

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Staphylococcus aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar no Rio Grande do Sul e atividade antimicrobiana e de redução de biofilme de óleos essenciais de *Piper elongatum* (Vahl.) e *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling

Lisseth Pamela Peralta-Canchis

Pelotas, 2021

Lisseth Pamela Peralta-Canchis

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Staphylococcus aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar no Rio Grande do Sul e atividade antimicrobiana e de redução de biofilme de óleos essenciais de *Piper elongatum* (Vahl.) e *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Biotecnologia agroindustrial: Segurança alimentar e impacto ambiental)

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Coorientadoras: Dra. Isabela Schneid Kroning

Dra. Graciela Volz Lopes

Pelotas, 2021

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

P111c Peralta-Canchis, Lisseth Pamela

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Staphylococcus aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar no Rio Grande do Sul e atividade antimicrobiana e de redução de biofilme de óleos essenciais de *Piper elongatum* (Vahl.) e *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling / Lisseth Pamela Peralta-Canchis. – 106f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2021. – Orientador Wladimir Padilha da Silva ; coorientadoras Isabela Schneid Kroning, Graciela Volz Lopes.

1.Aço inoxidável. 2.Matico. 3.Microscopia confocal de varredura a lase. 4.Muña. 5.Resistência bacteriana. I.Silva, Wladimir Padilha da. II.Kroning, Isabela Schneid. III.Lopes, Graciela Volz. IV.Título.

CDD: 616.07581

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini (Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial)

Dra. Darla Silveira Volcan Maia (Instituto Federal Farroupilha)

Dra. Isabela Schneid Kroning (Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial)

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial)

Para aqueles que me inspiram, confiam em mim e me ajudam a ser quem sou
Dedico.

Agradecimentos

A Deus e a Mamay Carmen, porque seus tempos sempre são perfeitos, por me proteger e ser minha luz sempre.

A minha mamãe Ali e Edu, meus anjinhos no céu, tenho certeza que estão me olhando lá de cima com orgulho.

Aos meus pais Thelma e Leonardo, meu avô Guillermo, minha irmã Karen e minha tia Su, minha bela família, que são minha força e meu exemplo de vida e mesmo de longe estão sempre torcendo por mim e nunca deixam de acreditar em meus sonhos.

Ao meu amor Joao, pelo constante incentivo e compreensão nos momentos difíceis, pelo simples fato de existir e compartilhar a vida comigo.

Ao meu orientador, professor Wladimir Padilha, pela confiança em mim e o meu trabalho desde o primeiro dia que cheguei na universidade, obrigada pela paciência e compartilhar comigo seus conhecimentos e sabedoria.

À professora Thais Larré, pela disposição e ajuda.

A minha coorientadora e amiga Isabela Kroning, pela paciência infinita, suas palavras em momentos difíceis e por compartilhar comigo esta experiência tão linda.

As minhas queridas Itiane e Leticia por compartilhar comigo dias inteiros trabalhando com os óleos e biofilmes, por aqueles papos descontraídos e tornarem meus dias mais leves.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela ajuda e o carinho, aprendi muito de cada um de vocês e terão um lugar no meu coração sempre.

A todas as pessoas que fizeram parte de minha caminhada no Brasil e me ajudaram a me sentir em casa, por suas palavras de motivação e sincero afeto.

Aos membros da banca Dra. Ângela Fiorentini, Dra. Darla Maia, Dra. Isabela Kroning por suas valiosas sugestões.

À OEA e ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Gratidão infinita!

A ciência será sempre uma busca, nunca uma descoberta real. É uma viagem, nunca uma chegada.

Karl Raiumd Popper

Resumo

PERALTA-CANCHIS, Lisseth Pamela. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Staphylococcus aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar no Rio Grande do Sul e atividade antimicrobiana e de redução de biofilme de óleos essenciais de *Piper elongatum* (Vahl.) e *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling** 2021. 106f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Staphylococcus aureus é o patógeno responsável pela intoxicação alimentar estafilocócica. Esse micro-organismo pode apresentar resistência a antimicrobianos e sanitizantes e formar biofilmes. Objetivou-se determinar os tipos *spa*, os grupos agr, detectar a presença dos genes do *cluster egc* e avaliar a resistência fenotípica e genotípica de 13 isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar. Além disso, verificar sua capacidade de formar biofilme em superfície de aço inoxidável e avaliar a atividade antimicrobiana e de redução de biofilme de óleos essenciais (OE) de *Minthostachys setosa* (Briq.) e de *Piper elongatum* (Vahl.). Dez tipos *spa* foram identificados utilizando a técnica de tipificação do gene *spa*. Os grupos agr e os genes do *cluster egc* foram detectados por PCR, sendo os grupos agr III e agr II os mais prevalentes (30,76% e 7,69%, respectivamente). O 23,07% dos isolados carregavam os genes *seln* e *sei* e apenas um isolado portava o *cluster egc*. A suscetibilidade a antimicrobianos determinou que todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. A técnica de microdiluição em caldo, demonstrou a tolerância dos treze isolados ao cloreto de benzalcônio (4 a 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a clorexidina (4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Nove genes de resistência a antimicrobianos (*blaZ*, *ereB*, *ermB*, *ermC*, *sul2*, *tetM*, *tetA*, *tetB*, *tetK*), bem como genes codificadores de bombas de efluxo (*mepA*, *norA*, *norB* e *smr*) foram detectados por PCR. Todos os isolados formaram biofilme sobre aço inoxidável a 25 e 37 °C. A cromatografia gasosa/espectrometria de massas identificou a pulegona (57,54%) e o cariofileno (7,29%) como os compostos mais abundantes do OE de *M. setosa*, enquanto eucaliptol (10,84%), metil-eugenol (9,29%), β -ocimeno (8,31%) e espatulenol (7,22%), foram os compostos majoritários do OE de *P. elongatum*. A concentração inibitória mínima (CIM) de ambos OE contra *S. aureus* foi 12,5% e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi 50%. O biofilme pré-formado sobre aço inoxidável de dois isolados selecionados de *S. aureus* foi exposto por 15 min a três concentrações (6,25%, 12,5% e 25%) de cada OE, e verificou-se que houve redução na contagem de células viáveis de até 2,52 UFC.log cm⁻² na maior concentração avaliada. Pela Microscopia Confocal de Varredura a Laser se observou que os dos dois OE avaliados apresentaram atividade na remoção de biofilme e que à medida que a concentração do óleo aumentava, a remoção do biofilme foi mais significativa. Conclui-se que os isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica no Rio Grande do Sul apresentam resistência a antimicrobianos e tolerância a sanitizantes e têm capacidade de formar biofilme em aço inoxidável. Os grupos agr prevalentes (agr II e III) são os que regulam a resistência a antimicrobianos e a formação de biofilme nessa espécie bacteriana. Verificou-se também que os OE avaliados têm capacidade antimicrobiana e reduzem o número de células viáveis em biofilme pré-formado de *S. aureus* nas concentrações e tempos avaliados.

Palavras-chave: Aço inoxidável, Matico, Microscopia Confocal de Varredura a Laser, Muña, Resistência bacteriana.

Abstract

PERALTA-CANCHIS, Lisseth Pamela. **Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolates involved in food poisoning outbreaks in Rio Grande do Sul and antimicrobial and biofilm reduction activity of essential oils from *Piper elongatum* (Vahl.) and *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling.** 2021. 106f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Staphylococcus aureus cause staphylococcal food poisoning, this microorganism can be resistant to antimicrobial, sanitizers and form biofilms. We aimed to determine *spa* types, agr groups, detect the presence of *egc cluster* genes, and evaluate the phenotypic and genotypic resistance of 13 *S. aureus* isolates involved in food poisoning outbreaks. In addition, verify their ability to form biofilm on stainless steel surface and evaluate the antimicrobial and biofilm reduction activity of essential oils (EO) from *Minthostachys setosa* (Briq.) and *Piper elongatum* (Vahl.). Ten *spa* types were identified using the *spa* typing technique. The agr groups and *egc cluster* genes were detected by PCR, agr III and agr II were the most prevalent (30.76% and 7.69%, respectively). The 23.07% of isolates carried the *selN* and *sei* genes and only one isolate carried the *cluster egc*. Antimicrobial susceptibility determined that all isolates showed resistance to at least one antimicrobial. The broth microdilution technique demonstrated tolerance of the thirteen isolates to benzalkonium chloride (4 to 8 µg.mL⁻¹) and chlorhexidine (4 µg.mL⁻¹). Nine antimicrobial resistance genes (*blaZ*, *ereB*, *ermB*, *ermC*, *sul2*, *tetM*, *tetA*, *tetB*, *tetK*) as well as genes encoding efflux pumps (*mepA*, *norA*, *norB* and *smr*) were detected by PCR. All isolates formed biofilm on stainless steel at 25 and 37 °C. Gas chromatography/mass spectrometry identified pulegone (57.54%) and caryophyllene (7.29%) as the most abundant compounds in the EO of *M. setosa*, while eucalyptol (10.84%), methyl-eugenol (9.29%), β-ocimene (8.31%), and spatulenol (7.22%), were the majority compounds in the EO of *P. elongatum*. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of both EOs against *S. aureus* was 12.5% and 50%, respectively. The pre-formed biofilm on stainless steel of two selected isolates of *S. aureus* was exposed for 15 min to three concentrations (6.25%, 12.5% and 25%) of each EO, it was observed a reduction in viable cell count of up to 2.52 CFU.log cm⁻² at the highest concentration evaluated. The activity of the two evaluated EOs in the biofilm removal was observed by Laser Scanning Confocal Microscopy, the biofilm removal was more significant increasing the oil concentration. To sum up, *S. aureus* isolates involved in outbreaks of staphylococcal food poisoning in Rio Grande do Sul have antimicrobial resistance and tolerance to sanitizers and are able to form biofilm on stainless steel. The prevalent agr groups (agr II and III) regulate antimicrobial resistance and biofilm formation in this bacterial species. It was found that evaluated EOs have antimicrobial capacity and reduce the number of viable cells in preformed biofilm of *S. aureus* at the evaluated time and concentrations.

Key-words: Bacterial resistance, Confocal Laser Scanning Microscopy, Matico, Muña, Stainless Steel.

Lista de figuras

Figura 1. Inflorescência de <i>Minthostachys setosa</i> (Briq) Epling.	27
Figura 2. Inflorescência de <i>Piper elongatum</i> (Vahl).....	28

Abreviaturas

- agr* – Sistema Acessório de Regulação Gênica
- CDC - Center for Disease Control and Prevention
- DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos
- ECN – Estafilococos Coagulase Negativa
- ECP – Estafilococos Coagulase Positiva
- EE – Enterotoxinas estafilocócicas
- IAE – Intoxicação alimentar estafilocócica
- OE – Óleos Essenciais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.2 Intoxicação alimentar estafilocócica	17
2.3 Formação de biofilme por <i>S. aureus</i>	19
2.4 Resistência a antimicrobianos	22
2.5 Resistência a sanitizantes	23
2.6 Óleos essenciais	24
2.7 Utilização de OE como alternativas para a remoção de biofilme	25
2.8 Óleo essencial de <i>Minthostachys setosa</i> (Briq) Epling	26
2.9 Óleo essencial de <i>Piper elongatum</i> (Vahl)	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 CAPÍTULOS	30
4.1 MANUSCRITO 1 – Detecção dos tipos <i>spa</i> , grupos <i>agr</i> , genes do <i>cluster egc</i> e da resistência a antimicrobianos e tolerância a sanitizantes em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de surtos de intoxicação alimentar	30
4.2 MANUSCRITO 2 – Avaliação da atividade antimicrobiana e capacidade de remoção de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> formado sobre aço inoxidável de óleo essencial de <i>Piper elongatum</i> (vahl) e <i>Mintosthachys setosa</i> (briq)	54
5 CONCLUSÃO GERAL	91
6 REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO GERAL

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causadas pelo consumo de alimentos ou bebidas contaminadas por patógenos que podem entrar na cadeia alimentar em qualquer etapa do processo, da produção ao consumo (WHO, 2019). No Brasil, *Staphylococcus aureus* ocupa o terceiro lugar como agente causador de DTA, sendo responsável por 9,4% das notificações, no período de 2009 a 2018 (Brasil, 2019). Em 2016, nos Estados Unidos da América (EUA), foram registrados 241 994 casos deste tipo de intoxicação alimentar, com 1 067 hospitalizações e 6 mortes (CDC, 2017).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, não esporulada, coagulase positiva, anaeróbia facultativa, capaz de tolerar altas concentrações de cloreto de sódio (15%) e de se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura (7°C a 48,5°C) e pH (4,2 a 9,3), tendo como reservatório primário, a pele e membranas mucosas, especialmente a região naso-faríngea de mamíferos e aves (Dos Santos et al., 2007). Encontra-se amplamente distribuída na natureza, sendo transmissível aos alimentos pelos animais (gado leiteiro com mastite, por exemplo), ambiente de processamento e por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos (Silva et al., 2017). Esta bactéria é capaz de produzir enterotoxinas que são pré-formadas nos alimentos e após o consumo, causam a intoxicação alimentar estafilocócica (IAE) produzindo náuseas, vômitos, diarreia e dores de cabeça (Hennekinne, 2018)

As enterotoxinas estafilocócicas (EE) são proteínas extracelulares, de baixo peso molecular (22 a 29 kDa), solúveis em água e resistentes à hidrólise por enzimas proteolíticas, tais como a pepsina do sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão (Le Loir et al., 2003; Rahimi & Alian, 2013). São estáveis ao aquecimento a 100 °C durante 30 minutos (Murray et al., 2017), motivo pelo qual não são inativadas totalmente durante a cocção, pasteurização, ultrapasteurização ou outros tratamentos térmicos (Rahimi & Alian, 2013). Isto significa que a atividade biológica das EE permanece inalterada mesmo após o processamento térmico dos alimentos (Holečková et al., 2002).

Os genes que codificam as EE podem estar presentes, tanto em elementos genéticos móveis, tais como fagos, plasmídeos, como em ilhas de patogenicidade (Le Loir et al., 2003). Por exemplo, a ilha de patogenicidade SaPI3, reúne os genes das EE em um *cluster* denominado enterotoxin gene *cluster* (*cluster egc*), que agrupa os

genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo* e dois pseudogenes ϕ ent1 e ϕ ent2 (Jarraud et al., 2001; Kuroda et al., 2001). Jarraud et al. (2001), descrevem o *cluster egc* como o berço das EE onde, a partir de eventos de recombinação genética, podem surgir novos genes codificadores de superantígenos estafilocócicos capazes de causar intoxicação alimentar.

A tipagem molecular é uma ferramenta de extrema importância para a identificação da diversidade genética de *S. aureus* responsáveis por surtos de IAE. Neste sentido, foram estabelecidas diferentes técnicas, sendo uma delas a *spa typing*, baseada na determinação da região polimórfica X do gene que codifica a proteína estafilocócica A (Roussel et al., 2015). Por outro lado, um dos principais fatores que regulam e controlam a expressão dos genes de virulência, patogênese e formação de biofilme em *S. aureus* é o sistema acessório de regulação gênica *agr* (Thompson & Brown, 2017). Além disso, *S. aureus* pode ser estratificado em 4 grupos *agr* distintos (*agr* I, *agr* II, *agr* III e *agr* IV), com diferentes padrões de virulência e, quando os isolados são identificados dentro de um desses grupos, uma relação pode ser estabelecida entre eles, bem como com os fatores de virulência que eles expressam (Jarraud et al., 2002).

A “época dourada dos antimicrobianos” compreende as décadas de 1950 a 1970, período no qual a maioria das classes de antimicrobianos foi descoberta, porém, também estes foram amplamente utilizados e, foi a partir daí, que a resistência bacteriana começou a se tornar uma preocupação (Rapini et al., 2004). Desde então, a resistência a antimicrobianos tornou-se um problema de saúde pública e a rápida aquisição de resistência à maioria dos agentes antimicrobianos, como penicilinas, meticilina, macrolídeos, aminoglicosídeos, cloranfenicol e tetraciclina, dificulta o tratamento e o controle de infecções por diversos micro-organismos, dentre os quais, os estafilococos (Bitrus et al., 2018). Com relação aos sanitizantes, embora a resistência a esses compostos possa ser multifatorial, bombas de efluxo com múltiplos genes de resistência são os mecanismos predominantes que medeiam a resistência cruzada a antimicrobianos e sanitizantes (Conceição et al., 2016).

Além disso, a capacidade de *S. aureus* de sobreviver a condições hostis, se deve, em parte, a capacidade de produção de biofilme, tendo em vista que as características destas estruturas e seus atributos fisiológicos conferem uma resistência inata aos agentes antibacterianos, sejam estes antimicrobianos, ou

germicidas (Donlan & Costerton, 2002). Sabe-se que dentre os materiais comumente utilizados na indústria alimentícia, nenhum possui a capacidade de impedir a formação de biofilmes microbianos (Kingshott et al., 2003) e uma vez formados, os biofilmes tornam-se pontos de contaminação persistente dos alimentos, liberando células de micro-organismos deteriorantes ou patogênicos, como *S. aureus*, que podem afetar a qualidade e a segurança microbiológica dos alimentos em qualquer ponto da cadeia de produção de alimentos (Friedriczewski, 2017), o que pode representar um risco para a saúde dos consumidores. Os biofilmes fornecem proteção às células bacterianas, o que reduz a eficácia dos procedimentos de limpeza e sanitização. Deste modo, a busca por alternativas aos sanitizantes frequentemente utilizados na indústria de alimentos vem crescendo, uma vez que os micro-organismos podem adquirir resistência a esses produtos.

Sendo assim, os óleos essenciais (OE), que são compostos complexos produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários, e que podem apresentar propriedades antibacterianas (Chouhan et al., 2017), têm potencial para serem utilizados como sanitizantes naturais alternativos, com a possibilidade de usar seus metabólitos ou seus constituintes no controle de biofilme na indústria de alimentos. Assim, a espécie *Mintostachys setosa*, conhecida como Muña, é uma planta arbustiva aromática da família Lamiaceae, cultivada nos altiplanos andinos e utilizada como carminativo, digestivo e antiespasmódico (Brack, 1999), também é utilizada como conservante de alimentos, em especial de batatas e milho (Otoya, 2020). O gênero *Mintostachys* apresenta espécies que são ricas em OE e tem terpenos com ação antimicrobiana, no entanto, apenas OE de algumas dessas espécies foram estudadas. Por outro lado, a espécie *Piper elongatum* ou comumente conhecida como “matico” pertencente à família Piperáceae (Brack, 1999), é um arbusto ou árvore, que possui uma ampla gama de usos tradicionais e cujo OE tem um efeito inseticida e antibacteriano (Lock et al., 2016).

Nesse contexto, objetivou-se determinar os tipos *spa*, grupos agr, a presença de genes do *cluster egc*, e avaliar o perfil de resistência fenotípica e genotípica a sanitizantes e antimicrobianos em isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar bem como sua habilidade de formação de biofilme em aço inoxidável e verificar a capacidade antimicrobiana e de remoção de biofilme de dois

óleos essenciais de plantas de origem andina (*Piper elongatum* e *Minthostachys setosa*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae e é composto por 53 espécies e 28 subespécies (Euzeby, 2019). Bioquimicamente, os membros desse gênero bacteriano são classificados em dois grupos: 1) Estafilococos Coagulase Positiva (ECP), e 2) Estafilococos Coagulase Negativa (ECN). Considerado o mais patogênico do gênero, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é o membro mais importante dos ECP, produz diversos fatores de virulência e causa infecções, tanto em humanos, quanto em animais (Dos Santos et al., 2007; Bitrus et al., 2018). *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, catalase e coagulase positiva, β -hemolítica, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos, que tende a se agrupar em forma de cachos de uva (Bitrus et al., 2018).

