcónio, bem como entre o linalool e a clorhexidina digluconato, sendo corroborado com os ICIF apresentados na tabela 9. Kalily e colaboradores avaliaram o mecanismo de ação do linalool sobre *Salmonella* Senftenberg e verificaram que o composto atua na disrupção da membrana externa e citoplasmática, sendo que a membrana externa tornou-se mais permeável devido à formação de pequenos poros induzida pelo linalool (Kalily et al., 2016). A disrupção das membranas leva à saída de moléculas essenciais, nomeadamente ATP, permitindo também desta forma a penetração de moléculas pequenas (Kalily et al., 2016). No presente trabalho, o efeito sinérgico entre o linalool e os dois biocidas, pode ser devido a uma ação do linalool e do biocida em diferentes alvos, podendo o linalool ter levado a uma disrupção da membrana externa e interna de *A. baumannii*, permitindo assim uma entrada facilitada do cloreto de benzalcónio e a clorhexidina digluconato para o interior da célula onde poderão oxidar proteínas. Por outro lado, sabe-se que estes biocidas são catiónicos (Ortega Morente et al., 2013), sendo que a interação com as cargas negativas das membranas externa e citoplasmática, poderá também ter facilitado o efeito do linalool. No caso do ácido peracético e do hipoclorito de sódio em combinação com o linalool não se verifica um efeito tão pronunciado, indicando que se trata apenas de um efeito aditivo.

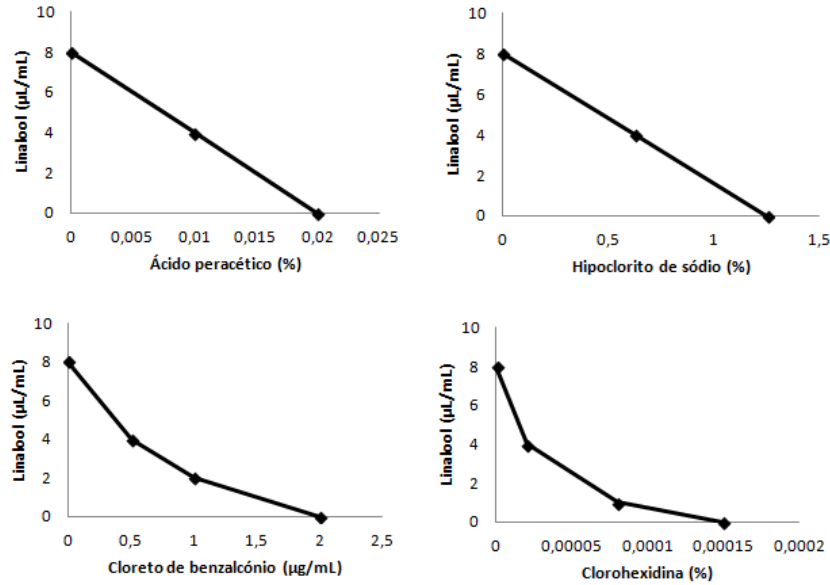


Figura 14: Curvas representativas do efeito do linalool em combinação com desinfetantes contra *S. aureus*.

No caso do *S. aureus*, não se verificou efeito sinérgico entre o linalool e nenhum dos desinfetantes em estudo. Contudo, verificou-se um efeito aditivo para todas as combinações, sendo que o cloreto de benzalcónio e a clorhexidina digluconato obtiveram os melhores ICIF (tabela 9). Tal pode ser devido à interação entre as cargas positivas dos biocidas (cloreto de benzalcónio e clorhexidina digluconato) com as cargas negativas presentes na parede celular (Ortega Morente et al., 2013), que em combinação com o linalool permitiu uma melhor disruptão da parede celular, comparativamente ao ácido peracético e ao hipoclorito de sódio.

O efeito menos pronunciado do ácido peracético e do hipoclorito de sódio, tanto para *A. baumannii* como para *S. aureus*, pode ser residir no facto destes dois desinfetantes serem agentes antimicrobianos oxidativos (Small et al., 2007), sendo o linalool um antioxidante (Herman et al., 2015), poderá ter inibido em parte a ação dos biocidas.