Staphylococcus aureus tem capacidade de multiplicar-se em uma ampla faixa de temperatura (7 a 48,5 °C; ideal 30 a 37 °C), pH (4,2 a 9,3; ideal 7 a 7,5), e concentrações de até 15% de cloreto de sódio (Silva et al., 2017; Paparella et al., 2018). Além disso, é capaz de tolerar a dessecação e tem capacidade de sobreviver em ambientes hostis, como pele e mucosas de humanos, bem como em superfícies inanimadas, formando biofilme (Kadariya et al., 2014; Paparella et al., 2018). Além de ser um micro-organismo ubíquo, comensal e oportunista, também é um patógeno muito versátil, possuindo diversos fatores de virulência como invasão, resistência a antimicrobianos e sanitizantes, além da produção de toxinas, razão pela qual é considerado um importante micro-organismo veiculado por alimentos (Chaibenjawong & Foster, 2011).

O sistema acessório de regulação gênica (*agr*) é um dos mais importantes e mais bem caracterizados *operons* de *S. aureus* (Gomes-Fernandes et al., 2017), que regula a produção de vários fatores de virulência, incluindo proteínas de superfície, exoenzimas e toxinas, como as enterotoxinas estafilocócicas, além de participar da formação de biofilme (Jarraud et al., 2002). Baseado no polimorfismo dessa região gênica, existem 4 grupos *agr* (I, II, III, IV), com diferentes padrões de virulência e, quando os isolados são identificados dentro desses grupos, uma relação pode ser estabelecida entre eles, bem como com os fatores de virulência que eles expressam (Jarraud et al., 2002). Além dos grupos *agr*, a proteína A (Spa), uma proteína de 42 kDa, é um importante fator de virulência envolvido na patogênese de *S. aureus* (Khademi et al., 2016), entretanto, a análise da sequência de DNA da região de

repetição variável do gene da proteína A, é uma maneira rápida e precisa para atribuir relações clonais e filogenéticas entre linhagens de *S. aureus* considerados epidemiologicamente não relacionados (Koreen et al., 2004). Assim, entre as várias técnicas de tipificação molecular para *S. aureus*, a tipificação por *spa* (*spa typing*) é considerada uma técnica rápida e eficaz, devido a sua excelente reprodutibilidade interlaboratorial e facilidade de uso e interpretação (Roussel et al., 2015)

2.2 INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ESTAFILOCÓCICA

Staphylococcus aureus causa a intoxicação alimentar estafilocócica (IAE), que pode cursar com gastroenterite grave, náuseas, vômitos, diarreia e dores abdominais, cujos sintomas podem surgir entre 1 a 6 h após o consumo de alimentos contaminados com as toxinas produzidas por essa bactéria (Balaban & Rasooly, 2000; Argudín et al., 2010). Geralmente, o quadro de IAE é autolimitante, com desaparecimento dos sintomas dentro de 24-48 h após o início. A IAE é considerada uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns no Brasil, resultando em 9,4% das notificações no período de 2009 a 2018 (Brasil, 2019). Os principais alimentos envolvidos em IAE são o leite e seus derivados, salsichas, ovos, carne enlatada, saladas, assim como refeições cozidas e cruas (Le Loir et al., 2003; Hennekinne, 2018). Somado a isso, *S. aureus* é, também, uma das principais causas de mastite bovina, ovina e caprina, resultando em uma redução substancial, tanto na produção, como na qualidade do leite, e gerando consideráveis perdas econômicas para os produtores de leite e para os laticínios (Merz et al., 2016).

Staphylococcus aureus faz parte da microbiota normal da pele e membranas mucosas de mamíferos e aves. Esta bactéria pode ser disseminada no ambiente e sobreviver por longos períodos, devido a sua capacidade de formar biofilme (Hennekinne, 2018). A sua transmissão se deve, principalmente, a práticas de higiene inadequadas durante o processamento, cozimento ou distribuição dos alimentos. Além disso, após a contaminação, o resfriamento inadequado pode favorecer sua multiplicação e/ou estimular a produção de toxinas (Le Loir et al., 2003; Hennekinne et al., 2012).

Para que ocorra a IAE são necessárias cinco condições: (1) uma fonte contendo estirpes de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas; (2) transferência de bactérias da fonte de origem para os alimentos, por exemplo, utensílios de preparo de alimentos contaminados devido às más práticas de higiene e de produção; (3)

composição dos alimentos com características físico-químicas favoráveis para a multiplicação de *S. aureus*; (4) temperatura favorável e tempo suficiente para a multiplicação bacteriana e produção de toxinas; e (5) ingestão de alimentos contendo quantidades suficientes de enterotoxinas capaz de provocar sintomas. As EE são detectáveis nos alimentos que apresentam populações de *S. aureus* acima de 10^5 UFC/mL de alimento. A dose mínima de EE ingerida para causar intoxicação é 100 ng (Hennekinne et al., 2012; Hennekinne, 2018)

A IAE é causada pela ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (EE) pré-formadas por estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus* (Hennekinne et al., 2012; Silva et al., 2017). As EE são proteínas de baixo peso molecular (22 a 29 kDa), pertencentes a família dos superantígenos devido a sua capacidade de induzir a ativação excessiva de células T (Benkerroum, 2018). Além disso, são potentes exotoxinas gastrointestinais e levam a gastroenterite, normalmente ocasionando vômitos, diarreia e inflamação intestinal (Balaban & Rasooly, 2000; Benkerroum, 2018).

As EE são termoestáveis, ou seja, não são degradadas durante a cocção normal, pasteurização, ultrapasteurização ou outros tratamentos térmicos (Rahimi & Alian, 2013), e persistem sob condições ambientais severas, tais como congelamento e secagem. Ao mesmo tempo, são resistentes a hidrólise por enzimas proteolíticas, como pepsina ou tripsina e pH baixo, permitindo que sejam totalmente funcionais no trato gastrointestinal após a ingestão (Le Loir et al., 2003).

Até o momento, 28 EE e EE *like* foram relatadas na literatura (Chieffi et al., 2020), sendo que as EE clássicas (i.e. EEA, EEB, EEC, EED e EEE) são responsáveis por cerca de 95% dos surtos de IAE. No entanto, as denominadas EE *like* (EEG, EEI, EEIM, EEIN e EEIO) também têm sido relacionadas a surtos de IAE (Zocche, 2008; Chen & Xie, 2019). A EEA, sozinha ou em conjunto com outras EE, é a toxina mais relacionada com a IAE, provavelmente devido à sua elevada resistência às enzimas proteolíticas (Argudín et al., 2010). Por outro lado, a EEB causa sintomas mais graves em comparação com as outras, e também foi identificada como uma potencial arma biológica (Greenfield et al., 2002; Pinchuk et al., 2010). A EED é a segunda EE mais associada à IAE, sendo que pequenas quantidades desta toxina são suficientes para causar a IAE. Em alguns casos de IAE, a EEE foi identificada, enquanto a EEF foi implicada na síndrome do choque tóxico (Pinchuk et al., 2010).

Os genes codificadores de EE podem ser encontrados numa variedade de elementos genéticos móveis, que incluem profagos, plasmídeos, transposons, bem

como em ilhas de patogenicidade de *S. aureus* (SaPIs), e em clusters de genes de enterotoxinas (*egc*). Isto é consistente com a frequente transferência genética horizontal e a distribuição generalizada de EE/EE like entre estirpes de *S. aureus* (Benkerroum, 2018).

2.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *S. aureus*

O biofilme é definido como uma comunidade de células sésseis de origem microbiana, caracterizado pela ligação irreversível a um substrato (abiótico ou biótico), ou umas às outras, e embebida numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE). Contudo, as células nos biofilmes apresentam um fenótipo alterado com respeito à taxa de multiplicação e a transcrição de genes (Donlan & Costerton, 2002). As SPE atuam como barreiras protetoras para as células, aumentando sua tolerância à dessecação, pressão osmótica, radiação ultravioleta, sanitizantes e antimicrobianos (Kim et al., 2018). A formação de biofilme por *S. aureus* é um processo complexo que pode ser dividido em três etapas principais: (i) adesão inicial; (ii) produção de matriz extracelular e proliferação; e (iii) estruturação de biofilme e desprendimento de células (Schilcher & Horswill, 2020)

A adesão inicial às superfícies abióticas depende das características físico-químicas, tanto da célula como da superfície de contato. Neste caso, a ligação é facilitada por interações hidrofóbicas e eletrostáticas, bem como por um glicopolímero extracelular, denominado ácido teicoico, que é o principal fator impulsionador destas interações (Gross et al., 2001). Cucarella et al. (2001) e Speziale & Pietrocola (2020) destacam que as proteínas de ligação à fibronectina (FnBPs) e as proteínas de repetição de aspartato serina (SdrC) também podem estimular a adesão de *S. aureus* a superfícies abióticas, o que também foi demonstrado para a proteína associada ao biofilme (Bap). Após a adesão inicial, as células começam a proliferar-se levando à formação de microcolônias. Como parte do processo de maturação precoce do biofilme, as bactérias também começam a produzir SPE e, formam a matriz do biofilme. As SPE são compostas, principalmente, por polissacarídeos, proteínas, ácidos teicóicos e DNA extracelular (eDNA) (Schilcher & Horswill, 2020).

Dependendo das SPE, os biofilmes estafilocócicos podem ser divididos em duas grandes categorias: biofilmes compostos por uma matriz de polissacarídeos e biofilmes com uma matriz proteica (Speziale et al., 2014; Schilcher & Horswill, 2020). Nos biofilmes compostos por polissacarídeos, o principal componente do SPE é a poli

(1-6)-N-acetilglucosamina (PNAG), também conhecida como adesina polissacarídica intercelular (PIA), que é produzida e secretada por proteínas codificadas no *operon* cromossomal de adesão intercelular *ica* ou *icaADBC* (Fitzpatrick et al., 2005).

As subunidades IcaA e IcaD formam a proteína transmembrana N-acetilglucosamina transferase, produzindo oligômeros de N-acetil-glucosamina, os quais são alongados e translocados para a superfície celular pela proteína de membrana IcaC, onde a proteína IcaB, ligada à superfície, desacetila os polímeros, introduzindo cargas positivas que aumentam a aderência de PIA à superfície bacteriana. O *operon ica* é importante para a formação de biofilme em *S. aureus*, e sua expressão é induzida pelas condições ambientais, tais como baixo oxigênio, glicose, pressão osmótica e temperatura (Miao et al., 2019).

Com relação ao biofilme formado por matrizes compostas principalmente por material proteico, Fitzpatrick et al. (2005) observaram a formação destes tipos de biofilme em estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), enquanto outro estudo (O'Neill et al. (2007) demonstraram que as estirpes de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) são mais frequentemente dependentes de Ica. Estes dados sugerem que a formação de biofilme independente de Ica é estirpe-específica em *S. aureus*. Além disso, a proteína Bap (biofilm-associated protein), que codifica uma proteína de superfície com 2.276 aminoácidos, pode promover o desenvolvimento do biofilme, independentemente da produção de PIA, através da agregação célula-célula (Lasa & Penadés, 2006).

Outro componente importante do biofilme estafilocócico é o eDNA. Sua carga negativa permite que atue como aglutinante nas interações célula-célula, célula-superfície e célula-hospedeiro (Lister & Horswill, 2014). O eDNA está envolvido tanto na formação e maturação do biofilme, como na manutenção das estruturas maduras (Izano et al., 2008). A grande quantidade de eDNA na matriz do biofilme representa um pool genético considerável, que pode promover a transferência horizontal de genes, especialmente em biofilmes de estirpes com características diferentes e, conseqüentemente, pode promover uma possível transferência e subsequente disseminação de genes de resistência a antimicrobianos, representando uma séria ameaça em biofilmes clínicos (Schwartz et al., 2016).

Após a maturação do biofilme em estruturas tridimensionais, ocorre um processo de dispersão, que leva à disseminação de células estafilocócicas,

permitindo que células livres formem biofilme em novos locais ou contaminem alimentos em uma planta de processamento (Rosenthal et al., 2014).

Para isso, *S. aureus* utiliza processos autocontrolados, incluindo mecanismos específicos que facilitam a liberação das células do biofilme no ambiente, e a eficácia desses mecanismos depende da composição da matriz polimérica (Schilcher & Horswill, 2020). Por exemplo, os biofilmes proteicos são mais suscetíveis à dispersão mediada por proteases, e *S. aureus* produz e segrega 10 proteases: a metaloprotease aureolysina (Aur); as duas proteases cisteína SspB e ScpA; e sete proteases de serina conhecidas como SspA (também chamada de protease V8) e SplA (Golonka et al., 2004). Os biofilmes compostos por uma matriz de eDNA estão sujeitos à degradação por duas nucleases termoestáveis: Nuc1 e Nuc2 (Tang et al., 2008). Outras moléculas que participam na formação da estrutura do biofilme estafilocócico são as modulinas fenólicas solúveis (PSM, phenol-soluble modulín). Estas moléculas são agrupadas em peptídeos do tipo alfa (PSM α e PSM γ , também conhecido como δ -toxina) e do tipo beta (PSM β), e podem dispersar biofilmes, muito provavelmente, interrompendo as interações não covalentes entre os componentes da matriz, devido à sua natureza anfipática, com propriedades semelhantes aos surfactantes (Periasamy et al., 2012).

A formação de biofilme confere muitas vantagens às células microbianas em um ambiente da indústria alimentícia, como resistência física (contra dessecação), resistência mecânica (contra correntes de líquidos em tubulações) e proteção química (contra produtos químicos, antimicrobianos e desinfetantes usados na indústria) (Flemming et al., 2016). Os efeitos associados ao biofilme (patogenicidade, corrosão das superfícies metálicas, alteração das propriedades organolépticas devido à secreção de lipases ou proteases) são de importância crítica em algumas indústrias, tais como fábricas de laticínios, onde numerosos processos e estruturas (tanques de leite cru, tubulações, centrífugas de manteiga, tanques de queijo, pasteurizadores e ferramentas de embalagem) atuam como substratos de superfície para a formação de biofilme em diferentes temperaturas e com diferentes espécies colonizadoras (Pinto et al., 2020).

Staphylococcus aureus pode formar biofilmes tanto em superfícies bióticas quanto abióticas ao longo da cadeia de produção de alimentos. O crescimento dos biofilmes de *S. aureus* é potencializado por vários métodos de processamento encontrados na indústria alimentícia, tais como temperaturas subótimas, desinfecção

inadequada ou uma combinação de sal e glicose. A transcrição dos genes envolvidos na formação do biofilme e da virulência deste patógeno (proteínas de superfície, proteases, polissacarídeos capsulares) é regulada na presença de concentrações sub-letais de vários detergentes comuns usados na indústria alimentícia (Slany et al., 2017).

2.4 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A resistência a antimicrobianos tornou-se uma ameaça à saúde pública, causando sérias implicações sanitárias, econômicas e sociais, associadas a uma elevada mortalidade e morbidade (Dadgostar, 2019). Um dos principais fatores que contribuem para seu desenvolvimento é o uso indevido ou excessivo destes agentes na área de saúde animal e humana, agricultura, aquicultura e meio ambiente (Perović et al., 2018). Os alimentos são um importante fator na disseminação da resistência de micro-organismos a antimicrobianos. Isso ocorre devido à presença de resíduos de antimicrobianos, à transferência de genes de resistência entre estirpes, bem como pela presença de micro-organismos resistentes provenientes da microbiota autóctone do alimento (Pereira et al., 2009).

As bactérias se tornam resistentes quando uma droga perde sua capacidade de inibir efetivamente sua multiplicação e continuam se replicando mesmo na presença de níveis terapêuticos dos antimicrobianos, sendo necessária uma concentração maior do que a normal para que tenha efeito (Zaman et al., 2017). A resistência aos antimicrobianos pode ser desenvolvida pela mutação de genes existentes (transferência vertical) ou pela aquisição de novos genes de outras estirpes ou espécies (transferência horizontal). A transferência horizontal de genes ocorre através de elementos genéticos móveis, incluindo fagos, plasmídeos e transposons (Schmieder & Edwards, 2012).

Staphylococcus aureus é um patógeno que apresenta capacidade de se adaptar e responder rapidamente a cada novo antimicrobiano, através de diferentes mecanismos de resistência (Pantosti et al., 2007; Bitrus et al., 2018). Esses mecanismos de resistência incluem a inativação enzimática do antimicrobiano (penicilinase e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos), alteração do alvo, com menor afinidade pelo antimicrobiano (por exemplo, a proteína aglutinante da penicilina de *S. aureus* resistente à metilina), captura de antimicrobianos (para vancomicina e, possivelmente, daptomicina) e bombas de efluxo (fluoroquinolonas e tetraciclina).

Além disso, esse micro-organismo adquiriu conjuntos de genes complexos (cassete cromossômico estafilocócico mec (SCCmec) ou o *operon vanA*), através da transferência horizontal de genes, enquanto que a resistência a outros antimicrobianos, incluindo alguns dos mais recentes (por exemplo, fluoroquinolonas, linezolid e daptomicina), se desenvolveu através de mutações espontâneas e seleção positiva (Pantosti et al., 2007; Foster, 2017; Bitrus et al., 2018). Neste contexto, alguns dos principais genes responsáveis pela resistência a antimicrobianos são: beta-lactâmicos (*blaZ*, *mecA*), aminoglicosídeos (*strA*, *strB*), sulfonamida (*sul1*, *sul2*), tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetK*, *tetM*, *tetO*) e macrolídeos (*ereB*, *ermB*, *ermC*) (Zaman et al., 2017).

2.5 RESISTÊNCIA A SANITIZANTES

O CDC (Center for Disease Control and Prevention), dos EUA, define sanitizantes como os agentes químicos utilizados em objetos e superfícies inanimadas para destruir todos os micro-organismos patogênicos, mas não necessariamente as formas microbianas esporuladas. Os sanitizantes podem ser compostos por formulações específicas, contendo um ou mais agentes biocidas ativos, que podem atingir de forma indiscriminada as estruturas celulares bacterianas. Os agentes ativos biocidas comercialmente disponíveis usados na indústria de alimentos, incluem compostos quaternários de amônio (cloreto de benzalcônio), biguanidas (clorexidina), cloro e derivados de cloro, agentes aniônicos ácidos, peróxido de hidrogênio e ácido peracético (Donaghy et al., 2019).

O mecanismo de ação dos compostos quaternários de amônio é baseado na alteração física e solubilização parcial da membrana e da parede celular bacteriana, enquanto os biguanidas entram na célula desestabilizando os cátions divalentes associados à membrana celular e alterando o lipopolissacarídeo (Gnanadhas et al., 2013). O ácido peracético promove a desnaturação de enzimas e proteínas, assim como o aumento na permeabilidade da parede celular devido ao rompimento das ligações sulfidrilas e sulfúricas de proteínas (Kitis, 2004). O hipoclorito de sódio apresenta atividade antimicrobiana com ação sobre os sítios enzimáticos essenciais das bactérias, promovendo inativação irreversível causada pela cloraminação e os íons hidroxila (Estrela et al., 2003).

A utilização de sanitizantes em baixas concentrações e tempos de contato insuficientes produzem alterações na estrutura bacteriana, influenciando na

adaptação do micro-organismo a estes compostos e, conseqüentemente, na perda do seu efeito, portanto, a resistência pode ocorrer devido a fatores intrínsecos (aumento de tolerância) ou resistência adquirida (elementos genéticos móveis), sendo as mais prevalentes as bombas de efluxo (Morente et al., 2013; Mc Carlie et al., 2020).

Independentemente da origem dos isolados de *S. aureus*, foram descritos numerosos genes que codificam bombas de efluxo. Geralmente, estes genes são de origem plasmidial (*qacA*, *qacB*, *qacC* (*smr*), *qacG* e *qacH*) e codificam proteínas de membrana, através das quais os estafilococos resistem ao efeito bactericida dos compostos quaternários de amônio e biguanidas. Por outro lado, os genes cromossômicos (*norA*, *norB*, *mepA*) estão envolvidos na resistência às fluoroquinolonas hidrofílicas (norfloxacin e levofloxacin), bem como aos compostos quaternários de amônio (Langsrud et al., 2003; Bjorland et al., 2005; Conceição et al., 2016; Taheri et al., 2016; Hassanzadeh et al., 2020).

2.6 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OE) são compostos obtidos a partir do metabolismo secundário das plantas aromáticas. São líquidos, voláteis, lípidos e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos com uma densidade geralmente menor do que a da água (Bakkali et al., 2008). Podem ser sintetizados por todos os órgãos vegetais (flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou casca) e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008).

Os OE são extraídos por diversos métodos, tais como destilação a vapor, extração por solvente ou hidrodestilação, sendo este último, o método mais utilizado uma vez que é utilizada apenas água (Raut & Karuppayil, 2014). Por serem misturas naturais muito complexas, podem conter cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações, geralmente tendo alguns compostos majoritários considerados como os componentes principais, flutuando entre 20 e 70% de concentração em comparação com os demais, que se encontram em quantidade traço. Geralmente, os componentes principais determinam as propriedades biológicas dos OE (Bakkali et al., 2008) que incluem dois grupos de origem biosintética diferente, o grupo principal é composto por terpenos e terpenoides e o outro de constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (Pichersky et al., 2006).

2.7 UTILIZAÇÃO DE OE COMO ALTERNATIVAS PARA A REMOÇÃO DE BIOFILME

Os OE são usados há centenas de anos como medicamentos naturais por suas propriedades antissépticas, fungicidas e bactericidas (Bakkali et al., 2008). A ação antimicrobiana dos OE e seus componentes pode ser atribuída a sua hidrofobicidade, que lhes permite ligar-se aos lipídios presentes na membrana celular das bactérias, tornando-as mais permeáveis através da alteração das estruturas celulares. Esse aumento da permeabilidade pode levar à morte celular devido à perda de moléculas e íons essenciais para a célula bacteriana (Devi et al., 2010; Lv et al., 2011; Chouhan et al., 2017). Além disso, os OE interferem na divisão celular, podendo causar inibição das ATPases, inibição da síntese de proteínas e inibição da formação de biofilme (Vasconcelos et al., 2018; Tang et al., 2020).

Dessa forma, nos últimos anos, surgiu o interesse científico sobre a atividade antibiofilme dos OE. Por exemplo, o OE de *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão) exibiu atividade antimicrobiana e antibiofilme contra *S. aureus* a 0,125% v/v de concentração (Adukwu et al., 2012). Kavanaugh & Ribbeck (2012), avaliaram os OE de *Cinnamomum cassia* (cássia), *Myroxylon balsamum* (bálsamo do Peru), e de *Thymus vulgaris* (tomilho vermelho), demonstrando sua eficácia na erradicação de biofilme de *Pseudomonas* spp. e de *S. aureus* em superfície de poliestireno. Dos Santos Rodrigues et al. (2018), demonstraram que o OE de *Origanum vulgare* (orégano) apresentou redução de ≥ 2 log UFC/cm² em biofilme de *S. aureus* formado em superfície de aço inoxidável, e que as membranas celulares das células sésseis expostas ao OE apresentavam morfologia irregular evidenciada por microscopia eletrônica de varredura. Budri et al. (2015), avaliaram os OE de *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e seus principais componentes (eugenol e cinamaldeído), observando inibição significativa no biofilme formado por *S. aureus* em superfícies de poliestireno e aço inoxidável (69,4% e 63,6%, respectivamente). Da mesma forma, foram avaliadas microemulsões formuladas com *Cinnamomum cassia* (cássia), *Salvia officinalis* (salvia) ou a mistura de ambas, causando uma redução de ≥ 3 log CFU cm⁻² em biofilme de *S. aureus* com 24 h de formação e em biofilmes desidratados, e promovendo até 68% de eliminação de biofilme após 90 min de exposição (Campana et al., 2017).

2.8 ÓLEO ESSENCIAL DE *Minthostachys setosa* (Briq) Epling

A família Lamiaceae contém, aproximadamente, 258 gêneros e 7193 espécies, sendo que no Brasil existem 23 desses 258 gêneros e 232 espécies. Dentre essas, destacam-se *Mentha spp.* (menta), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Origanum vulgare* (orégano), *Melissa officinalis* (erva-cidreira), *Mentha pulegium* (poejo), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Thymus vulgaris* (tomilho) (Do Nascimento Martinez et al., 2020), as quais têm sido utilizadas com diversas finalidades dentro da medicina popular brasileira, com indicações de uso para cólicas, dor de cabeça, gripe, asma, tosse, redução de colesterol, inflamações, rachaduras na mama, coceiras, entre outros. Além disso, alguns OE obtidos dessa família são descritos por suas propriedades terapêuticas, dentre as quais se destacam a atividade antioxidante, bactericida e antifúngica (Souza & Lorenzi, 2008).

Minthostachys é um gênero de interesse etnobotânico, farmacêutico e econômico composto por 17 espécies de arbustos aromáticos restritos à América do Sul andina (Schmidt-Lebuhn, 2008). *Minthostachys setosa* é uma espécie pertencente à família Lamiaceae, que cresce de forma silvestre e é conhecida localmente como “muña” (Brack, 1999). É um arbusto lenhoso e aromático de caule tetragonal, com folhas pequenas e ovais, apresentando pilosidade nos pecíolos e é na parte inferior onde se deposita a maior quantidade de óleos voláteis (Brack, 1999; Schmidt-Lebuhn, 2008), que cresce em toda a Cordilheira dos Andes, da Venezuela à Argentina. No Peru, tradicionalmente, as folhas e as flores dessa planta são utilizadas na culinária ou na preparação de infusões com ação digestiva, antidiarreica, vermífuga, antiespasmódica ou broncodilatadora. Em alguns lugares, também é utilizada para proteger os cultivos e os produtos armazenados dos danos causados pelos insetos (Lock et al., 2016; Otoyá, 2020).

Em relação ao OE de *M. setosa*, Senatore (1998) identificou, pela primeira vez, utilizando cromatografia gasosa a pulegona, a mentona e a isomentona como compostos majoritários. A pulegona é um monoterpeneo de interesse, por apresentar atividade antiinflamatória, reduzir a produção de citocinas, atuar como analgésico, antibacteriano, antifúngico e inseticida (Oumzil et al., 2002; De Sousa et al., 2011; Roy et al., 2018; Yang et al., 2019). As propriedades antimicrobianas dos OE de diferentes espécies de *Minthostachys* contra *S. aureus* foram avaliadas e revisadas por diversos autores (Feo et al., 1998; Pinto, 2010; Armas et al., 2016; Torrenegra-Alarcón et al., 2016; Mantilla German & Yupanqui Rojas, 2018; Laura Ticona, 2019; Cecchini et al.,

2021), demonstrando resultados promissores que fazem deste um OE interessante para ser objeto de pesquisa. Entretanto, ainda não existem registros de estudos sobre a atividade e potencial antibiofilme deste OE.



Figura 1. Inflorescência de *Minthostachys setosa* (Briq) Epling.

2.9 ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper elongatum* (Vahl)

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae, e compreende mais de 700 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo especialmente abundante no Peru, Equador, Bolívia, Paraguai, Brasil e norte da Argentina (Brack, 1999). No Brasil, a família Piperaceae é representada por cinco gêneros (*Piper*, *Peperomia*, *Potomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis*) e cerca de 500 espécies, bastante comuns em florestas, particularmente na Floresta Tropical Atlântica. Esta família tem importância alimentícia, medicinal e industrial sendo utilizada na obtenção de fármacos, temperos, corantes, cosméticos e inseticidas (De Oliveira et al., 2020). *Piper elongatum* é um arbusto ou árvore, de aproximadamente 2 a 3 metros de altura, com caules ramificados e cilíndricos, com folhas estipuladas, sesséis, alternas, opostas e simples, de aparência muito áspera na parte superior e com as nervuras salientes na forma de uma malha na parte inferior (Ulloa et al., 2004). Na medicina tradicional é conhecido como “matico” e é utilizado como antisséptico, antibacteriano, antifúngico, antipirético, antiespasmódico, repelente de insetos, cicatrizante, assim como no tratamento de doenças respiratórias e estomacais (Brack, 1999; Mostacero et al., 2002; Lock & Rojas, 2004). Lock & Rojas (2004), utilizando

cromatografia gasosa, verificaram que o OE de folhas de *P. elongatum* apresentava 66 compostos diferentes dentre os quais destaca-se o dilapiol (82,2%) no entanto, os autores descrevem que a composição química dos OE dependerá da espécie de *Piper* do qual foi extraído.

A atividade antimicrobiana de OE extraídos de diferentes espécies de *Piper* foi comprovada em estudos anteriores (Brazao et al., 2014; Chuquimango Fuentes, 2017; Monzote et al., 2017), porém não há evidencia de sua utilização nem sua avaliação sobre biofilmes.



Figura 2. Inflorescência de *Piper elongatum* (Vahl)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os tipos *spa* e os grupos *agr*, detectar a presença de genes do *cluster egc*, bem como avaliar o perfil de resistência fenotípica e genotípica a sanitizantes e antimicrobianos em isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar no Rio Grande do Sul. Além disso, objetiva-se avaliar a habilidade de formação de biofilme em aço inoxidável dos isolados e verificar a capacidade de dois óleos essenciais de plantas de origem andina (*Piper elongatum* e *Minthostachys setosa*) como alternativa para a remoção do biofilme.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1. Identificar os tipos de *spa* bem como determinar os grupos *agr* em isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica no Rio Grande do Sul.

Objetivo 2. Detectar a presença dos genes do cluster *egc* (*seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*) nos isolados avaliados.

Objetivo 3. Determinar o perfil de resistência fenotípica a sanitizantes e antimicrobianos dos isolados.

Objetivo 4. Verificar a presença de genes de resistência a antimicrobianos e a sanitizantes nos isolados.

Objetivo 5. Verificar a capacidade de formação de biofilme pelos isolados em superfície de aço inoxidável.

Objetivo 6. Determinar a composição química de dois óleos essenciais de origem andina *Piper elongatum* e *Minthostachys setosa*.

Objetivo 7. Avaliar a atividade antimicrobiana de dois óleos essenciais (*Piper elongatum* e *Minthostachys setosa*) contra *S. aureus*, assim como sua ação sobre biofilmes pré-formados em superfícies de aço inoxidável.

4 CAPÍTULOS

4.1 MANUSCRITO 1 – Detecção dos tipos *spa*, grupos *agr*, genes do *cluster egc* e da resistência a antimicrobianos e tolerância a sanitizantes em isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de surtos de intoxicação alimentar

Manuscrito a ser submetido ao periódico Food Research International

Fator de Impacto: 4.972

Deteccção dos tipos *spa*, grupos agr, genes do *cluster egc* e da resistência a antimicrobianos e tolerância a sanitizantes em isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de surtos de intoxicação alimentar

Liseth Pamela Peralta-Canchis^a; Isabela Schneid Kroning^b; Ângela Maria Fiorentini^b;
Graciela Volz Lopes^b; Wladimir Padilha da Silva^{a,b*}

^aNúcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

E-mail: Lpc_07@hotmail.com

^bDepartamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

E-mail: isabelaschneid@gmail.com, angefiore@gmail.com, gracielavlopes@yahoo.br

* Autor correspondente:

Wladimir Padilha da Silva

E-mail: silvawp@ufpel.edu.br

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram determinar os tipos *spa* e os grupos *agr*, detectar os genes do *cluster egc* e avaliar a resistência fenotípica e genotípica a antimicrobianos e sanitizantes em isolados de *Staphylococcus aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar no Rio Grande do Sul. Dez tipos *spa* foram identificados sendo os mais prevalentes t008, t018 e t267 que tem uma estreita relação genética com isolados humanos e de surtos de intoxicação alimentar. O grupo *agr* III foi identificado em 30,76% dos isolados enquanto que o *agr* II em 7,69%. Houve amplificação do fragmento parcial do *cluster egc* somente em um isolado (S11). Com relação aos genes pertencentes ao *cluster*, observou-se que 23,07% dos isolados carregavam o gene *selN* e *sei*. O teste de susceptibilidade antimicrobiana mostrou que 100% dos isolados foram resistentes à penicilina e ampicilina, 30,76% à sulfonamida, 7,69% à eritromicina, claritromicina e tetraciclina. O isolado S7 apresentou multirresistência a β -lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina e macrolídeos. A PCR foi utilizada para a detecção de genes de resistência antimicrobiana sendo identificados nove: *blaZ* (76,9%), *ereB* (23,07%), *ermB* e *ermC* (23,07%), *sul2* (15,38%), *tetM* (38,46%), *tetB* (23,07%), *tetA* (15,38%) e *tetK* (7,69%). Todos os isolados avaliados mostraram tolerância aos dois sanitizantes testados cloreto de benzalcônio (CB) e clorexidina (CLX). Os genes codificadores das bombas de efluxo *mepA* e *norB* foram mais prevalentes (92,3%), seguidos pelo gene *norA* (76,92%) nos isolados. Os tipos *spa* identificados nos isolados possuem relação genética com isolados humanos, reforçando a importância dos manipuladores como uma fonte de contaminação de *S. aureus* para alimentos. Os isolados pertencem aos grupos *agr* II e *agr* III, que são relacionados a isolados produtores de enterotoxinas, entretanto, a ocorrência de genes do *cluster egc* foi apenas em um isolado. Os isolados apresentam resistência aos antimicrobianos e tolerância a sanitizantes testados, sugerindo que o uso excessivo destes produtos na clínica humana e veterinária, bem como na produção de alimentos, contribuem para o desenvolvimento de *S. aureus* apresentando resistência, ou mesmo multirresistência, a esses compostos.

Keywords: Bombas de efluxo, Genes de Resistência a antimicrobianos, Genes de resistência a sanitizantes, *spa* typing

1. INTRODUÇÃO

A intoxicação alimentar estafilocócica (IAE) é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns no mundo, sendo causada pela ingestão de alimentos contaminados com enterotoxinas produzidas por estafilococos, principalmente *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Denayer et al., 2017). No Brasil, *S. aureus* ocupa o terceiro lugar como agente causador de DTA, sendo responsável por 9,4% das notificações no período de 2009 a 2018 (Brasil, 2019). Na União Europeia, as toxinas bacterianas, incluindo as produzidas por *S. aureus*, foram incriminadas em 8% dos surtos de DTA em 2016, tornando-as o terceiro agente causador dessas doenças (Efsa, 2018). Além das enterotoxinas clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE), o *cluster egc* de *S. aureus*, agrupa genes codificadores das novas enterotoxinas (*seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo* e *selu*) (Jarraud et al., 2001), as quais também demonstraram atividade emética e podem estar envolvidas em IAE (Ono et al., 2017).

A avaliação da relação genética entre isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de IAE é muito relevante. Para isso, têm sido usadas diversas ferramentas moleculares, tais como Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), Tipagem em cassete cromossômico (SCCmec), *Multilocus sequence typing* (MLST), tipagem do gene acessório regulador (*agr typing*) e tipagem da proteína estafilocócica A (*spa typing*) (Singh et al., 2018). A técnica de tipificação do gene *spa* envolve o sequenciamento da região polimórfica X ou da região de repetição da sequência curta do gene da proteína A, e tem sido considerada adequada para discriminação entre isolados provenientes de surtos (Ghaznavi-Rad & Ekrami, 2018). Por outro lado, os genes do sistema regulatório, *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*, regulam mais de 70 genes em *S. aureus*, 23 dos quais controlam sua patogenicidade e infecção invasiva (Thompson & Brown, 2017). Além disso, *S. aureus* pode ser estratificado em 4 grupos diferentes (*agr I*, *agr II*, *agr III* e *agr IV*), de acordo com as sequências dos genes *agrC* e *agrD* (Javdan et al., 2019). Os grupos *agr* são diferentes em suas propriedades e prevalência em várias áreas geográficas, portanto, a identificação dos grupos predominantes em cada região pode ser utilizada para estabelecer uma relação entre os isolados de *S. aureus* (Bibalan et al., 2014).

Atualmente, a resistência a antimicrobianos e a sanitizantes tem causado vários transtornos, tanto do ponto de vista de saúde pública, quanto à saúde animal, agricultura, segurança dos alimentos e desenvolvimento econômico em nível global (Who, 2019). Assim, o uso indiscriminado de antimicrobianos levou ao surgimento de

estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), bem como de estirpes multirresistentes. Essa resistência tem sido relacionada a genes específicos para cada tipo de antimicrobiano: beta-lactâmicos (*blaZ*, *mecA*), aminoglicosídeos (*strA*, *strB*), sulfonamida (*sul1*, *sul2*), tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetK*, *tetM*, *tetO*), macrolídeos (*ereB*, *ermB*, *ermC*) (Wang et al., 2014; Jia et al., 2019).

Os sanitizantes são importantes em vários pontos da cadeia produtiva de alimentos, sendo os mais utilizados os compostos quaternários de amônio (QAC) como o cloreto de benzalcônio (CB), as biguanidas (clorexidina - CLX), cloro e derivados à base de cloro, agentes aniônicos ácidos, peróxido de hidrogênio e ácido peracético (Donaghy et al., 2019). A intensificação, o uso excessivo e incorreto de sanitizantes, as concentrações residuais e a limpeza insuficiente antes da sanitização podem levar a exposição a subdoses, contribuindo para o aumento e da resistência dos micro-organismos a esses compostos (Seier-Petersen et al., 2015). Dentro dos mecanismos predominantes de resistência bacteriana a esses compostos, as bombas de efluxo são bastante importantes, estando envolvidas na resistência cruzada, tanto aos antimicrobianos, quanto aos sanitizantes. Vários genes que codificam bombas de efluxo multi-drogas, tais como *qacA*, *qacB*, *smr*, *norA*, *ImrS*, *mepA* e *sepA*, foram descritos em *S. aureus* a partir de isolados clínicos humanos e animais, bem como em amostras ambientais (Conceição et al., 2016).

Os objetivos deste estudo foram determinar os tipos *spa* e os grupos agr em isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, bem como detectar a presença dos genes do *cluster egc* e avaliar a resistência fenotípica e genotípica dos isolados a antimicrobianos e sanitizantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 13 isolados de *S. aureus* provenientes de surtos de intoxicação alimentar, fornecidos pelo Laboratório de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os isolados foram identificados e caracterizados em nível molecular (Bastos et al., 2017) e armazenados à -80 °C. Para sua reativação, foram cultivados em ágar Triptona de Soja (TSA, Acumedia, EUA) e incubados à 37 °C, durante 24 h.