Até ao momento, ainda não tinham sido descritos estudos de interação sinérgica entre o linalool e desinfetantes, representando este trabalho uma primeira abordagem ao estudo dessa interação. Apenas está descrito um trabalho de Bag e Chattopadhyay que avaliou as possíveis interações sinérgicas entre óleos essenciais de especiarias e constataram que o linalool, principal constituinte do óleo essencial de coentros, foi o responsável pelo efeito sinérgico com o óleo essencial de cominhos em diversas bactérias, nomeadamente *S. aureus* (Bag and Chattopadhyay, 2015).

As interações sinérgicas observadas no presente trabalho entre o linalool e desinfetantes, e até mesmo as aditivas, aumentam a eficácia antibacteriana dos desinfetantes estudados (cloreto de benzalcônio, clorhexidina digluconato, ácido peracético e hipoclorito de sódio) pela diminuição das CMI dos dois agentes antimicrobianos. Assim, o linalool apresenta potencial em futuras combinações com desinfetantes.

Capítulo 5 - Conclusões

O presente trabalho permitiu um melhor entendimento da influência dos compostos de origem natural, resveratrol e linalool, sobre bactérias de origem alimentar e clínica, fornecendo desta forma informações mais detalhadas para possíveis aplicações futuras destes compostos.

Foi avaliada a atividade antibacteriana do resveratrol sobre bactérias problemáticas na área alimentar, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e verificou-se que a CMI obtida (200 µg/mL) foi igual para as duas estirpes, enquanto a CMB foi maior que 400 µg/mL não sendo passível de determinação devido à baixa solubilidade do composto. A adaptação das estirpes a concentrações subinibitórias e inibitórias de resveratrol foi também avaliada, tendo-se verificado que ambas as estirpes sobreviveram até 1 × CMI. Estudou-se ainda a influência da exposição das estirpes a concentrações subinibitórias de resveratrol no desenvolvimento de resistência homóloga e cruzada a antibióticos (ampicilina, eritromicina e vancomicina), habitualmente utilizados para tratar infeções causadas pelos mesmos microrganismos, e a um desinfetante (cloreto de benzalcónio) frequentemente utilizado na indústria alimentar. Os resultados mostraram que não houve um desenvolvimento de resistência homóloga nem cruzada, exceto para o cloreto de benzalcónio em *L. monocytogenes*. O resveratrol, sendo um agente antioxidante, poderá ter protegido a bactéria do stress oxidativo induzido pelo cloreto de benzalcónio. Por fim, foi avaliado se baixas concentrações de resveratrol poderiam induzir proteção celular em condições adversas, nomeadamente baixo pH e temperatura elevada, verificando-se que apesar do aumento da tolerância ao stress térmico e ácido no caso da *L. monocytogenes*, para *S. aureus* este comportamento não foi evidente.

No presente trabalho, foi também avaliada a atividade antibacteriana do linalool, bem como de desinfetantes comumente utilizados na prática clínica, ácido peracético, hipoclorito de sódio, cloreto de benzalcónio e clorohexidina digluconato contra estirpes problemáticas no mesmo sector, *A. baumannii* e *S. aureus*. A CMI do linalool para *A. baumannii* foi menor (2 µL/mL) do que para *S. aureus* (8 µL/mL), podendo este resultado ser justificado pelas características do linalool e as diferenças nas paredes celulares entre as duas bactérias. Dada a elevada percentagem de lípidos na membrana externa de *A. baumannii*, o linalool poderá atuar como solvente aumentando a permeabilidade da mesma. Foi também estudado o possível sinergismo entre o linalool e os desinfetantes, observando-se um efeito sinérgico entre o linalool em combinação com o cloreto de benzalcónio ou a clorohexidina digluconato em *A. baumannii*, e efeito aditivo nas restantes combinações. As interações sinérgicas podem ser justificadas pela interação entre as cargas positivas, associadas ao cloreto de benzalcónio e à clorohexidina digluconato, e as cargas negativas presentes na membrana externa de *A.*

baumannii, que em combinação com o linalool permitem uma melhor disrupção da membrana. As interações aditivas entre o linalool e o ácido peracético ou hipoclorito de sódio, em *A. baumannii* e *S. aureus* podem ser explicadas pelo facto da atividade antioxidante do linalool poder inibir o efeito oxidativo destes biocidas, assim inibindo parcialmente a ação dos mesmos.

Capítulo 6 - Perspetivas futuras

Considerando o estudo de adaptação de *S. aureus* e *L. monocytogenes* ao resveratrol, tal como o potencial desenvolvimento de resistências homóloga ou cruzadas, de forma a aprofundar o conhecimento, em estudos futuros será importante:

- Avaliar o efeito da adaptação ao resveratrol na virulência das bactérias *S. aureus* e *L. monocytogenes*;
- Avaliar a estabilidade da adaptação ao resveratrol e aumento de tolerância a condições de stress;
- Determinar a influência da adaptação ao resveratrol na atividade das bombas de efluxo;
- Avaliar possíveis alterações celulares por microscopia eletrónica de transmissão.

Relativamente à potencial adição de linalool a desinfetantes convencionais, como forma de melhorar a sua ação sobre bactérias patogénica de elevada importância no sector hospitalar, será importante em estudos futuros:

- Validar a eficácia da combinação entre linalool e desinfetantes segundo as normas europeias para avaliar a sua potencial aplicabilidade;
- Analisar a influência da presença de matéria orgânica na atividade antimicrobiana das combinações;
- Avaliar a atividade antibiofilme das mesmas combinações na formação de biofilmes e em biofilmes pré-estabelecidos de *S. aureus* e *A. baumannii* em diferentes superfícies de relevância na prática clínica.

Bibliografia

- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., Rorvik, L.M., 2000. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 57-63.
- Adam, M., Murali, B., Glenn, N.O., Potter, S.S., 2008. Epigenetic inheritance based evolution of antibiotic resistance in bacteria. *BMC Evol. Biol.* 8, 52.
- Allen, K.J., Watecka-Zacharska, E., Chen, J.C., Katarzyna, K.P., Devlieghere, F., Van Meervenue, E., Osek, J., Wiczorek, K., Bania, J., 2016. *Listeria monocytogenes* - An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. *Food Microbiol.* 54, 178-189.
- Alves, S., Duarte, A., Sousa, S., Domingues, F.C., 2016. Study of the major essential oil compounds of *Coriandrum sativum* against *Acinetobacter baumannii* and the effect of linalool on adhesion, biofilms and quorum sensing. *Biofouling* 32, 155-165.
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2012. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resist. Updat.* 15, 162-172.
- Apolónio, J., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Neto, L., 2014. No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. *FEMS Microbiol. Lett.* 354, 92-101.
- Bag, A., Chattopadhyay, R.R., 2015. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. *PLoS One* 10, e0131321.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446-475.
- Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., Dicko, M.H., 2010. Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination. *Molecules* 15, 7825-7839.
- Beggs, C.B., 2006. *Acinetobacter* spp. and the Clinical Environment. *Indoor Built Environ.* 15, 19-24.
- Bellio, A., Astegiano, S., Traversa, A., Bianchi, D., 2016. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in sliced, vacuum-packaged raw milk cheese stored at two different temperatures and time periods. *Int. Dairy* 57, 15-19.
- 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.
- Brittes, J., Lúcio, M., Nunes, C., Lima, J.L.F.C., Reis, S., 2010. Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: Relevance for its pharmacological effects. *Chem. Phys. Lipids* 163, 747-754.
- Buckingham-Meyer, K., Goeres, D.M., Hamilton, M.A., 2007. Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. *J. Microbiol. Methods* 70, 236-244.
- Budzyńska, A., Wieckowska-Szakiel, M., Sadowska, B., Kalemba, D., Różalska, B., 2011. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol. J. Microbiol.* 60, 35-41.

- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O’Bryan, C.A., Ricke, S.C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control* 54, 111-119.
- Campos, C., Castro, M., Gliemmo, M., Schelegueda, L., 2011. Use of natural antimicrobials for the control of *Listeria monocytogenes* in foods. Méndez-Vilas A., *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* (1112-1123) Formatex.
- Centers for Disease Control (CDC), 2008. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities.
- 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.
- Cerf, O., Carpentier, B., Sanders, P., 2010. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: “Resistance” has different meanings. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 247-254.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9.
- Coelho, J.R., Carriço, J.A., Knight, D., Martínez, J.L., Morrissey, I., Oggioni, M.R., Freitas, A.T., 2013. The Use of Machine Learning Methodologies to Analyse Antibiotic and Biocide Susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 8, e55582.
- D’Auria, F.D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvatore, G., Battinelli, L., Mazzanti, G., 2005. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Med. Mycol.* 43, 391-396.
- Da Silva, E.P., De Martinis, E.C.P., 2013. Current knowledge and perspectives on biofilm formation: The case of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 957-968.
- DeLeo, F.R., Otto, M., Kreiswirth, B.N., Chambers, H.F., 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375, 1557-1568.
- den Bakker, H.C., Warchocki, S., Wright, E.M., Allred, A.F., Ahlstrom, C., Manuel, C.S., Stasiewicz, M.J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L.K., Fortes, E., Nightingale, K.K., Kephart, D., Wiedmann, M., 2014. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1882-1889.
- Denny, J., McLauchlin, J., 2008. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe - an opportunity for improved European surveillance. *Euro Surveill.* 13, 1-5.
- Direção Geral da Saúde, 2016. Portugal - Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em números - 2015. Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos.
- Dhiman, R., Aggarwal, N., Aneja, K.R., Kaur, M., 2016. *In Vitro* Antimicrobial Activity of Spices and Medicinal Herbs against Selected Microbes Associated with Juices. *Int. J. Food Microbiol.* 2016.
- Donovan, S., 2015. Listeriosis: A Rare but Deadly Disease. *Clin. Microbiol. Newsl.* 37, 135-140.
- Duarte, A., Alves, A.C., Ferreira, S., Silva, F., Domingues, F.C., 2015a. Resveratrol inclusion

- complexes: Antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. *Food Res. Int.* 77, 244-250.
- Duarte, A., Ferreira, S., Silva, F., Domingues, F.C., 2012. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine* 19, 236-238.
- Duarte, A., Luís, Â., Oleastro, M., Domingues, F.C., 2015b. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control* 61, 115-122.
- Duarte, A., Martinho, A., Luís, Â., Figueiras, A., Oleastro, M., Domingues, F.C., Silva, F., 2015c. Resveratrol encapsulation with methyl- β -cyclodextrin for antibacterial and antioxidant delivery applications. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 1254-1260.
- European Centre for Disease Prevention and Control, 2015. Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. Stockholm: ECDC.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015;13:4329, 191 pp.
- EMA (European Medicines Agency), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2009. The bacterial challenge: time to react. Technical Report. Stockholm.
- Espinal, P., Martí, S., Vila, J., 2012. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Hosp. Infect.* 80, 56-60.
- Faleiro M.L., 2011. The mode of antibacterial action of essential oils. Méndez-Vilas A., *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. (1143-1156) Formatex.
- Fernández, L., Breidenstein, E.B.M., Hancock, R.E.W., 2011. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist. Updat.* 14, 1-21.
- Fernández, L., Hancock, R.E.W., 2012. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 661-81.
- Fernández-Mar, M.I., Mateos, R., García-Parrilla, M.C., Puertas, B., Cantos-Villar, E., 2012. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem.* 130, 797-813.
- Ferreira, S., Domingues, F., 2016. The antimicrobial action of resveratrol against *Listeria monocytogenes* in food-based models and its antibiofilm properties. *J. Sci. Food Agric. in press*
- Ferreira, S., Silva, F., Queiroz, J.A., Oleastro, M., Domingues, F.C., 2014. Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: Activity and effect on cellular functions. *Int. J. Food Microbiol.* 180, 62-68.
- Fick, J., Soderstrom, H., Lindberg, R.H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, J.D.G., 2009. Contamination of Surface, Ground, and Drinking Water From Pharmaceutical Production. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2522-2527.
- Fox, E.M., Leonard, N., Jordan, K., 2011. Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6559-6569.
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K.M., Gomez-Cabrera, M.C., Vina, J., Borrás, C., 2015. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015.