2.1 Tipificação do gene *spa*

A amplificação do gene *spa*, que codifica a proteína A, foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Ridom SpaServer utilizando os *primers* *spa-1113f* (5'-

TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C -3 ') e spa-1514r (5'-CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT -3 '). Os fragmentos amplificados foram purificados seguindo os protocolos Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). As amostras purificadas foram enviadas para a ACTGene Análises Moleculares (Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil) e os fragmentos de DNA foram sequenciados de acordo com o método Sanger, em um analisador genético AB 3500 (Applied Biosystems™, EUA). As sequências identificadas foram, então, atribuídas a tipos *spa* específicos, de acordo com os padrões descritos na base de dados Ridom SpaServer (<http://www.spaserver.ridom.de>).

2.2 Determinação dos grupos agr

Os grupos agr (I-IV) foram determinados por um ensaio de PCR-biplex, conforme descrito por Shopsisin et al. (2003). Os *primers* estão listados na Tabela 1.

2.3 Detecção de genes do *cluster egc*

Para detectar a presença dos genes *selm*, *seln* e *selo*, foram realizadas PCR-uniplex, enquanto para os genes *seg* e *sei* foi conduzida uma PCR-multiplex, utilizando os *primers* descritos na Tabela 2. Também foi realizada a amplificação parcial do *cluster egc*, a partir de um fragmento de 3375 pb (Tabela 2).

A reação ocorreu utilizando 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp), 1 µL de cada *primer* na concentração de 10 pmol, exceto a concentração dos *primers seg* e *sei* (20 pmol) e do *cluster egc* (12 pmol), 2 µL de DNA (50 ng) e 8,5 µL de água ultrapura, totalizando 25 µL de volume final. Os produtos PCR foram separados por eletroforese a 80V por 70 min em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA) 0,5X, utilizando-se o marcador de peso molecular DNA Ladder 1 Kb (Invitrogen®). Após, o produto amplificado foi corado com GelRed™ e visualizado sob luz UV em transiluminador (Loccus®, L-Pix Touch).

2.4 Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos foi avaliada pela técnica de difusão em ágar, seguindo o protocolo do Clsi (2016), utilizando-se a cepa ATCC *S. aureus* 25923 como controle. Foram avaliados 16 antimicrobianos: penicilina (10 U), ampicilina (10 µg), oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), claritromicina (15 µg), estreptomina (10 µg), amoxicilina + ácido clavulânico,

tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg), imipenen (10 µg), sulfazotrim (25 µg), gentamicina (10 µg), sulfonamina (300 µg), adquiridos da Laborclin (Brasil). Os resultados foram interpretados de acordo com os padrões de diâmetros de inibição para *Staphylococcus* spp. (Clsi, 2016). O perfil multirresistência foi definido como a resistência a três ou mais classes de agentes antimicrobianos (Efsa, 2013)

2.5 Avaliação da tolerância aos sanitizantes BC e CLX

A CIM para CB (Sigma-Aldrich, Irvine, UK) e CLX (Sigma-Aldrich, Irvine, UK) foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com os critérios da Clsi (2016), sendo definida como a menor concentração capaz de inibir a multiplicação visível dos cultivos bacterianos. Foram considerados tolerantes à CB e CLX aqueles isolados com CIM ≥ 3 µg.mL⁻¹ e CIM ≥ 1 µg.mL⁻¹, respectivamente (Taheri et al., 2016). Os testes foram realizados em triplicata.

2.6 Detecção molecular de genes de resistência a antimicrobianos e sanitizantes

O DNA dos 13 isolados foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Green & Sambrook (2012), com algumas modificações (vortex por dois minutos após a adição das pérolas de vidro). Através de PCR convencional foram avaliados os genes que codificam a resistência aos macrolídeos (*ereB*, *ermB*, *ermC*), tetraciclina (*tetA*, *tetB*, *tetK*, *tetL*, *tetM* e *tetO*), aminoglicosídeos (*strA* e *strB*), inibidores da síntese de folato (*sul1*, *sul2*, *dfpG*) e β-lactamases (*blaZ* e *mecA*), bem como os genes de bombas de efluxo (*norA*, *norB*, *mepA*, *qacA*, *qacG*, *qacH*, *qacJ* e *smr*). Os *primers* utilizados nas PCR estão listados na Tabela 3.

2.7 Análise Estatística

A associação entre resistência aos sanitizantes e presença de genes codificantes de bombas de efluxo entre os isolados de *S. aureus*, foi determinada pelo teste estatístico Qui-quadrado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1 Tipificação do gene *spa* e determinação dos grupos agr

Dez diferentes tipos *spa* foram identificados entre os 13 isolados de *S. aureus*. Os mais prevalentes foram o t008 (isolados S2 e S4), t018 (isolados S1 e S12) e t267 (isolados S3 e S6). Por outro lado, também foram encontrados os tipos *spa* t024 (isolado S5), t097 (isolado S13), t253 (isolado S11), t254 (isolado S10), t1094 (isolado S9), t2389 (isolado S8) e t16895 (isolado S7).

Os grupos agr III e agr II foram identificados em 30,76% (4/13) e 7,69% (1/13), respectivamente, enquanto os grupos agr I e agr IV não foram detectados entre os isolados estudados.

3.2 Detecção de genes do *cluster egc*

Houve amplificação do fragmento parcial do *cluster egc* no isolado S11. Com relação aos genes que compõem o *cluster*, observou-se que 23,07% (3/13) carregavam o gene *seln* e *sei*. Os genes *seg*, *selo* e *selm* não foram detectados.

3.3 Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos

Todos os isolados avaliados (n=13) foram resistentes à penicilina e ampicilina, 30,76% (4/13) à sulfonamida, e 7,69% (1/13) à eritromicina, claritromicina e tetraciclina. Concomitantemente, observou-se resistência intermediária à eritromicina e claritromicina (38,46% e 30,46%, respectivamente). Além disso, foi observado um perfil de multirresistência a quatro classes de antimicrobianos (β -lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina e macrolídeos) apenas no isolado S7 (7,69%).

3.4 Avaliação da tolerância aos sanitizantes BC e CLX

Todos os isolados apresentaram tolerância ao CB e ao CLX, com CIM variando entre 4 a 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

3.5 Detecção molecular de genes de resistência a antimicrobianos e sanitizantes

Foram identificados nove genes associados a resistência à antimicrobianos. O gene *blaZ*, que codifica resistência a beta-lactamases, foi detectado em 76,9% (10/13) dos isolados. Por outro lado, os genes responsáveis pela resistência a macrolídeos, tais como *ereB* foram detectados em 23,07% (3/13) e *ermB* e *ermC*, em 7,69% (1/13) dos isolados, respectivamente, sendo que os genes *ereB* e *ermC* foram identificados no mesmo isolado.

O gene *sul2*, responsável pela inibição da síntese de folato, foi detectado em 15,38% (2/13) dos isolados. Por outro lado, entre os genes de resistência a tetraciclina avaliados, o gene *tetM* foi detectado em cinco isolados (38,46%), seguido pelo gene *tetB* em três (23,07%), enquanto dois isolados (15,38%) carregavam o gene *tetA* e apenas um, o gene *tetK* (7,69%).

Os genes que codificam para as bombas de efluxo mais prevalentes foram *mepA* (92,3% - 12/13), *norB* (92,3% - 12/13), e *norA* (76,92% - 10/13). O gene *smr* foi detectado em 15,38% (2/13) dos isolados. Além disso, 76,92% (10/13) albergavam três desses quatro genes, concomitantemente. Os genes *qacA*, *qacG*, *qacH* e *qacJ* não foram detectados nos isolados avaliados.

4. DISCUSSÃO

Foram identificados 10 tipos *spa* entre os 13 isolados avaliados. Os tipos *spa* t008 (isolados S2 e S4), t018 (isolados S1 e S12) e t024 (isolados S5), identificados neste estudo, têm sido amplamente relacionados com isolados envolvidos em surtos de IAE, manipuladores de alimentos e isolados clínicos (Hanson et al., 2011; Jiménez et al., 2012; Wattinger et al., 2012). Por outro lado, Wu et al. (2018) avaliaram a prevalência de *S. aureus* em vegetais comercializados na China, e os caracterizaram de acordo com seus perfis de suscetibilidade a antimicrobianos, genes de enterotoxinas, *spa typing* e MLST, e detectaram 16 tipos *spa*, incluindo o novo t16985, cujo isolado foi obtido de uma amostra de alface. Pelo nosso conhecimento o presente estudo foi o segundo a identificar este tipo *spa* em um isolado de *S. aureus* (isolado S7), o qual foi proveniente de salada de batata com maionese.

Os outros tipos *spa* identificados neste estudo foram o t267 (isolados S3 e S6), previamente reportado em isolados de *S. aureus* provenientes de mastite em bovinos e ovinos (Johler et al., 2011; Merz et al., 2016), assim como de leite e queijo (Johler et al., 2018). Além disso, foi identificado os tipos *spa* t097 (isolado S13), t253 (isolado S11), t254 (isolado S10), t1094 (isolado S9), t2389 (isolado S8), os quais todos têm sido relacionados com isolados de *S. aureus* resistentes a meticilina, clínicos ou de indivíduos portadores assintomáticos (Smith & Pearson, 2011; Ben Said et al., 2017; Kadariya et al., 2019).

O sistema acessório de regulação gênica (*agr*) de *S. aureus* é responsável pelo controle da expressão de diversos genes que codificam fatores de virulência, incluindo os genes das enterotoxinas (Tan et al., 2018). Existem quatro diferentes grupos *agr*,

devido a polimorfismos na sequência de aminoácidos dos genes *agrC* e *agrD*. Neste estudo, foram identificados, dois grupos *agr* dentre os isolados. O grupo *agr* II foi detectado apenas em um isolado (S10), sendo o grupo *agr* III o mais prevalente (30,76%), identificado nos isolados S7, S11, S12 e S13. Além disso, foi observado que entre os isolados pertencentes ao grupo *agr* III, dois também carregavam os genes *seln* (S11, S13) e três os genes *sei* (S11, S12, S13), o que indica que existe associação entre isolados pertencente a esse grupo *agr* e a produção de enterotoxinas, conforme descrito por Collery et al. (2009). Destaca-se que o grupo *agr* III também tem sido relacionado com isolados de *S. aureus* provenientes de mastite (Hennekinne et al., 2012; Kroning et al., 2018), com a formação de biofilme (Silva et al., 2017; Kernberger-Fischer et al., 2018) e com a presença da exotoxina TSST-1, responsável pela síndrome de choque tóxico (Jarraud et al., 2000)

O *cluster egc* foi descrito pela primeira vez por Jarraud et al. (2001), e compreendia, inicialmente, cinco genes de enterotoxinas (*selo*, *selm*, *sei*, *seln* e *seg*) e dois pseudogenes (*Ψent1*, *Ψent2*). Posteriormente, foram descritos polimorfismos e variações gênicas, observando-se a presença de outros genes, resultantes de eventos de recombinação (Letertre et al., 2003; Thomas et al., 2006). Atualmente, são descritas 4 variações do *cluster egc* (Collery et al., 2009; Zhang et al., 2013). Neste estudo, houve amplificação do fragmento *egc* parcial em um isolado (S11), porém, este possuía apenas os genes *sei* e *seln*, como já relatado anteriormente (Smyth et al., 2005; Zocche et al., 2010; Viçosa et al., 2013; Zhang et al., 2013; Wang et al., 2017a). Na detecção dos genes individuais do *cluster egc* observou-se que os três isolados carregavam o gene *sei* (S11, S12, S13). Jarraud et al. (2001) descrevem que os genes *seg* e *sei* coexistem no *cluster egc*, no entanto, *sei* já foi identificado separadamente de *seg* em *S. aureus* provenientes de mastite bovina (Ahmady & Kazemi, 2013) e de leite e queijo (Viçosa et al., 2013). Assim, os resultados deste estudo reforçam a hipótese de que o gene *sei* pode ser carregado em outro elemento genético, o qual não carrega o gene *seg*. Por outro lado, três isolados de *S. aureus* portavam apenas o gene *seln*, o que também foi observado em isolados de *S. aureus* provenientes de alimentos de origem animal (Zocche et al., 2010), assim como em isolados clínicos (Becker et al., 2004) e de vegetais (Wu et al., 2018).

Todos os isolados avaliados foram resistentes à penicilina, o que já foi reportado em outros estudos com isolados de *S. aureus* provenientes de alimentos ou surtos alimentares (Colombari et al., 2007; Li et al., 2015a; Kroning et al., 2016; Wang et al.,

2017b; Ma et al., 2018). Por outro lado, quatro isolados também apresentaram resistência fenotípica à sulfonamida. Em outros estudos realizados no Brasil, Haubert et al. (2017) detectaram resistência a esse antimicrobiano em 65% (20/31) dos isolados de *S. aureus* provenientes de mastite, enquanto Kroning et al. (2016) relataram que 8,4% (1/12) dos isolados de *S. aureus* provenientes de doces artesanais foram resistentes à sulfonamida.

Com relação a detecção dos genes de resistência a antimicrobianos, destaca-se que nem todos os isolados resistentes à penicilina carregavam o gene *blaZ*, o que também foi descrito por Achek et al. (2018), demonstrando que a ausência desse gene não influenciou na produção de β -lactamase, indicando a ocorrência de outro mecanismo de resistência nesses isolados. Da mesma forma, neste estudo observou-se que dois isolados (S1 e S3) portavam o gene *sul2*, porém, nenhum apresentava resistência fenotípica a sulfonamida. Por outro lado, Haubert et al. (2017) observaram ausência dos genes *sul* em isolados de *S. aureus* provenientes de mastite subclínica fenotipicamente resistentes a sulfonamida, enquanto Olonitola et al. (2015) detectaram a presença de genes *sul 1* e *sul 2* em *S. aureus* isolados de cama de aviário sensíveis a sulfametoxazol. O fato que plasmídeos portando esses genes podem se transferir entre bactérias da mesma espécie ou de gêneros diferentes por conjugação e disseminar os genes *sul*, pode contribuir para a resistência a esses antimicrobianos (Jiang et al., 2019).

Dois mecanismos de resistência a tetraciclinas têm sido identificados em *S. aureus*: o efluxo ativo, mediado pelos genes *tetA*, *tetB*, *tetK* e *tetL*, codificados por plasmídeos; e a proteção ribossômica, codificada pelos genes cromossômicos *tetM* e *tetO* (Jensen & Lyon, 2009). Na avaliação fenotípica aos antimicrobianos testados, apenas um isolado (S7) apresentou resistência à tetraciclina, porém, os genes *tet* foram detectados em mais de um isolado avaliado: *tetM* (5/13), *tetB* (3/13), *tetA* (2/13) e *tetK* (1/13). Chajęcka-Wierzchowska et al. (2014), avaliaram *Staphylococcus* spp. provenientes de alimentos prontos para o consumo, e observaram que três isolados que foram fenotipicamente resistentes à tetraciclina, não portavam genes *tet*. Entretanto, Haubert et al. (2017) observaram que isolados de *S. aureus* provenientes de mastite subclínica, foram fenotipicamente sensíveis à tetraciclina, no entanto, carregavam, pelo menos, um gene de resistência a esse antimicrobiano. Da mesma forma, Olonitola et al. (2015) avaliaram isolados de *S. aureus* provenientes de cama

de aviário, e observaram resistência fenotípica à tetraciclina, sem a presença do gene *tetO*.

Um dos mecanismos de aquisição de resistência a macrolídeos envolve modificações do local alvo por uma metilase codificada por um ou mais genes *erm*, o que implica na metilação do gene rRNA 23S e, portanto, na alteração dos locais de ligação desses antimicrobianos. O outro mecanismo inclui várias enzimas, por exemplo, esterases codificadas pelos genes *ereA* e *ereB*, as quais hidrolisam o anel macrocíclico de lactona de eritromicina (Li et al., 2015b). No presente estudo, apesar de não ter sido observada resistência fenotípica aos macrolídeos eritromicina e claritromicina, os genes *ermB* e *ermC* foram detectados em um isolado concomitantemente, enquanto três isolados carregavam o gene *ereB*. Por outro lado, no único isolado que apresentou resistência fenotípica a ambos macrolídeos, não foi detectado nenhum gene de resistência a antimicrobianos. Haubert et al. (2017), detectaram oito isolados de *S. aureus* provenientes de mastite subclínica sensíveis a macrolídeos e que albergavam o gene *ereB*. Esses mesmos autores também detectaram que oito dos doze isolados (66,7%) com resistência fenotípica a esta classe de antimicrobianos não albergavam nenhum gene de resistência aos macrolídeos.

A transferência horizontal ou vertical de elementos genéticos móveis que abrigam genes de resistência é considerada o principal mecanismo de disseminação destes genes (Schmieder & Edwards, 2012). Diferenças entre genótipo e fenótipo de resistência são frequentemente relatadas em bactérias (Fernández-Fuentes et al., 2014) e podem ocorrer devido à presença dos denominados “genes silenciosos”, que são expressos apenas *in vivo*, ou devido ao fato que a detecção por PCR de um único gene dentro de um *operon* pode não identificar a presença de outros genes que são necessários para a expressão fenotípica (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2014).

Os testes de suscetibilidade aos sanitizantes demonstraram que todos os isolados avaliados foram tolerantes ao CB e ao CLX. Zaki et al. (2019) avaliaram isolados de *S. aureus* de origem clínica, e verificaram que 30% apresentaram suscetibilidade reduzida ao CB (MIC > 8 µg.mL⁻¹). Kroning et al. (2020) encontraram que 90,3% dos isolados de *S. aureus* provenientes de leite apresentaram tolerância ao BC, com valores de CIM que variam entre 4 a 8 µg.mL⁻¹ e que 100% foram resistentes ao CLX, com valores de CIM entre 4 a 16 µg.mL⁻¹. Esses resultados são similares aos obtidos neste estudo, no qual os valores da CIM para o CB variaram

entre 4 e 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para CLX. Já Taheri et al. (2016) avaliaram isolados de *S. aureus* resistentes e sensíveis à metilicina, e encontraram valores de CIM de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para CB e de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para CLX.

Verificou-se que existe associação entre a presença dos genes das bombas de efluxo *mepA*, *norA*, *norB* e *smr* e a tolerância ao CB e ao CLX, uma vez que todos os isolados que portavam estes genes, apresentaram tolerância a esses sanitizantes ($p < 0,05$). Várias bombas de efluxo foram descritas em *S. aureus*, codificadas no cromossomo (*norA*, *sepA*, *ImrS* e *mepA*) ou em plasmídeos (*qacAB* e *smr*) (Labreck et al., 2018). Além disso, a prevalência dos genes *mepA* e *norB* (92,3%) e *norA* (76,92%) foi elevada, no entanto, o gene *smr* (15,38%), relacionado com a tolerância a compostos quaternários de amônio, foi detectado somente em dois isolados. Resultados semelhantes foram reportados por Kroning et al. (2020), em isolados de *S. aureus* provenientes de leite, onde os genes *mepA* (77,4%), *norA* (80,6%) e *norB* (100%) foram os mais prevalentes. Já os genes *qacA* e *smr* foram detectados em 9,6% e 3,2% dos isolados, respectivamente, e os genes *qacG*, *qacH* e *qacJ* não foram detectados.