- Gerba, C.P., 2015. Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 464-469.
- Gustafson, J.E., Muthaiyan, A., Dupre, J.M., Ricke, S.C., 2014. *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review. *Food Control.* *in press.*
- Hendry, E., Conway, B., Worthington, T., 2012. Antimicrobial efficacy of a novel eucalyptus oil, chlorhexidine digluconate and isopropyl alcohol biocide formulation. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 14016-14025.
- Hendry, E.R., Worthington, T., Conway, B.R., Lambert, P.A., 2009. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 1219-1225.
- Herman, A., Tambor, K., Herman, A., 2015. Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. *Curr. Microbiol.* 72, 165-172.
- Inchai, J., Liwsrisakun, C., Theerakittikul, T., Chaiwarith, R., Khositsakulchai, W., Pothirat, C., 2015. Risk factors of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia in a Medical Intensive Care Unit of University Hospital in Thailand. *J. Infect. Chemother.* 21, 570-574.
- Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A.M., Heritage, J., Hawkey, P.M., 1998. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1938-1941.
- Jiménez, J.B., Orea, J.M., Montero, C., González Ureña, Á., Navas, E., Slowing, K., Gómez-Serranillos, M.P., Carretero, E., De Martinis, D., 2005. Resveratrol treatment controls microbial flora, prolongs shelf life, and preserves nutritional quality of fruit. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1526-1530.
- Kadariya, J., Smith, T.C., Thapaliya, D., 2014. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *Biomed Res. Int.* 2014.
- Kalily, E., Hollander, A., Korin, B., Cymerman, I., Yaron, S., 2016. Mechanisms of resistance to linalool in *Salmonella* Senftenberg and their role in survival on basil. *Environ. Microbiol.* *in press.*
- Karpanen, T.J., Worthington, T., Hendry, E.R., Conway, B.R., Lambert, P.A., 2008. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 1031-1036.
- Kawamura-Sato, K., Wachino, J.I., Kondo, T., Ito, H., Arakawa, Y., 2008. Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter* species in the presence of organic material. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 568-576.
- Kiedrowski, M.R., Horswill, A.R., 2011. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1241, 104-121.
- Knudsen, G.M., Ng, Y., Gram, L., 2013. Survival of bactericidal antibiotic treatment by a persister subpopulation of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7390-7397.
- Kohanski, M.A., DePristo, M.A., Collins, J.J., 2010. Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. *Mol. Cell* 37, 311-320.
- Kong, C., Neoh, H., Nathan, S., 2016. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins.* 8, 72.

- Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegård, B., Söderström, H., Joakim Larsson, D.G., 2011. Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS One* 6, e17038.
- Kumari, H., Balasubramanian, D., Zincke, D., Mathee, K., 2014. Role of *Pseudomonas aeruginosa* AmpR on β -lactam and non- β -lactam transient cross-resistance upon pre-exposure to subinhibitory concentrations of antibiotics. *J. Med. Microbiol.* 63, 544-555.
- Langsrud, S., Sundheim, G., Holck, A.L., 2004. Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. *J. Appl. Microbiol.* 96, 201-208.
- Lee, J., Lee, D.G., 2014. Novel antifungal mechanism of resveratrol: Apoptosis inducer in *Candida albicans*. *Curr. Microbiol.* 70, 383-389.
- Letizia, C.S., Cocchiara, J., Lalko, J., Api, A.M., 2003. Fragrance material review on linalool. *Food Chem. Toxicol.* 41, 943-964.
- Littmann, J., Viens, A., 2015. The Ethical Significance of Antimicrobial Resistance. *Public Health Ethics* 8, 209-224.
- Liu, W.L., Liang, H.W., Lee, M.F., Lin, H.L., Lin, Y.H., Chen, C.C., Chang, P.C., Lai, C.C., Chuang, Y.C., Tang, H.J., 2014. The impact of inadequate terminal disinfection on an outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *PLoS One* 9, e107975.
- Liu, Y., Zhou, J., Qu, Y., Yang, X., Shi, G., Wang, X., Hong, Y., Drlica, K., Zhao, X., 2016. Resveratrol Antagonizes Antimicrobial Lethality and Stimulates Recovery of Bacterial Mutants. *PLoS One* 11, e0153023.
- Lubbe, A., Verpoorte, R., 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Ind. Crops Prod.* 34, 785-801.
- Luis, Â., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F., Duarte, A.P., 2016. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Ind. Crops Prod.* 79, 274-282.
- Lundén, J., Tolvanen, R., Korkeala, H., 2008. Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 276-280.
- Luz, I. da S., Neto, N.J.G., Tavares, A.G., Magnani, M., de Souza, E.L., 2012. Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. *Food Res. Int.* 48, 667-672.
- Machado, I., Coquet, L., Jouenne, T., Pereira, M.O., 2013. Proteomic approach to *Pseudomonas aeruginosa* adaptive resistance to benzalkonium chloride. *J. Proteomics* 89, 273-279.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P., 2012. *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. San Francisco: Pearson Education, Inc.
- Magalhães, R., Ferreira, V., Brandão, T.R.S., Palencia, R.C., Almeida, G., Teixeira, P., 2016. Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: a focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. *Food Microbiol.* 57, 103-108.
- Marques, J. de L., Volcão, L.M., Funck, G.D., Kroning, I.S., da Silva, W.P., Fiorentini, Â.M., Ribeiro, G.A., 2015. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. *Ind.*