Vários autores relatam a prevalência dos genes *norA*, *norB*, *mepA* e *smr*, em isolados de *S. aureus* de origem clínica, resistentes e sensíveis à metilicina (Conceição et al., 2016; Antiabong et al., 2017; Hassanzadeh et al., 2017; Kernberger-Fischer et al., 2018; Conceição et al., 2021), no entanto, a frequência destes genes é baixa e pouco estudada em isolados de fontes alimentares (Fernández-Fuentes et al., 2014; Ammar et al., 2016). Assim, os resultados deste estudo sugerem que a elevada prevalência de genes de bomba de efluxo em isolados de *S. aureus* de origem alimentar, podem ser devidos à pressão seletiva exercida pelos sanitizantes e antimicrobianos comumente utilizados na indústria alimentar, o que resulta em uma importante vantagem para a persistência desse patógeno nos ambientes e superfícies de manipulação de alimentos.

5. CONCLUSÃO

Os tipos *spa* identificados nos isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, possuem relação genética com isolados humanos, reforçando a importância dos manipuladores como uma fonte de contaminação de *S. aureus* para alimentos. Os isolados pertencentes aos grupos agr II e agr III, estão relacionados com isolados produtores

de enterotoxinas e formadores de biofilme. Por outro lado, os genes do *cluster egc* foi detectada em apenas um isolado. Os isolados apresentam resistência fenotípica e genotípica aos antimicrobianos e sanitizantes testados, o que sugere que o uso excessivo destes produtos na clínica humana e veterinária, bem como na produção de alimentos, contribuem para o surgimento de *S. aureus* apresentando resistência, ou mesmo multirresistência, a esses compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achek, R., Hotzel, H., Cantekin, Z., Nabi, I., Hamdi, T. M., Neubauer, H., & El-Adawy, H. (2018). Emerging of antimicrobial resistance in staphylococci isolated from clinical and food samples in Algeria. *BMC Research Notes*, 11 (1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3762-2>
- Ahmady, M., & Kazemi, S. (2013). Detection of the enterotoxigenic genes (sei,sej) in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis milk in the West Azerbaijan of Iran. *Comparative Clinical Pathology*, 22 (4), 649-654. <https://doi.org/10.1007/s00580-012-1460-3>
- Ammar, A. M., Attia, A. M., Abd El-Hamid, M. I., El-Shorbagy, I. M., & Abd El-Kader, S. A. (2016). Genetic basis of resistance waves among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from milk and meat products in Egypt. *Cellular and Molecular Biology*, 62 (10), 7-15. <https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.10.2.8>
- Antiabong, J. F., Kock, M. M., Bellea, N. M., & Ehlers, M. M. (2017). Diversity of Multidrug Efflux Genes and Phenotypic Evaluation of the In vitro Resistance Dynamics of Clinical *Staphylococcus Aureus* Isolates Using Methicillin; a Model β -lactam. *The Open Microbiology Journal*, 11, 132-141. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010132>
- Bastos, C. P., Bassani, M. T., Mata, M. M., Lopes, G. V., & da Silva, W. P. (2017). Prevalence and expression of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning outbreaks. *Canadian Journal of Microbiology*, 63 (10), 834-840. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0316>
- Becker, K., Friedrich, A. W., Peters, G., & von Eiff, C. (2004). Systematic survey on the prevalence of genes coding for staphylococcal enterotoxins SEIM, SEIO, and SEIN. *Molecular Nutrition & Food Research*, 48 (7), 488-495. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400044>
- Ben Said, M., Abbassi, M. S., Gómez, P., Ruiz-Ripa, L., Sghaier, S., El Fekih, O., Hassen, A., & Torres, C. (2017). Genetic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from nasal samples of healthy ewes in Tunisia. High prevalence of CC130 and CC522 lineages. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 51, 37-40. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.03.002>
- Bibalan, M. H., Shakeri, F., Javid, N., Ghaemi, A., & Ghaemi, E. A. (2014). Accessory gene regulator types of *Staphylococcus aureus* isolated in Gorgan, North of Iran. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8 (4), DC07. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/6971.4219>

- Brasil. (2019). Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. In. Brasil Ministerio de Saude.
- CLSI, C. (2016). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Lab Standards Institute*.
- Colombari, V., Mayer, M. D., Laicini, Z. M., Mamizuka, E., Franco, B. D., Destro, M. T., & Landgraf, M. (2007). Foodborne outbreak caused by *Staphylococcus aureus*: phenotypic and genotypic characterization of strains of food and human sources. *Journal of Food Protection*, 70 (2), 489-493. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.2.489>
- Collery, M. M., Smyth, D. S., Tumilty, J. J. G., Twohig, J. M., & Smyth, C. J. (2009). Associations between enterotoxin gene cluster types egc1, egc2 and egc3, agr types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 58 (Pt 1), 13-25. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.005215-0>
- Conceição, T., Coelho, C., de Lencastre, H., & Aires-de-Sousa, M. (2016). High prevalence of biocide resistance determinants in *Staphylococcus aureus* isolates from three African countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60 (1), 678-681. <https://doi.org/10.1128/AAC.02140-15>
- Conceição, T., de Lencastre, H., & Aires-de-Sousa, M. (2021). Prevalence of biocide resistance genes and chlorhexidine and mupirocin non-susceptibility in Portuguese hospitals during a 31-year period (1985-2016). *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 24, 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.12.010>
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Nalepa, B., Sierpińska, M., & Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2014). Retail ready-to-eat food as a potential vehicle for *Staphylococcus* spp. harboring antibiotic resistance genes. *Journal of Food Protection*, 77 (6), 993-998. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-466>
- Denayer, S., Delbrassinne, L., Nia, Y., & Botteldoorn, N. (2017). Food-borne outbreak investigation and molecular typing: high diversity of *Staphylococcus aureus* strains and importance of toxin detection. *Toxins*, 9 (12), 407. <https://doi.org/10.3390/toxins9120407>
- Donaghy, J. A., Jagadeesan, B., Goodburn, K., Grunwald, L., Jensen, O. N., Jespers, A., Kanagachandran, K., Lafforgue, H., Seefelder, W., & Quentin, M.-C. (2019). Relationship of sanitizers, disinfectants, and cleaning agents with antimicrobial resistance. *Journal of Food Protection*, 82 (5), 889-902. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-373>.
- EFSA. (2013). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal*, 11 (5), 3196.
- EFSA. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16 (12), 05500.
- Fernández-Fuentes, M. A., Abriouel, H., Ortega Morente, E., Pérez Pulido, R., & Gálvez, A. (2014). Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.032>
- Ghaznavi-Rad, E., & Ekrami, A. (2018). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates, isolated from a Burn Hospital in

- southwest Iran in 2006 and 2014. *International Journal of Microbiology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1423939>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In C. S. H. L. Press (Ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.): Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hanson, B., Dressler, A., Harper, A., Scheibel, R., Wardyn, S., Roberts, L., Kroeger, J., & Smith, T. (2011). Prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health*, 4 (4), 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2011.06.001>
- Hassanzadeh, S., Mashhadi, R., Yousefi, M., Askari, E., Saniei, M., & Pourmand, M. R. (2017). Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. *Microbial Pathogenesis*, 111, 71-74. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.026>
- Haubert, L., Kroning, I., Iglesias, M., & Padilha, W. (2017). First report of the Staphylococcus aureus isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene dfrG and transposon family Tn916-1545. *Microbial Pathogenesis*, 113, 242-247. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.022>
- Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.-L., & Dragacci, S. (2012). Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (4), 815-836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>
- Jarraud, S., Lyon, G., Figueiredo, A., Gérard, L., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T., & Novick, R. (2000). Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, 182 (22), 6517-6522. <https://doi.org/10.1128/jb.182.22.6517-6522.2000>
- Jarraud, S., Peyrat, M. A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M., & Lina, G. (2001). egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in Staphylococcus aureus. *The Journal of Immunology*, 166 (1), 669-677. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.669>
- Javdan, S., Narimani, T., Abadi, M. S. S., & Gholipour, A. (2019). Agr typing of Staphylococcus aureus species isolated from clinical samples in training hospitals of Isfahan and Shahrekord. *BMC Research Notes*, 12 (1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4396-8>
- Jensen, S. O., & Lyon, B. R. (2009). Genetics of antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus. *Future Microbiology*, 4 (5), 565-582. https://doi.org/10.1007/82_2016_3
- Jia, K., Fang, T., Wang, X., Liu, Y., Sun, W., Wang, Y., Ding, T., Wang, J., Li, C., & Xu, D. (2019). Antibiotic Resistance Patterns of Staphylococcus aureus Isolates from Retail Foods in Mainland China: A Meta-Analysis. *Foodborne Pathogens and Disease*. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2686>
- Jiang, H., Cheng, H., Liang, Y., Yu, S., Yu, T., Fang, J., & Zhu, C. (2019). Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (sul1, sul2, and sul3) in Escherichia coli Isolates From Penaeus vannamei and Pork From Large Markets in Zhejiang, China. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1787. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01787>

- Jiménez, J. N., Ocampo, A. M., Vanegas, J. M., Rodriguez, E. A., Mediavilla, J. R., Chen, L., Muskus, C. E., Vélez, L. A., Rojas, C., & Restrepo, A. V. (2012). CC8 MRSA strains harboring scc mec type ivc are predominant in Colombian hospitals. *PLoS One*, 7 (6), e38576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038576>
- Johler, S., Layer, F., & Stephan, R. (2011). Comparison of virulence and antibiotic resistance genes of food poisoning outbreak isolates of *Staphylococcus aureus* with isolates obtained from bovine mastitis milk and pig carcasses. *Journal of Food Protection*, 74 (11), 1852-1859. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-11-192>
- Johler, S., Macori, G., Bellio, A., Acutis, P. L., Gallina, S., & Decastelli, L. (2018). Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. *Journal of Dairy Science*, 101 (4), 2915-2920. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13815>
- Kadariya, J., Thapaliya, D., Bhatta, S., Mahatara, R. L., Bempah, S., Dhakal, N., & Smith, T. C. (2019). Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Healthy Adults Is more Common in Bhutanese Refugees in Nepal than Those Resettled in Ohio. *BioMed Research International*, 2019, 5739247. <https://doi.org/10.1155/2019/5739247>
- Kernberger-Fischer, I. A., Krischek, C., Strommenger, B., Fiegen, U., Beyerbach, M., Kreienbrock, L., Klein, G., & Kehrenberg, C. (2018). Susceptibility of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates of various clonal lineages from Germany to eight biocides. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (13). <https://doi.org/10.1128/AEM.00799-18>
- Kroning, I., Haubert, L., Rauber, N., Barcellos, I., Klein, L., Ramires, T., & Padilha, W. (2020). New spa types, resistance to sanitisers and presence of efflux pump genes in *Staphylococcus aureus* from milk. *International Dairy Journal*, 109, 104712. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104712>
- Kroning, I., Iglesias, M., Sehn, C., Gandra, T., Mata, M., & da Silva, W. (2016). *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. *Food Microbiology*, 58, 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.04.001>
- Kroning, I. S., Iglesias, M. A., Mendonça, K. S., Lopes, G. V., & Silva, W. P. (2018). Presence of Classical Enterotoxin Genes, agr Typing, Antimicrobial Resistance, and Genetic Diversity of *Staphylococcus aureus* from Milk of Cows with Mastitis in Southern Brazil. *Journal of Food Protection*, 81 (5), 738-742. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-17-436>
- LaBreck, P. T., Rice, G. K., Paskey, A. C., Elassal, E. M., Cer, R. Z., Law, N. N., Schlett, C. D., Bennett, J. W., Millar, E. V., Ellis, M. W., Hamilton, T., Bishop-Lilly, K. A., & Merrell, D. S. (2018). Conjugative Transfer of a Novel Staphylococcal Plasmid Encoding the Biocide Resistance Gene, qacA. *Frontiers in Microbiology*, 9 (2664). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02664>
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., & Fach, P. (2003). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95 (1), 38-43. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01957.x>
- Li, G., Wu, S., Luo, W., Su, Y., Luan, Y., & Wang, X. (2015). *Staphylococcus aureus* ST6-t701 isolates from food-poisoning outbreaks (2006–2013) in Xi'an, China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12 (3), 203-206. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1850>

- Li, L., Feng, W., Zhang, Z., Xue, H., & Zhao, X. (2015). Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes and genotypes of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine mastitis. *BMC Veterinary Research*, *11*, 168-175. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0492-8>
- Ma, Y., Zhao, Y., Tang, J., Tang, C., Chen, J., & Liu, J. (2018). Antimicrobial susceptibility and presence of resistance & enterotoxins/enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *CyTA-Journal of Food*, *16* (1), 76-84. <https://doi.org/10.1111/lam.12735>
- Merz, A., Stephan, R., & Johler, S. (2016). *Staphylococcus aureus* isolates from goat and sheep milk seem to be closely related and differ from isolates detected from bovine milk. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 319. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00319>
- Olonitola, O. S., Fahrenfeld, N., & Pruden, A. (2015). Antibiotic resistance profiles among mesophilic aerobic bacteria in Nigerian chicken litter and associated antibiotic resistance genes. *Poultry Science*, *94* (5), 867-874. <https://doi.org/10.3382/ps/pev069>
- Ono, H. K., Hirose, S., Naito, I., Sato'o, Y., Asano, K., Hu, D. L., Omoe, K., & Nakane, A. (2017). The emetic activity of staphylococcal enterotoxins, SEK, SEL, SEM, SEN and SEO in a small emetic animal model, the house musk shrew. *Microbiology and Immunology*, *61* (1), 12-16. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12460>
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiology*, *7* (1), 73-89. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.135>
- Seier-Petersen, M. A., Nielsen, L. N., Ingmer, H., Aarestrup, F. M., & Agerso, Y. (2015). Biocide susceptibility of *Staphylococcus aureus* CC398 and CC30 isolates from pigs and identification of the biocide resistance genes, *qacG* and *qacC*. *Microbial Drug Resistance*, *21* (5), 527-536. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0215>
- Shopsin, B., Mathema, B., Alcabes, P., Said-Salim, B., Lina, G., Matsuka, A., Martinez, J., & Kreiswirth, B. (2003). Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *Journal of Clinical Microbiology*, *41* (1), 456-459. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.1.456-459.2003>
- Silva, J. F. M., Feitosa, A. C., & Rodrigues, R. M. (2017). *Staphylococcus aureus* em alimentos. *DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins*, *4* (4), 15-31. <https://doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2017v4n4p15>
- Singh, G., Broor, S., & Agarwal, P. (2018). Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* using spa typing as a diagnostic tool in Haryana, India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *36* (1), 26. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_17_330
- Smith, T. C., & Pearson, N. (2011). The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *11* (4), 327-339. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0072>
- Smyth, D. S., Hartigan, P. J., Meaney, W. J., Fitzgerald, J. R., Deobald, C. F., Bohach, G. A., & Smyth, C. J. (2005). Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPI_{bov} are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *Journal of Medical Microbiology*, *54* (4), 401-411. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45863-0>

- Taheri, N., Ardebili, A., Amouzandeh-Nobaveh, A., & Ghaznavi-Rad, E. (2016). Frequency of antiseptic resistance among *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from a university hospital in central Iran. *Oman Medical Journal*, 31 (6), 426. <https://doi.org/10.5001/omj.2016.86>
- Tan, L., Li, S. R., Jiang, B., Hu, X. M., & Li, S. (2018). Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (agr) System. *Frontiers in Microbiology*, 9 (55). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00055>
- Thomas, D., Jarraud, S., Lemercier, B., Cozon, G., Echasserieu, K., Etienne, J., Gougeon, M.-L., Lina, G., & Vandenesch, F. (2006). Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infection and Immunity*, 74 (8), 4724-4734. <https://doi.org/10.1128/IAI.00132-06>
- Thompson, T. A., & Brown, P. D. (2017). Association between the agr locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* model. *International Journal of Infectious Diseases*, 54, 72-76. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.411>
- Viçosa, G. N., Le Loir, A., Le Loir, Y., de Carvalho, A. F., & Nero, L. A. (2013). egc characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates obtained from raw milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 165 (3), 227-230. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.023>
- Wang, D., Zhang, L., Yong, C., Shen, M., Ali, T., Shahid, M., Han, K., Zhou, X., & Han, B. (2017). Relationships among superantigen toxin gene profiles, genotypes, and pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 100 (6), 4276-4286. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12405>
- Wang, W., Baloch, Z., Jiang, T., Zhang, C., Peng, Z., Li, F., Fanning, S., Ma, A., & Xu, J. (2017). Enterotoxigenicity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from retail food in China. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2256. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02256>
- Wang, X., Wang, X., Wang, Y., Guo, G., Usman, T., Hao, D., Tang, X., Zhang, Y., & Yu, Y. (2014). Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. *Letters in Applied Microbiology*, 58 (6), 527-534. <https://doi.org/10.1111/lam.12221>
- Wattinger, L., Stephan, R., Layer, F., & Jöhler, S. (2012). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates associated with food intoxication with isolates from human nasal carriers and human infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31 (4), 455-464. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1330-y>
- WHO. (2019). Global action plan on antimicrobial resistance 2015. In. Switzerland WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, F., Zhang, J., Lei, T., Chen, M., Ding, Y., & Xue, L. (2018). Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated From Retail Vegetables in China. *Frontiers in Microbiology*, 9 (1263). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01263>
- Zaki, M. E. S., Bastawy, S., & Montasser, K. (2019). Molecular study of resistance of *Staphylococcus aureus* to antiseptic quaternary ammonium compounds. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 17, 94-97. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.11.022>
- Zhang, C., Shen, Y., & Dong, M. (2013). Distribution, polymorphism and temporal expression of egc in *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in

- China. *Food Control*, 29 (1), 279-285.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.024>
- Zocche, F., Bastos, C. P., & Silva, W. P. d. (2010). Detecção de genes do cluster egc em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal. *Ciência Rural*, 40 (5), 1134-1140. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000500021>

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados para a detecção dos grupos agr

Gene	Sequência (5'–3')	PB	Referência
<i>Pan-agr</i>	R:ATGCACATGGTGACATGC		
<i>agr I</i>	F:GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	440	Shopsin et al. (2003)
<i>agr II</i>	F:GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	572	
<i>agr III</i>	F:CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC	406	
<i>agr IV</i>	F:CGATAATGCCGTAATACCCG	588	

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados para a detecção dos genes do *cluster egc*

Gene	Sequência (5'–3')	pb	Referência
<i>egc</i> parcial	F: GACAACAAAAGTGTGCGAAACTG R: CCAGATTCAAATGCAGAACC	3375	Zocche (2008)
<i>seg</i>	F: GTTAGAGGAGGTTTTATG R: TTCCTTCAACAGGTGGAGA	198	Viçosa (2012)
<i>sei</i>	F: GGCCACTTTATCAGGACA R: AACTTACAGGCAGTCCA	572	
<i>selm</i>	F: CCAATTGAAGACCACCAAAG R: CTTGTCCTGTTCCAGTATCA	517	Blaiotta et al. (2004)
<i>seln</i>	F: ATTGTTCTACATAGCTGCAA R: TTGAAAAAACTCTGCTCCCA	682	
<i>selo</i>	F: AGTCAAGTGTAGACCCTATT R: TATGCTCCGAATGAGAATGA	534	

Tabela 3. *Primers* utilizados para a identificação de genes de resistência a antimicrobianos e a sanitizantes

Gene	Sequência (5'–3')	pb	Referência
<i>qacA</i>	F: ACTACTGATATGATGACATCA	1512	Mereghetti et al. (2000)
	R: AGTTATATCAAGTGATTTGGG		
<i>smr</i>	F: ATAGCCATAAGTACTGAAGTT	291	
	R: ACCGAAAATGTTTAACGAAAC		
<i>qacG</i>	F: CAACAGAAATAATCGGAACT	670	
	R: TACATTTAAGAGCACTACA		
<i>qacH</i>	F: ATAGTCAGTGAAGTAATAG	550	Taheri et al. (2016)
	R: AGTGTGATGATCCGAATGT		
<i>qacJ</i>	F: CTTATATTTAGTAATAGCG	667	
	R: GATCCAAAAACGTTAAGA		
<i>norA</i>	F: TTCACCAAGCCATCAAAAAG	620	
	R: CTTGCCTTTCTCCAGCAATA		
<i>norB</i>	F: AGCGCGTTGTCTATCTTTCC	213	Hassanzadeh et al. (2017)
	R: GCAGGTGGTCTTGCTGATAA		
<i>mepA</i>	F: ATGTTGCTGCTGCTCTGTTC	718	
	R: TCAACTGTCAAACGATCACG		
<i>ereB</i>	F: AGAAATGGAGGTTCCATACTTACCA	546	Sutcliffe et al. (1996)
	R: CATATAATCATCACCAATGGCA		

<i>ermB</i>	F: CATTTAACGACGAAACTGGC R: GGAACATCTGTGGTATGGCG	424	Aarestrup (1999)
<i>ermC</i>	F: AATCGTCAATTCCTGCATGT R: TAATCGTGGAATACGGGTTTG	299	Strommenger et al. (2003)
<i>tetA</i>	R: GTAATTCTGAGCACTGT R: CCTGGACAACATTGCTT	953	French (2006)
<i>tetB</i>	F: ACGTTACTCGATGCCAT R: AGCACTTGTCTCCTGTT	1169	
<i>tetK</i>	F: GTAGCGACAATAGGTAATAGT R: GTAGTGACAATAAACCTCCTA	360	Strommenger et al. (2003)
<i>tetM</i>	F: AGTGGAGCGATTACAGAA R: CATATGTCCTGGCGTGTCTA	158	
<i>tetL</i>	F: CAAACTGGGTGAACACTG R: CCTGTTCCCTCTGATAAA	1028	Pang et al. (1994)
<i>tetO</i>	F: AATGAAGATTCCGACAATTT R: CTCATGCGTTGTAGTATTCCA	781	Li et al. (2007)
<i>strA</i>	F: TGA CTGGTTGCCTGTCAGAGG R: CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGCA	645	Kehrenberg & Schwarz (2001)
<i>strB</i>	F: ATCGTCAAGGGATTGAAACC R: GGATCGTAGAACATATTGGC	510	Kikuvu et al. (2007)
<i>sul1</i>	F: TGGTGACGGTGTTTCGGCATTCTG R: TAGGCATGATCTAACCCCTCGGTCT	884	Grape et al. (2003)
<i>sul2</i>	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R: GCGTTTGATACCGGCACCCGT	23	Kern et al. (2002)
<i>blaZ</i>	F: ACTTCAACACCTGCTGCTTTC R: TGACCACTTTTATCAGCAACC	172	Martineau et al. (2000)
<i>mecA</i>	F: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC R: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533	Murakami et al. (1991)

4.2 MANUSCRITO 2 – Avaliação da atividade antimicrobiana e capacidade de remoção de biofilme de *Staphylococcus aureus* formado sobre aço inoxidável de óleo essencial de *Piper elongatum* (vahl) e *Mintosthachys setosa* (briq)

Manuscrito a ser submetido ao periódico LWT Food Science and Technology

Fator de Impacto: [4.006](#)

Avaliação da atividade antimicrobiana e capacidade de remoção de biofilme de *Staphylococcus aureus* formado sobre aço inoxidável de óleo essencial de *Piper elongatum* (vahl) e *Mintosthachys setosa* (briq)

Liseth Pamela Peralta-Canchis^a; Thais Larre Oliveira^a, Isabela Schneid Kroning^b;
Ângela Maria Fiorentini^b; Graciela Volz Lopes^b; Wladimir Padilha da Silva^{a,b*}

^aNúcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

E-mail: Lpc_07@hotmail.com

^bDepartamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

E-mail: thais.larreoliveira@gmail.com, isabelaschneid@gmail.com,
angefiore@gmail.com, gracielavlopes@yahoo.br

* Autor correspondente:

Wladimir Padilha da Silva

E-mail: silvawp@ufpel.edu.br

RESUMO

As superfícies utilizadas nas indústrias de alimentos podem fornecer um nicho adequado para o desenvolvimento e persistência de micro-organismos organizados em biofilmes, representando uma fonte potencial de contaminação de alimentos. Os objetivos deste estudo foram verificar a capacidade de formação de biofilme em superfície de aço inoxidável por isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, bem como determinar a composição química e avaliar a atividade antimicrobiana e de remoção de biofilme de óleos essenciais (OE) de *Minthostachys setosa* e *Piper elongatum*. Para isso, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos dois OE contra esse micro-organismo. Os dois OE avaliados demonstraram atividade antimicrobiana, com o OE de *M. setosa* apresentando CIM de 120 mg.mL⁻¹ e 280 mg.mL⁻¹ de CBM, e o OE de *P. elongatum*, CIM de 122,85 mg.mL⁻¹ e CBM de 286,67 mg.mL⁻¹. A cromatografia gasosa/espectrometria de massas revelou a pulegona (57,54%) e o cariofileno (7,29%) como os compostos mais abundantes do OE de *M. setosa*, enquanto eucaliptol (10,84%), metil-eugenol (9,29%), β-ocimeno (8,31%) e espatulenol (7,22%), foram os compostos majoritários do OE de *P. elongatum*. Biofilmes de *S. aureus* formado durante 24 h sobre aço inoxidável, em duas temperaturas diferentes (25 e 37 °C), foram expostos a 15 min de contato com diferentes concentrações dos OE (6,25%, 12,5% e 25%), observando-se redução na contagem de células viáveis de até 2,52 UFC.log cm⁻², sendo essa redução concentração e isolado-dependente. A Microscopia Confocal de Varredura a Laser demonstrou que os OE de *P. elongatum* e *M. setosa* apresentaram ação sobre o biofilme pré-formado de *S. aureus* e que à medida que a concentração de OE aumentava maior era a redução de células viáveis no biofilme. Os OE de *P. elongatum* e *M. setosa* apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e, foram capazes de reduzir o número de células viáveis de *S. aureus* em biofilme formado sobre aço inoxidável, demonstrando que têm potencial de utilização na remoção desses biofilmes na indústria de alimentos.

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é o patógeno responsável pela intoxicação alimentar estafilocócica (IAE), uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns no mundo (Who, 2021). Além de ser ubíquo, comensal e oportunista, é capaz de sobreviver em ambientes hostis e formar biofilme (Hennekinne et al., 2012; Paparella et al., 2018).

O biofilme é uma estratégia empregada pelas bactérias para sobreviver em condições ambientais adversas, desenvolvendo uma comunidade de células sésseis caracterizada pela ligação irreversível a um substrato abiótico ou biótico e inserida em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) (Rosenthal et al., 2014). A formação de biofilme por *S. aureus* é um processo complexo que pode ser dividido em três etapas principais: adesão inicial, produção de matriz extracelular e proliferação, estruturação do biofilme e desprendimento de células (Schilcher & Horswill, 2020). O papel da matriz de SPE, composta principalmente por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (eDNA), é proteger as células de fatores ambientais, aumentando sua tolerância à dessecação, pressão osmótica, radiação ultravioleta, sanitizantes e antimicrobianos (Kim et al., 2018).

As superfícies utilizadas na indústria de alimentos para a manipulação, armazenamento ou processamento, são potenciais fontes de contaminação microbiana devido à capacidade de fixação e formação de biofilme microbiano a diferentes tipos de materiais, tais como poliestireno, vidro, borracha e aço inoxidável (Bae et al., 2012; Vázquez-Sánchez et al., 2013; Reis-Teixeira et al., 2017). A aplicação regular de procedimentos de limpeza e sanitização é uma estratégia comumente empregada para controlar a contaminação de superfícies e produtos (Bridier et al., 2015). Entretanto, tais procedimentos podem não ser totalmente eficazes, devido as bactérias presentes no biofilme serem mais resistentes e poderem apresentar capacidade de sobreviver as concentrações usualmente utilizadas de hipoclorito de sódio, sais de amônio quaternário, desinfetantes fenólicos, peróxido de hidrogênio e íons de prata (Campana & Baffone, 2018). A procura por novas substâncias potencialmente ativas contra biofilme bacteriano é uma importante área em desenvolvimento, principalmente as pesquisas visando à utilização de alternativas naturais. Neste contexto, os óleos essenciais (OE), que são compostos obtidos a partir do metabolismo secundário das plantas aromáticas, sintetizados por todos os órgãos vegetais e armazenados em células secretoras ou tricomas glandulares (Burt, 2004;

Bakkali et al., 2008), estão sendo amplamente estudados como alternativas naturais para os sanitizantes utilizados atualmente. Estes compostos têm potencial para controlar biofilmes bacterianos na indústria de alimentos (Carneiro et al., 2020), demonstrando possuir propriedades antimicrobianas sobre células planctônicas e evitando a formação ou removendo biofilme formado sobre diferentes superfícies (Vázquez-Sánchez et al., 2015; Dos Santos Rodrigues et al., 2018).

As espécies *Mintostachys setosa*, conhecida popularmente como muña, planta aromática da família Lamiaceae, e *Piper elongatum*, conhecida como matico, pertencente à família Piperaceae, são plantas cultivadas nos altiplanos andinos (Brack, 1999), e que possuem uma variedade de usos tradicionais, como conservantes de alimentos, digestivo, antiespasmódicos, carminativos, inseticidas e antibacterianos (Otoya, 2020).

Os objetivos deste estudo foram verificar a capacidade de formação de biofilme em superfície de aço inoxidável por isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, bem como avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *Mintostachys setosa* e *Piper elongatum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 13 isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, fornecidos pelo Laboratório de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, previamente caracterizados molecularmente por Bastos et al. (2017) e armazenados à -80 °C até sua reativação em ágar Triptona de Soja (TSA, Acumedia, EUA) e incubação a 37 °C durante 24 h.

2.1 Avaliação da formação de biofilme pelos isolados de *S. aureus* em aço inoxidável

2.1.1 Cupons de aço inoxidável

Os cupons de aço inoxidável (0,366 µm de rugosidade 10 mm × 10 mm × 1 mm), utilizados como superfície para avaliação, foram higienizados individualmente com uma esponja e detergente neutro e, logo após, foram enxaguados com água destilada, imersos em etanol 70% (v/v) por 1 hora e enxaguados novamente com água destilada para, posteriormente, serem autoclavados a 121 °C por 15 min (Parizzi et al., 2004).

2.1.2 Capacidade de formação de biofilme

A formação de biofilme foi avaliada em duas temperaturas (25 e 37 °C), seguindo a metodologia proposta por Andrade et al. (1998), com modificações. A partir de uma cultura de 24 h dos isolados e do controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923), foram preparados inóculos bacterianos em solução salina 0,85% até atingir a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Alíquotas de 1 mL contendo essa concentração bacteriana foram transferidas para tubos contendo 9 mL de caldo Triptona de Soja (TSB, Acumedia®, USA) e os cupons de aço inoxidável. Os tubos foram incubados a 25 e 37 °C por 24 h. Após esse período, os cupons foram transferidos para tubos contendo 5 mL de água peptonada 0,1% (AP, Oxoid®, UK), e ficaram imersos em repouso por 1 min para remover as células planctônicas ou não aderidas. Logo após, os cupons foram transferidos para tubos contendo 10 mL de AP 0,1%, e submetidos à agitação em vortex por 2 min para a remoção das células sésseis ou aderidas. Posteriormente, foram realizadas diluições decimais seriadas em microtubos contendo 0,9 mL de AP 0,1%, e cada diluição foi semeada em placas contendo ágar TSA, as quais foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Após este período, as células viáveis foram contadas e os resultados foram expressos em Log UFC.cm⁻². Os testes foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes.

2.2 Análise da composição química dos óleos essenciais de *M.setosa* e *P. elongatum* por Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectrômetro de Massas (GC-MS)

Foram avaliados OE de *M. setosa* e de *P. elongatum* adquiridos comercialmente (Pukllay Herbolaria EIRL, Cusco, Peru). Os OE foram obtidos pelo método de destilação a vapor das folhas secas das plantas. A composição química foi determinada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS -QP 2010SE-Shimadzu®, Tóquio, Japão), equipado com uma coluna capilar Rxi-1MS (Restek) (30 mm x 0,32 mm x 0,25 µm). A temperatura da fonte de íons e interface foi ajustada em 200 °C, e a faixa de varredura de massas foi de 40 a 450 m/z e 0,2 escaneamentos por segundo. Foi utilizado hélio como gás de arraste, a um fluxo de 1.08 mL min⁻¹. A temperatura do forno foi programada partindo de 60 °C por 1 min, seguido de um aumento de 5 °C por min até 180 °C, na qual foi mantida por 1 min. A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos índices de similaridade e espectro de massas em comparação com a biblioteca do espectro de massas do National Institute of Standards and Technology (NIST, 2011), índice de retenção

(NIST11s.lib) e índice de retenção calculado a partir de uma série de hidrocarbonetos C8-C20 (Van den Dool e Kratz, 1963). A quantificação de cada composto foi expressa por porcentagem relativa.

2.3 Avaliação de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *M. setosa* e *P. elongatum*

A atividade antimicrobiana dos OE foi avaliada qualitativamente, pela técnica de difusão em ágar e, quantitativamente, pela concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). A técnica de difusão em ágar foi realizada de acordo com o (Clsi, 2016). Os inóculos bacterianos foram preparados na escala padrão 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) e, posteriormente, semeados em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (MH, Kasvi, Brasil). Discos esterilizados de papel filtro foram colocados na superfície do meio e impregnados com 10 µL dos OE puros. Como controles positivo e negativo foram usados discos de oxacilina (1 µg) (Laborclin, Brasil) e água destilada (10 µL), respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A formação de halos de inibição ao redor dos discos indicou atividade antimicrobiana e foi medida em milímetros (mm). Foram realizadas duas repetições do teste em duplicata.

A CIM de cada OE foi testada pelo método de microdiluição em placa (Clsi, 2016). Em cada poço da placa, foram adicionados 50 µL de caldo Muller Hinton (MH, Kasvi, Brasil) acrescido de 1% do surfactante Tween 80 (Sigma®, EUA). Foram realizadas diluições decimais de base dois dos OE variando de 25% a 0,19%. Imediatamente, adicionou-se 50 µL do inóculo, padronizado na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Como controle negativo, foi utilizado meio de cultura e, como controle positivo, meio de cultura com inóculo bacteriano (sem adição de OE). Também foi feito o controle de esterilidade de cada OE. Os testes foram realizados em triplicata com três repetições para cada isolado. Após o período de incubação, 10 µL do reagente revelador Resazurina (Êxodo®, Brasil), foram adicionados em cada poço da placa, a qual foi posteriormente incubada a 37 °C por 2 horas, a alteração da cor azul para rosa indicou atividade celular. Para a determinação da CBM, 10 µL de cada poço que não apresentou multiplicação bacteriana aparente foram semeados em placas de ágar TSA e incubados a 37 °C por 24 h. A ação bactericida foi determinada através da ausência ou presença de multiplicação bacteriana, onde concentrações do OE onde

não ocorreu multiplicação bacteriana foram consideradas com ação bactericida. O teste foi realizado em triplicata e com três repetições para cada isolado (Clsi, 2016).

2.4 Avaliação do efeito dos óleos essenciais de *M. setosa* e *P. elongatum* sobre biofilme de *S. aureus* pré-formado em aço inoxidável

A avaliação da ação dos OE sobre o biofilme pré-formado de *S. aureus* em aço inoxidável, foi realizada com dois isolados selecionados, utilizando-se como critérios: i) sua habilidade de formação de biofilme e a presença dos genes do cluster *ica* (isolado S7); e, ii) sua habilidade de formação de biofilme independentemente da presença dos genes do cluster *ica* (isolado S13). A determinação da presença dos genes do cluster *ica* nos isolados foi realizada previamente por Maia et al. (2020). A ação antibiofilme dos OE foi avaliada em biofilmes formados a 25 °C e 37 °C, nas concentrações de ½ CIM, CIM e 2X CIM, determinados na avaliação da CIM de cada OE (item 3).

Foram preparadas soluções dos OE em água destilada contendo 1% do surfactante Tween 80 (Sigma®). Após a formação de biofilme por *S. aureus* em 24 h, os cupons de aço inoxidável foram transferidos para tubos contendo 5 mL de água peptonada 0,1% (AP, Oxoid®), e ficaram imersos em repouso por 1 min, para remoção de células planctônicas. Logo após, foram transferidos para tubos contendo 2 mL das soluções de cada OE nas concentrações a serem testadas (½ CIM, CIM e 2X CIM), e ficaram imersos durante 15 min. Após, foram colocados em tubos contendo 3 mL de tiosulfato de sódio 0,1 M por 1 min, para neutralizar a ação da solução de OE (Veras et al., 2014). Posteriormente, foram transferidos para tubos contendo 10 mL de AP 0,1%, e submetidos a agitação em vortex por 2 min, para remoção de células sésseis. Finalmente, foram realizadas diluições decimais seriadas em microtubos contendo 0,9 mL de AP 0,1%, e cada diluição foi semeada em placas de Petri contendo ágar TSA, e incubadas a 37 °C durante 24 h. Após este período, as células viáveis foram contadas e os resultados foram expressos em log UFC.cm⁻². Os testes foram realizados em triplicata.

2.5 Avaliação da atividade dos OE em biofilmes pré-formados de *S. aureus* por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

Após os tratamentos realizados com as diferentes concentrações avaliadas de ambos OE, as células aderidas aos cupons de aço inoxidável foram coradas com o kit

de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight® (Invitrogen, EUA) por 15 min (Joshi et al., 2010). A diferenciação de células viáveis (membrana intacta) e não viáveis (membrana danificada) ocorre pelos marcadores fluorescentes do kit Syto 9 (verde fluorescente) e iodeto de propídeo (vermelho fluorescente). A estrutura do biofilme foi observada por microscopia de fluorescência (Leica TCS SP8), com ocular de 10X e objetiva de 63X em óleo de imersão. As imagens foram adquiridas também no eixo Z com uma profundidade de 20 µm – 20 fatias de 1 µm cada. Todas as imagens foram analisadas utilizando o software LAS X 3 D Analysis (Leica Microsystems, Nussloch GmbH 2019, EUA) para determinar a percentagem de células vivas (verde) e células mortas (vermelho).

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). A formação de biofilme log UFC.cm⁻²) dos 13 isolados de *S. aureus*, bem como do controle (*S. aureus* ATCC 25923), foram analisadas pelo teste de t, comparando a formação de biofilme a 25 °C e 37 °C, em cada isolado.