- Crops Prod. 77, 444-450.
- Martini, S., Bonechi, C., Rossi, C., Figura, N., 2011. Increased Susceptibility to Resveratrol of *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Patients with Gastric Carcinoma. J. Nat. Prod. 74, 2257-2260.
- Mazzola, P.G., Penna, T.C.V., Martins, A.M. da S., 2003. Determination of decimal reduction time (D value) of chemical agents used in hospitals for disinfection purposes. BMC Infect. Dis. 3, 24.
- Meek, R.W., Vyas, H., Piddock, L.J.V., 2015. Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use? PLoS Biol. 13, e1002266.
- Mehta, P., Shah, R., Lohidasan, S., Mahadik, K.R., 2015. Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants—A comprehensive review. J. Tradit. Complement. Med. 5, 207-227.
- Motta, S.S., Cluzel, P., Aldana, M., 2015. Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. PLoS One 10, e0118464.
- Mukherji, R., Prabhune, A., 2014. Novel glycolipids synthesized using plant essential oils and their application in quorum sensing inhibition and as Antibiofilm agents. Sci. World J. 2014.
- Muñoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Segura, J., 2007. Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. Biochem. Syst. Ecol. 35, 479-488.
- Nawrocki, E.M., Bedell, H.W., Humphreys, T.L., 2013. Resveratrol is cidal to both classes of *Haemophilus ducreyi*. Int. J. Antimicrob. Agents 41, 477-479.
- Nwugo, C.C., Arivett, B.A., Zimble, D.L., Gaddy, J.A., Richards, A.M., Actis, L.A., 2012. Effect of Ethanol on Differential Protein Production and Expression of Potential Virulence Functions in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. PLoS One 7, e51936.
- Oggioni, M.R., Furi, L., Coelho, J.R., Maillard, J.-Y., Martínez, J.L., 2013. Recent advances in the potential interconnection between antimicrobial resistance to biocides and antibiotics. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 11, 363-366.
- Ortega Morente, E., Fernández-Fuentes, M.A., Grande Burgos, M.J., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., 2013. Biocide tolerance in bacteria. Int. J. Food Microbiol. 162, 13-25.
- Paphitou, N.I., 2013. Antimicrobial resistance: Action to combat the rising microbial challenges. Int. J. Antimicrob. Agents 42, 25-28.
- Paulo, L., Ferreira, S., Gallardo, E., Queiroz, J.A., Domingues, F., 2010. Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol. 26, 1533-1538.
- Paulo, L., Oleastro, M., Gallardo, E., Quiroz, J.A., Domingues, F., 2011. Antimicrobial properties of resveratrol: a review. Méndez-Vilas A., *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. (1225-1235) Formatex.
- Payeras-Cifre, A., Hernandez-Milian, A., 2014. What Is New in Listeriosis? Biomed Res. Int. 2014.
- Peana, a T., D'Aquila, P.S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., Moretti, M.D.L., 2002. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. Phytomedicine 9, 721-726.

- Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L., 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 21, 538-582.
- Pesavento, G., Calónico, C., Bilia, A.R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Di Martino, M.C., Lo Nostro, A., 2015. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. Food Control 54, 188-199.
- Rayner, C., Munckhof, W.J., 2005. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. Intern Med J 35, 3-16.
- Ribeiro de Souza da Cunha, M.L., Ustulin, D.R., 2011. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. Méndez-Vilas A., *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. (714-721) Formatex.
- Richards, J.J., Melander, C., 2009. Controlling bacterial biofilms. ChemBioChem 10, 2287-2294.
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay, D., Gyssens, I., Heure, O.E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liébana, E., López-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodríguez-Baño, J., Rolain, J.M., Segovia, C., Sigauque, B., Taconelli, E., Wellington, E., Vila, J., 2015. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. New Microbes New Infect. 6, 22-29.
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Blázquez, J., 2013. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. Int. J. Med. Microbiol. 303, 293-297.
- Romanova, N. A., Wolffs, P.F.G., Brovko, L.Y., Griffiths, M.W., 2006. Role of Efflux Pumps in Adaptation and Resistance of *Listeria monocytogenes* to Benzalkonium Chloride. Appl. Environ. Microbiol. 72, 3498-3503.
- Russell, A.D., 2003. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. The Lancet. 3, 794-803.
- Sandoval-Motta, S., Aldana, M., 2016. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. 8, 253-267.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., C. Goodwin, A., 2007. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. New York: Taylor & Francis Group.
- Silva Da Luz, I., Gomes Neto, N.J., Tavares, A.G., Nunes, P.C., Magnani, M., De 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.
- Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendona, D.I., Domingues, F.C., 2011a. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. Phytomedicine 19, 42-47.
- Silva, F., Ferreira, S., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2011b. Coriander (*Coriandrum sativum*) essential oil: Its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. J. Med. Microbiol. 60, 1479-1486.
- Small, D.A., Chang, W., Toghrol, F., Bentley, W.E., 2007. Comparative global transcription analysis of sodium hypochlorite, peracetic acid, and hydrogen peroxide on *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 1093-1105.
- Snoussi, M., Dehmani, A., Noumi, E., Flamini, G., Papetti, A., 2016. Chemical composition and antibiofilm activity of *Petroselinum crispum* and *Ocimum basilicum* essential oils against *Vibrio* spp. strains. Microb. Pathog. 90, 13-21.

- Sultanbawa, Y., 2011. Plant antimicrobials in food applications: Minireview. Méndez-Vilas A., *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. (1084-1093). Formatex.
- Tamburro, M., Ripabelli, G., Vitullo, M., Dallman, T.J., Pontello, M., Amar, C.F.L., Sammarco, M.L., 2015. Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 40, 31-39.
- To, M.S., Favrin, S., Romanova, N., Griffiths, M.W., 2002. Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5258-5264.
- Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelman, R.E., Actis, L.A., 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 149, 3473-3484.
- Tsai, T.Y., Chen, T.C., Wang, I.J., Yeh, C.Y., Su, M.J., Chen, R.H., Tsai, T.H., Hu, F.R., 2015. The effect of resveratrol on protecting corneal epithelial cells from cytotoxicity caused by moxifloxacin and benzalkonium chloride. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 1575-1584.
- Udekwi, K.I., Parrish, N., Ankomah, P., Baquero, F., Levin, B.R., 2009. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 745-757.
- Viegas, S.J., 2010. Alterações do Estado de Saúde Associadas à Alimentação - Contaminação Microbiológica de Alimentos. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge - Insa.
- von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H.M., Wolfs, P.F.G., 2016. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front. Microbiol.* 7, 1-10.
- Wallinga, D., Rayner, G., Lang, T., 2015. Antimicrobial resistance and biological governance: explanations for policy failure. *Public Health* 129, 1314-1325.
- World Health Organization (WHO), 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J., 2008. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. 7th ed. New York: The McGraw-Hill Companies.
- Wisplinghoff, H., Schmitt, R., Wöhrmann, A., Stefanik, D., Seifert, H., 2007. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Hosp. Infect.* 66, 174-181.
- Yuen, J.W.M., Chung, T.W.K., Loke, A.Y., 2015. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) contamination in bedside surfaces of a hospital ward and the potential effectiveness of enhanced disinfection with an antimicrobial polymer surfactant. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 3026-3041.