O efeito do tratamento com diferentes concentrações de OE e temperaturas (25 °C e 37 °C) sobre a contagem de células viáveis (log UFC.cm⁻²) nos biofilmes de cada isolado selecionado (S7 e S13) foi avaliado através de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para comparação das médias. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Capacidade de formação de biofilme

A temperatura influenciou significativamente ($p < 0.05$) a capacidade de formação de biofilme pelos isolados avaliados, sendo que a formação foi significativamente maior a 37 °C do que a 25 °C, com exceção dos isolados S3, S7 e do controle *S. aureus* ATCC 25923 ($p > 0.05$).

Na temperatura de 25 °C observou-se diferença significativa na capacidade de formação de biofilme entre todos os isolados ($p < 0.05$). O isolado S13 apresentou a maior média de formação de biofilme (7,10 log UFC.cm⁻²), por outro lado, os isolados S5 e S6 apresentaram menor concentração bacteriana aderida aos cupons (6,06 log

UFC.cm⁻²), apresentando diferença significativa ($p < 0.05$) dos demais isolados, cujas contagens variaram entre 6,50 e 7,05 log UFC.cm⁻². A 37 °C também se observou diferença significativa ($p < 0.05$) entre os isolados, com o isolado S13 apresentando a maior média de formação de biofilme (7,32 log UFC.cm⁻²). Os isolados S7 e S3 apresentaram uma média menor (6,62 e 6,87 log UFC.cm⁻², respectivamente), nas contagens de células aderidas aos cupons, quando comparadas as dos demais isolados, que variaram entre 7,05 e 7,24 log UFC.cm⁻², com diferença significativa ($p < 0.05$) entre eles.

3.2 Composição química dos óleos essenciais de *M. setosa* e de *P. elongatum*

Com base nos resultados obtidos por GC-MS referentes à composição química dos OE avaliados, observou-se que no OE de *M. setosa* foram identificados 39 compostos (Tabela 1), das classes dos monoterpenos, monoterpenóides, sesquiterpenóides, éter e éster. A pulegona foi o monoterpenóide majoritário encontrado, o qual representou 57,54% dos compostos identificados nesse OE (Tabela 1). O segundo composto encontrado em maior quantidade foi o cariofileno (sesquiterpeno), representando 7,29%, e os demais compostos encontrados apresentaram percentagem relativa que variaram de 4,91 a 0,08%.

No OE de *P. elongatum* foram identificados 54 compostos (Tabela 2), sendo que o eucaliptol (monoterpenóide) representou 10,84% dos compostos, seguido do metil-eugenol (9,29%), β -ocimeno (8,31%) e espatulenol (7,22%) (Tabela 2).

3.3 Atividade antimicrobiana dos dois óleos essenciais avaliados

A avaliação qualitativa *in vitro* da atividade antimicrobiana demonstrou que os 13 isolados utilizados foram sensíveis a ambos OE. O OE de *M. setosa* apresentou halos de inibição que variaram de 15 a 18,5 mm, enquanto o OE de *P. elongatum*, apresentou halos de inibição entre 15 e 17,5 mm (Tabela 3). A CIM do OE de *M. setosa* foi de 120 mg.mL⁻¹, enquanto a do OE de *P. elongatum* foi de 122,85 mg.mL⁻¹. Em relação à CBM, observou-se que apenas as maiores concentrações do OE de *M. setosa* e de *P. elongatum* (280 mg.mL⁻¹ e 286,67 mg.mL⁻¹, respectivamente) apresentaram atividade antimicrobiana.

3.4 Atividade dos OE avaliados sobre o biofilme pré-formado de *S. aureus*

A atividade dos OE contra células de *S. aureus* em biofilme previamente formado foi avaliada nos isolados S7 e S13, os quais foram selecionados de acordo com os critérios estabelecidos no item 4 (Material e Métodos).

O tratamento com OE de *P. elongatum* nos biofilmes formados nas temperaturas avaliadas (25 e 37 °C) reduziu o número de células viáveis no biofilme de *S. aureus* em aço inoxidável para ambos isolados S7 ($p < 0,0001$) e S13 ($p < 0,0001$), e em ambas temperaturas (Figura 2).

A contagem de células viáveis do isolado S7 no biofilme formado a 25 °C, sem adição do OE de *P. elongatum*, foi de 6,62 log UFC.cm⁻² (Figura 2) e, após o tratamento com ½ CIM (6,25%) do OE, não houve redução significativa na contagem em comparação com o controle ($p > 0,05$). Quando a concentração do OE foi aumentada e utilizou-se a CIM (12,5%), houve redução de 0,85 log UFC.cm⁻² na contagem de células viáveis de *S. aureus*, quando comparado ao tratamento controle ($p < 0,05$), e utilizando-se 2xCIM do OE (25%), a redução foi de 1,3 log UFC.cm⁻². Com relação ao biofilme do isolado S13 formado a 25 °C, o tratamento controle (sem adição de OE) apresentou contagem de células viáveis de 7,10 log UFC.cm⁻² (Figura 2). Entretanto, após o tratamento com 6,25% e 12,5% do OE houve redução inferior a 1 log UFC.cm⁻² ($p < 0,05$) e, na concentração do OE de 25%, houve redução de 1,44 log UFC.cm⁻².

O biofilme do isolado S7 formado a 37 °C apresentou contagens celulares de 6,86 log UFC.cm⁻² no tratamento controle (Figura 2). Após o tratamento com 6,25% do OE de *P. elongatum*, houve uma redução inferior a 1 log UFC.cm⁻², não apresentando diferença estatística em relação ao controle ($p > 0,05$). Entretanto, houve redução no número de células viáveis a medida que a concentração do OE foi aumentando ($p < 0,05$). Após o tratamento com 12,5% do OE, a redução foi de 1,02 log UFC.cm⁻², e com a concentração de 25%, a redução foi de 2,06 log UFC.cm⁻². Com relação ao biofilme do isolado S13 formado a 37 °C, o número de células viáveis no tratamento controle foi de 7,32 log UFC.cm⁻² (Figura 2). Após o tratamento com o OE de *P. elongatum* a 6,25%, não houve redução significativa na contagem celular ($p > 0,05$). O aumento da concentração do OE proporcionou maior redução na contagem de células viáveis, sendo que na concentração de 12,5% a diminuição foi de 1,45 log UFC.cm⁻² ($p < 0,05$), enquanto que a 25%, foi de 2,46 log UFC.cm⁻² ($p < 0,05$).

O OE de *M. setosa* apresentou atividade sobre o biofilme dos dois isolados de *S. aureus* avaliados ($p < 0,0001$), tanto a 25 quanto a 37 °C (Figura 3).

A contagem de células viáveis do biofilme do isolado S7 formado a 25 °C, foi de 6,73 log UFC.cm⁻² no tratamento controle (sem o uso do OE de *M. setosa*) (Figura 3). Após o tratamento com ½ CIM (6,25%) do OE de *M. setosa*, o número de células viáveis no biofilme não foi diferente do controle ($p > 0,05$) e, quando se utilizou a CIM (12,5%) a redução foi inferior a 1 log UFC.cm⁻² ($p < 0,05$). Porém, usando-se 2XCIM (25%), a redução no número de células viáveis foi de 1,37 log UFC.cm⁻² ($p < 0,05$). Com relação ao biofilme do isolado S13, formado nessa mesma temperatura, observou-se contagem celular de 7,10 log UFC.cm⁻² no tratamento controle. Após o tratamento com 6,25% do OE de *M. setosa* não houve diferença entre as contagens ($p > 0,05$), entretanto, após o aumento nas concentrações do OE, o número de células viáveis foi reduzido ($p < 0,05$). Utilizando-se concentração de 12,5% do OE a redução foi de 1,14 log UFC.cm⁻² (de 7,10 para 5,96 log UFC.cm⁻²), enquanto na concentração de 25%, a redução foi de 2,20 log UFC.cm⁻² (de 7,10 log UFC.cm⁻² para 4,90 Log UFC.cm⁻²).

Nos biofilmes formados a 37 °C, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre a contagem de células viáveis do isolado S7 sem adição do óleo de *M. setosa* (6,86 log UFC.cm⁻²) e a contagem celular quando foi utilizado o OE na concentração de 6,25%, com redução inferior a 1 log UFC.cm⁻² (Figura 3). Quando a concentração do OE foi aumentada, houve maior redução na contagem de células viáveis ($p < 0,05$). A diminuição no número de células viáveis após o tratamento com 12,5% do OE foi de 1,02 log UFC.cm⁻² e, no tratamento com 25%, a redução foi de 1,74 log UFC.cm⁻². Com relação ao biofilme do isolado S13, formado nessa mesma temperatura, a contagem de células viáveis do tratamento controle foi de 7,32 log UFC.cm⁻². Após o tratamento com 6,25% do OE, houve diminuição inferior a 1 log UFC.cm⁻² (de 7,32 para 6,93 log UFC.cm⁻²), com diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). Com a utilização do OE na concentração de 12,5%, a diminuição da contagem de células viáveis foi de 2,26 log UFC.cm⁻² (de 7,32 para 5,06 log UFC.cm⁻²) e para a concentração de 25%, a redução de 2,52 log UFC.cm⁻². Não houve diferença estatística entre essas duas últimas concentrações de OE, diferindo apenas do tratamento controle (sem aplicação de OE), conforme pode ser observado na Figura 3.

3.5 Avaliação da atividade dos OE em biofilmes pré-formados de *S. aureus* por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

A MCVL permitiu a visualização do biofilme formado sobre aço inoxidável, bem como o efeito dos tratamentos com os OE de *P. elongatum* e *M. setosa* sobre os biofilmes pré-formados. As imagens mostraram que os biofilmes não submetidos aos tratamentos (Figura 4 e 5 A, D, G, J) apresentavam apenas células coradas de verde (indicativo de membrana celular intacta), enquanto após os tratamentos com concentrações de 12,5% e 25% dos OE, foi se observando um aumento gradativo na presença de células coradas de vermelho (indicativo de membrana celular danificada).

As imagens da MCVL foram analisadas pelo software LAS X 3 D Analysis para estimar os índices de viabilidade celular dos isolados S7 e S13 dentro dos biofilmes tratados com os dois OE (Figuras 6 e 7). Houve redução das células viáveis presentes no biofilme após o tempo de contato (15 min) dos biofilmes com as diferentes concentrações dos OE de *P. elongatum* e de *M. setosa*. A análise das imagens revelou que para o isolado S7 a 25 °C e com 12,5%, de OE de *P. elongatum*, houve redução na porcentagem de células viáveis, de ~62% para ~38%, enquanto na concentração de 25%, a redução foi de ~62% para ~32%. Já para o isolado S13, nessa mesma temperatura, a concentração de 12,5% do OE reduziu as células viáveis de ~67% para ~40%, enquanto a 25%, a redução foi de ~67% para ~33%. A 37 °C, observou-se que o número de células viáveis do isolado S7 reduziu de ~86% para ~13% no tratamento com 12,5% do OE e de ~86% para ~3% na concentração de 25%. Com relação ao isolado S13, a redução na concentração de 12,5% de OE foi de ~95% para ~6% e com 25% de OE, foi de ~95% a ~3%.

O OE de *M. setosa* a 25°C, na concentração de 12,5%, reduziu o número de células viáveis do isolado S7, de ~62% para ~46%, enquanto a 25%, a redução foi de ~62% para ~40%. Com relação ao isolado S13 a redução de células viáveis na concentração de OE de 12,5% foi de ~67% para ~46% e, a 25%, de ~67% para ~39%. Quando a temperatura de 37 °C foi avaliada, o isolado S7, submetido à concentração de OE de 12,5%, apresentou redução de células viáveis de ~86% para ~15% e, a 25%, de ~86% para ~10%. Já o isolado S13 apresentou redução de células viáveis de ~95% a ~7% a 12,5% de concentração do OE e de ~95% a ~3% a 25%.

4. DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica capaz de formar biofilme em diferentes tipos de superfícies, aumentando o risco de contaminação cruzada em

alimentos, o que pode contribuir para a ocorrência de surtos de IAE (Marques et al., 2007; Kroning et al., 2016; Meesilp & Mesil, 2019; Maia et al., 2020). Um parâmetro que determina a formação de biofilme é o número de células viáveis presentes na superfície. Segundo Ronner & Wong (1993) este número varia de 5 a 7 log UFC.cm⁻², portanto, todos os isolados avaliados neste estudo apresentaram capacidade de formar biofilme sobre aço inoxidável a 25 °C e a 37 °C após 24 h, tendo em vista que as contagens bacterianas variaram entre 6 e 7 log UFC.cm⁻².

As temperaturas utilizadas foram escolhidas em função das temperaturas médias usualmente encontradas em ambientes de processamento de alimentos (25 °C) e da temperatura ótima de multiplicação de *S. aureus* (37 °C). Os resultados obtidos neste estudo demonstram que as contagens de células viáveis no biofilme após 24 h de incubação foram afetadas pela temperatura, tendo em vista que os isolados apresentaram maior produção de biofilme a 37 °C do que a 25 °C, o que também foi observado por Choi et al. (2013), Vázquez-Sánchez et al. (2013) e Avila-Novoa et al. (2018).

A análise química dos OE, realizada por GC-MS, permitiu que fossem identificados 39 compostos no OE de *M. setosa*, sendo a pulegona (57,54%) e o cariofileno (7,29%), os compostos majoritários. Pinto (2010) também identificou a pulegona (28,6%) como o composto majoritário no OE de *M. setosa*, seguido pela mentona (12,6%) e isomentona (11%). No entanto, os teores de pulegona variam em outras espécies de *Mintosthachys*, como foi observado por Montironi et al. (2016) e por Cecchini et al. (2021), na Argentina, que avaliaram OE de *M. verticillata*, e obtiveram teores de 51,7% e de 76,96% de pulegona, respectivamente. Já Torrenegra-Alarcón et al. (2016), na Colômbia, encontraram que o OE de *M. mollis* apresentou 9,84% de pulegona, sendo o carvacrol (21,24%) o composto majoritário.

No OE de *P. elongatum* foram identificados 54 compostos, sendo eucaliptol (10,84%), metil-eugenol (9,29%), β -ocimeno (8,31%) e espatulenol (7,22%), os compostos majoritários. Morocco Quispe (2017), caracterizaram fisico-quimicamente OE das folhas de *P. elongatum* coletadas na cidade de Puno, no Peru, e também encontraram que o eucaliptol foi o composto majoritário (49,96%), entretanto, aserone foi o segundo componente com maior concentração (20,78%). Por outro lado, Guerrini et al. (2009) e (Radice et al., 2019), no Equador, encontraram o dillapiol como principal componente do OE de *P. elongatum*, enquanto (Monzote et al., 2017), em Cuba, encontraram a piperitona como o componente em maior concentração. Esses

resultados demonstram que os perfis químicos do OE de *P. elongatum* variam de acordo com o local de origem, porém, outros fatores como as condições edafoclimáticas, o estágio de desenvolvimento da planta, as condições ambientais no momento da coleta e a estação do ano também influenciam diretamente na qualidade e quantidade dos componentes químicos dos OE (Senatore, 1998; Linde et al., 2016).

A atividade antimicrobiana dos OE contra *S. aureus* foi evidenciada pela formação de halos de inibição da multiplicação bacteriana, avaliada pela técnica de difusão em ágar. Segundo (Berthold-Pluta et al., 2019), os principais fatores que determinam a atividade antimicrobiana dos OE são sua composição, os grupos funcionais presentes nos componentes ativos e as interações sinérgicas entre os componentes. Guimarães & Meireles (2019), demonstraram que os terpenos oxigenados possuem atividade antimicrobiana, assim, as propriedades antimicrobianas dos OE avaliados podem dever-se aos terpenos identificados (pulegona e eucaliptol) e/ou seu sinergismo com o restante dos componentes de cada óleo.

É importante destacar que este é o primeiro estudo a avaliar a atividade antimicrobiana e determinar a CIM dos OE de *M. setosa* e *P. elongatum* em isolados de *S. aureus*. Porém, na literatura, foram encontrados estudos relacionados à utilização de OE extraídos de outras espécies de plantas pertencentes aos gêneros *Mintostachys* e *Piper*, nos quais foram avaliadas a sua atividade antibacteriana e/ou antifúngica. O OE de *M. verticillata* foi avaliado em diferentes concentrações contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo que *S. aureus* e *Salmonella Typhi* foram as mais sensíveis (Feo et al., 1998). Peña & Gutiérrez (2018), avaliaram o OE de *M. mollis* e verificaram que apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, além de ter demonstrado ação antifúngica contra *Candida albicans* e outros fungos dermatófitos de importância clínica (Cano et al., 2008). Da mesma forma, o OE de *P. angustifolium* apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* metilina resistentes e *Pseudomonas aeruginosa* de origem clínica (Chuquimango Fuentes, 2017), assim como o OE de *P. aduncum* demonstrou atividade antibacteriana contra *S. aureus* (Brazao et al., 2014; Monzote et al., 2017).

De acordo com a literatura, as bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, parecem ser mais suscetíveis aos OE do que as bactérias Gram-negativas, provavelmente devido à constituição da superfície celular das bactérias Gram-

positivas, as quais possuem membrana plasmática recoberta por uma parede celular, o que permite que as moléculas hidrofóbicas penetrem mais facilmente nas células (Nazzaro et al., 2013). Dessa forma, a ação dos OE é atribuída à capacidade de seus constituintes de interagir com a membrana celular e, conseqüentemente, desestabilizar a integridade microbiana, levando à morte celular. Além disso, os componentes bioativos dos OE podem ter vários alvos celulares e estão principalmente associados à coagulação citoplasmática, inibição das enzimas de produção de ATP, alteração no transporte de íons, dano à parede celular e destruição da membrana bacteriana (Burt, 2004).

A formação de biofilme bacteriano nas superfícies de ambientes de processamento de alimentos também representa um grande problema, devido ao favorecimento do surgimento de resistência a agentes sanitizantes e antimicrobianos entre os micro-organismos (Rodríguez-Lázaro et al., 2018). Em função disso, diversos estudos demonstraram que os OE são candidatos potenciais para serem usados na erradicação de biofilmes microbianos (Desai et al., 2012; Campana et al., 2017; Dos Santos Rodrigues et al., 2018; Reyes-Jurado et al., 2020).

Neste contexto, o presente estudo avaliou, pela primeira vez, a ação antibiofilme dos OE de *P. elongatum* e de *M. setosa* e, embora a utilização dos OE sobre o biofilme tenha produzido redução significativa ($p < 0,05$), nenhum dos tratamentos avaliados, com diferentes concentrações dos OE erradicou completamente as células do biofilme de *S. aureus*. Da mesma forma, Campana et al. (2017) observaram que após 90 min de exposição de biofilme de *S. aureus* a OE de *Cinnamoum cassia* e de *Salvia officinalis* houve redução celular superior a 3 log UFC.cm⁻². Por outro lado, Dos Santos Rodrigues et al. (2018) não detectaram células viáveis após 15 min de contato do biofilme de *S. aureus* com OE de *Origanum vulgare*.

Em geral, observou-se que as contagens de células viáveis de *S. aureus* diminuíram nas superfícies de aço inoxidável quando expostas as concentrações avaliadas dos OE de *P. elongatum* e de *M. setosa*, sendo que a redução variou entre isolados, concentrações dos OE e temperaturas avaliadas. O biofilme do isolado S13 foi mais sensível a ambos OE, em comparação ao biofilme formado pelo isolado S7.

Observou-se redução de 2,46 log UFC.cm⁻² no número de células viáveis do biofilme formado a 37 °C pelo isolado S13, quando se utilizou o OE de *P. elongatum*

numa concentração de 25%. Entretanto, na mesma concentração desse OE, no biofilme formado a 25 °C, a redução foi de 1,44 log UFC.cm⁻². Para o biofilme formado pelo isolado S7 a 37 °C observou-se que quando se utilizou OE de *P. elongatum* na concentração de 25%, houve redução celular de 2,06 log UFC.cm⁻², enquanto que a 25 °C a redução foi de 1,30 log UFC.cm⁻².

Com relação ao OE de *M. setosa* a 25% de concentração, houve redução no número de células viáveis de 2,20 log UFC.cm⁻² no biofilme formado pelo isolado S13 a 25 °C e de 2,52 log UFC.cm⁻² a 37°C. Já no biofilme do isolado S7 formado a 37°C a concentração de 25% de OE reduziu em 1,74 log UFC.cm⁻² o número de células viáveis e, a 25°C, a redução foi de 1,26 log UFC.cm⁻².

A maior concentração avaliada dos dois OE (2xCIM, 25%) foi mais eficaz para a eliminação de células de *S. aureus* em um biofilme pré-formado em superfície de aço inoxidável. Vázquez-Sánchez et al. (2015) avaliaram OE de tomilho e patchouli e verificaram que 8% (a maior concentração avaliada) foi suficiente para alcançar redução logarítmica de 4 log UFC.cm⁻² de células viáveis em biofilmes de *S. aureus* formados sobre aço inoxidável. Por outro lado Millezi et al. (2019) obtiveram redução de 5,17 log UFC.cm⁻² com a maior concentração de OE de canela testada (1,92%).

As imagens obtidas por MCVL indicaram que o número de células viáveis no biofilme foi significativamente reduzido após os tratamentos com concentrações de 12,5% e 25% dos OE de *P. elongatum* e *M. setosa*. Gao et al. (2020) também utilizaram a técnica de MCVL para comprovar os efeitos do OE de capim-limão e citrus sobre a estrutura do biofilme de *S. aureus* e *Candida albicans* em superfície de poliestireno, e observaram redução significativa no número de células viáveis (células coradas de verde), como o observado no presente estudo.

Os resultados deste estudo demonstraram que houve redução no número de células viáveis em biofilmes de *S. aureus* após contato com soluções de OE de *P. elongatum* e *M. setosa*, embora o biofilme não tenha sido erradicado. Dessa forma, os OE avaliados possuem potencial para serem usados como sanitizantes visando o controle da formação de biofilme de *S. aureus* em superfícies de contato com alimentos, porém, há necessidade de mais estudos visando avaliar se sua associação com outros sanitizantes e/ou com outros OE pode aumentar sua eficácia na remoção dos biofilmes.

5. CONCLUSÃO

Todos os isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica avaliados nesse estudo apresentaram habilidade de formar biofilme sobre aço inoxidável, evidenciando risco para a indústria e locais de processamento de alimentos, bem como para o consumidor. Os OE de *P. elongatum* e *M. setosa* apresentaram atividade antimicrobiana e foram capazes de reduzir o número de células viáveis do biofilme de *S. aureus* em até 2,52 log, sendo essa redução concentração e isolado-dependente. A Microscopia Confocal de Varredura a Laser demonstrou que os OE de *P. elongatum* e de *M. setosa* apresentaram ação sobre o biofilme pré-formado de *S. aureus* e que a medida que a concentração de OE aumentava mais perceptível foi a redução.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, N. J., Bridgeman, T. A., & Zottola, E. A. (1998). Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *Journal of Food Protection*, 61(7), 833-838. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.7.833>
- Avila-Novoa, M. G., Iñiguez-Moreno, M., Solís-Velázquez, O. A., González-Gómez, J. P., Guerrero-Medina, P. J., & Gutiérrez-Lomelí, M. (2018). Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Contact Surfaces in the Dairy Industry of Jalisco, Mexico. *Journal of Food Quality*, 2018, 1746139. <https://doi.org/10.1155/2018/1746139>
- Bae, Y. M., Baek, S. Y., & Lee, S. Y. (2012). Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 465-473. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.017>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bastos, C. P., Bassani, M. T., Mata, M. M., Lopes, G. V., & da Silva, W. P. (2017). Prevalence and expression of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning outbreaks. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(10), 834-840. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0316>

- Berthold-Pluta, A., Stasiak-Róžańska, L., Pluta, A., & Garbowska, M. (2019). Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against *Cronobacter* strains. *European Food Research and Technology*, 245(5), 1137-1147. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3218-x>
- Brack, A. (1999). *Diccionario Enciclopédico de plantas útiles del Perú*. Cusco-Perú: Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas.
- Brazao, M. A., Brazao, F., Guilherme, J., & Monteiro, M. (2014). Antibacterial activity of the Piper aduncum oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(6), 517-526. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85632545002>
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naïtali, M., & Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45(Pt B), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Campana, R., & Baffone, W. (2018). Carvacrol efficacy in reducing microbial biofilms on stainless steel and in limiting re-growth of injured cells. *Food Control*, 90, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.029>
- Campana, R., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., & Baffone, W. (2017). Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.021>
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Mintostachys mollis* (muña). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25, 298-301. <https://doi.org/>
- Carneiro, V. A., Melo, R. S., Pereira, A. M. G., Azevedo, Á. M. A., Matos, M. N. C., Cavalcante, R. M. B., Rocha, R. R., de Queiroz Albuquerque, V., Guerrero, J. A. P., & Catunda, F. E. A. (2020). Essential Oils as an Innovative Approach against Biofilm of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* *Bacterial Biofilms*: IntechOpen.

- Cecchini, M. E., Paoloni, C., Campra, N., Picco, N., Grosso, M. C., Perez, M. L., Alustiza, F., Cariddi, N., & Bellingeri, R. (2021). Nanoemulsion of *Minthostachys verticillata* essential oil. In-vitro evaluation of its antibacterial activity. *Heliyon*, 7(1), e05896. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05896>
- CLSI, C. (2016). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Lab Standards Institute*
- Choi, N. Y., Kim, B. R., Bae, Y. M., & Lee, S. Y. (2013). Biofilm formation, attachment, and cell hydrophobicity of foodborne pathogens under varied environmental conditions. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56(2), 207-220. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-3253-4>
- Chuquimango Fuentes, S. P. (2017). *Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de piper angustifolium (matico) sobre cepas de staphylococcus aureus meticilino resistente y pseudomonas aeruginosa*. Bachiller en Medicina Humana, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Desai, M. A., Soni, K. A., Nannapaneni, R., Schilling, M. W., & Silva, J. L. (2012). Reduction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and polystyrene surfaces by essential oils. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1332-1337. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-517>
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- Dos Santos Rodrigues, J., De Souza, N., Scarano, J., De Sousa, J., Lira, M., De Figueiredo, R., De Souza, E., & Magnani, M. (2018). Efficacy of using oregano essential oil and carvacrol to remove young and mature *Staphylococcus aureus* biofilms on food-contact surfaces of stainless steel. *LWT*, 93, 293-299. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.052>
- Feo, V. D., Ricciardi, A. I., Biscardi, D., & Senatore, F. (1998). Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epl.(Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 10(1), 61-65. <https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9700839>
- Gao, S., Liu, G., Li, J., Chen, J., Li, L., Li, Z., Zhang, X., Zhang, S., Thorne, R. F., & Zhang, S. (2020). Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (*Cymbopogon flexuosus*) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* Species. [Original Research].

- Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(810)<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.603858>
- Guimarães, A. C., & Meireles, L. M. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules* 24(13)<https://doi.org/10.3390/molecules24132471>
- Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.-L., & Dragacci, S. (2012). Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 815-836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>
- Joshi, S. G., Paff, M., Friedman, G., Fridman, G., Fridman, A., & Brooks, A. D. (2010). Control of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in planktonic form and biofilms: a biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *American Journal of Infection Control*, 38(4), 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2009.11.002>
- Kim, Y., Kim, H., Beuchat, L. R., & Ryu, J. H. (2018). Development of non-pathogenic bacterial biofilms on the surface of stainless steel which are inhibitory to Salmonella enterica. *Food Microbiology*, 69, 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.003>
- Kroning, I., Iglesias, M., Sehn, C., Gandra, T., Mata, M., & da Silva, W. (2016). Staphylococcus aureus isolated from handmade sweets: biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. *Food Microbiology*, 58, 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.04.001>
- Linde, G. A., Colauto, N. B., Albertó, E., & Gazim, Z. (2016). Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de Lippia alba. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(1), 191-200. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_037
- Maia, D. S. V., Haubert, L., Kroning, I. S., Soares, K. d. S., Oliveira, T. L., & da Silva, W. P. (2020). Biofilm formation by Staphylococcus aureus isolated from food poisoning outbreaks and effect of Butia odorata Barb. Rodr. Extract on planktonic and biofilm cells. *LWT*, 117, 108685. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108685>
- Marques, S. C., Rezende, J. d. G. O. S., Alves, L. A. d. F., Silva, B. C., Alves, E., Abreu, L. R. d., & Piccoli, R. H. (2007). Formation of biofilms by Staphylococcus aureus on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected

- chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3), 538-543. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300029>
- Meesilp, N., & Mesil, N. (2019). Effect of microbial sanitizers for reducing biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel by cultivation with UHT milk. *Food Science and Biotechnology*, 28(1), 289-296. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0448-4>
- Millezi, A. F., Costa, K. A. D., Oliveira, J. M., Lopes, S. P., Pereira, M. O., & Piccoli, R. H. (2019). Antibacterial and anti-biofilm activity of cinnamon essential oil and eugenol. *Ciência Rural*, 49(1)<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180314>
- Montironi, I. D., Cariddi, L. N., & Reinoso, E. B. (2016). Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(3), 210-216. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.005>
- Monzote, L., Scull, R., Cos, P., & Setzer, W. N. (2017). Essential oil from *Piper aduncum*: Chemical analysis, antimicrobial assessment, and literature review. *Medicines (Basel)*, 4(3), 49. <https://doi.org/10.3390/medicines4030049>
- Morocco Quispe, S. K. (2017). *Caracterización micro-histológico, físico y químico del aceite esencial de las hojas de matico (Piper aduncum), extraído por arrastre de vapor en un equipo modular*. Ingeniero Químico, Universidad Nacional del Altiplano, Perú.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6(12), 1451-1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Otoya, V. L. (2020). Consideraciones para el uso y estudio de la “muña” peruana *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb y *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling. *Ethnobotany Research and Applications*, 19, 1-9.
- Paparella, A., Serio, A., Rossi, C., Mazzarrino, G., & López, C. C. (2018). Food-Borne Transmission of Staphylococci. In A. Press (Ed.), *Pet-To-Man Travelling Staphylococci* (pp. 71-94). Londres: Elsevier.
- Parizzi, S. Q. F., Andrade, N. J. d., Silva, C. A. d. S., Soares, N. d. F. F., & Silva, E. A. M. d. (2004). Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(1), 77-83. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000100011>

- Peña, D., & Gutiérrez, M. (2018). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre microorganismos frecuentes en vías respiratorias bajas. *Revista Ciencia y Tecnología*, 13(3), 55-66.
- Pinto, D. M. L. (2010). *Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de Minthostachys setosa (Briq.) Epling*. Mestre, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Radice, M., Pietrantoni, A., Guerrini, A., Tacchini, M., Sacchetti, G., Chiurato, M., Venturi, G., & Fortuna, C. (2019). Inhibitory effect of *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. and *Piper aduncum* L. essential oils from Ecuador on West Nile virus infection. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(3), 344-351. <https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1478902>
- Reis-Teixeira, F. B. d., Alves, V. F., & Martinis, E. C. P. d. (2017). Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 587-591. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.004>
- Reyes-Jurado, F., Munguía-Pérez, R., Cid-Pérez, T. S., Hernández-Carranza, P., Ochoa-Velasco, C. E., & Avila-Sosa, R. (2020). Inhibitory Effect of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) Essential Oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Typhimurium* Biofilm Formation. [Original Research]. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(36)<https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00036>
- Rodríguez-Lázaro, D., Alonso-Calleja, C., Oniciuc, E. A., Capita, R., Gallego, D., González-Machado, C., Wagner, M., Barbu, V., Eiros-Bouza, J. M., Nicolau, A. I., & Hernández, M. (2018). Characterization of Biofilms Formed by Foodborne Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3004. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03004>
- Ronner, A. B., & Wong, A. C. L. (1993). Biofilm Development and Sanitizer Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-n Rubber. *Journal of Food Protection*, 56(9), 750-758. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-56.9.750>
- Rosenthal, C. B., Mootz, J. M., & Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilm formation and inhibition *Antibiofilm Agents from Diagnosis to Treatment and*

- Prevention* (Vol. 8, pp. 233-255). Verlag Berlin Heidelberg: Springer Science & Business Media.
- Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3)<https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>
- Senatore, F. (1998). Volatile constituents of *Minthostachys setosa* (Briq.) Epl.(Lamiaceae) from Peru. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(4), 263-265. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(1998070\)](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(1998070))
- Vázquez-Sánchez, D., Cabo, M. L., & Rodríguez-Herrera, J. J. (2015). Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Food Science and Technology International*, 21(8), 559-570. <https://doi.org/10.1177/1082013214553996>
- Vázquez-Sánchez, D., Habimana, O., & Holck, A. (2013). Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. *Current Microbiology*, 66(2), 110-121. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0247-8>
- WHO. (2021). Foodborne diseases Retrieved 09/05/2021, 2021, from https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1

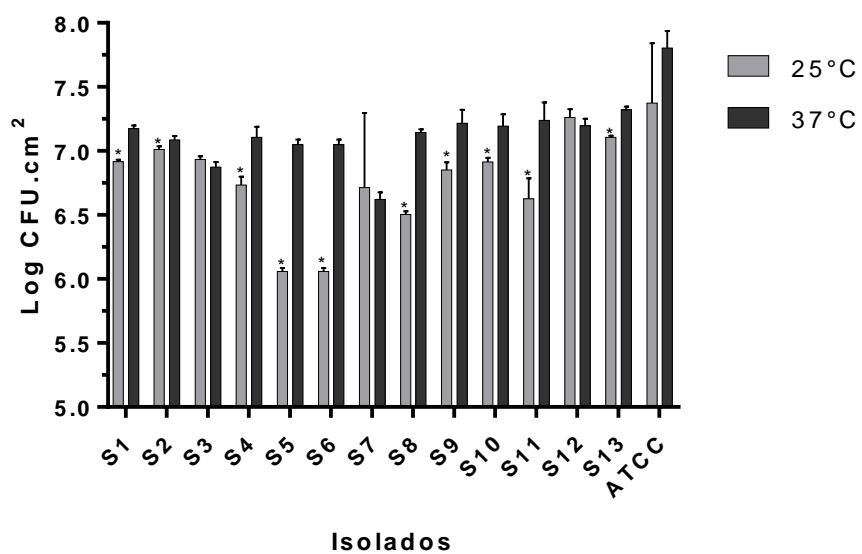


Figura 1. Capacidade de Formação de biofilme (\log UFC.cm⁻²) em 13 isolados de *S. aureus* e em *S. aureus* ATCC 25923 a 25 °C e 37 °C.

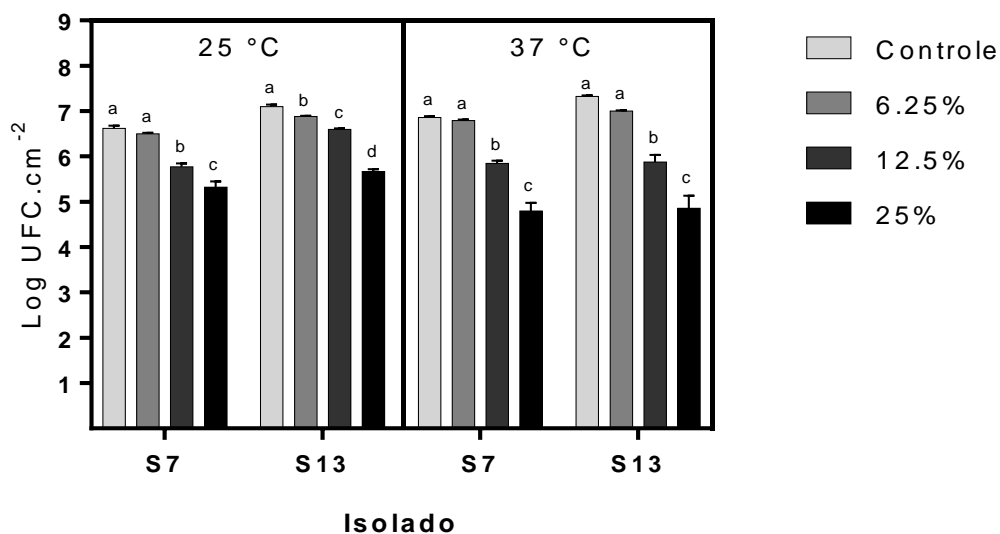


Figura 2. Contagem de células viáveis em biofilme de *S. aureus* formado em aço inoxidável a 25 °C ou 37 °C em dois isolados (S7 e S13) tratados com 0% (Controle), 6,25% (½ CIM), 12,5% (CIM) ou 25% (2XCIM) de OE de *P. elongatum*. Letras diferentes entre as barras no mesmo isolado indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

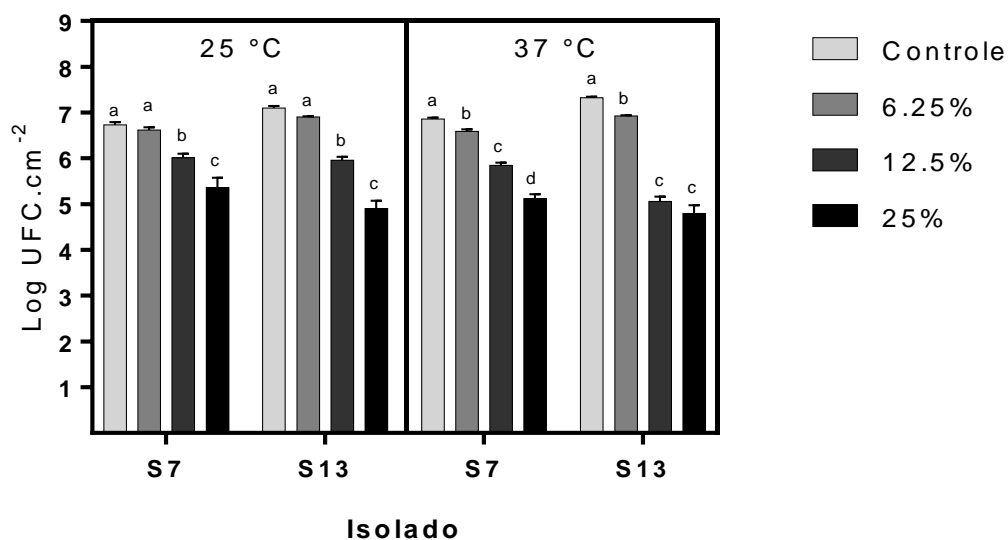


Figura 3. Contagem de células viáveis em biofilme de *S. aureus* formado em aço inoxidável a 25 °C ou 37 °C em dois isolados (S7 e S13) de tratados com 0% (Controle), 6,25% (½ CIM), 12,5% (CIM) ou 25% (2xCIM) de OE de *M. setosa*. Letras diferentes entre as barras no mesmo isolado indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

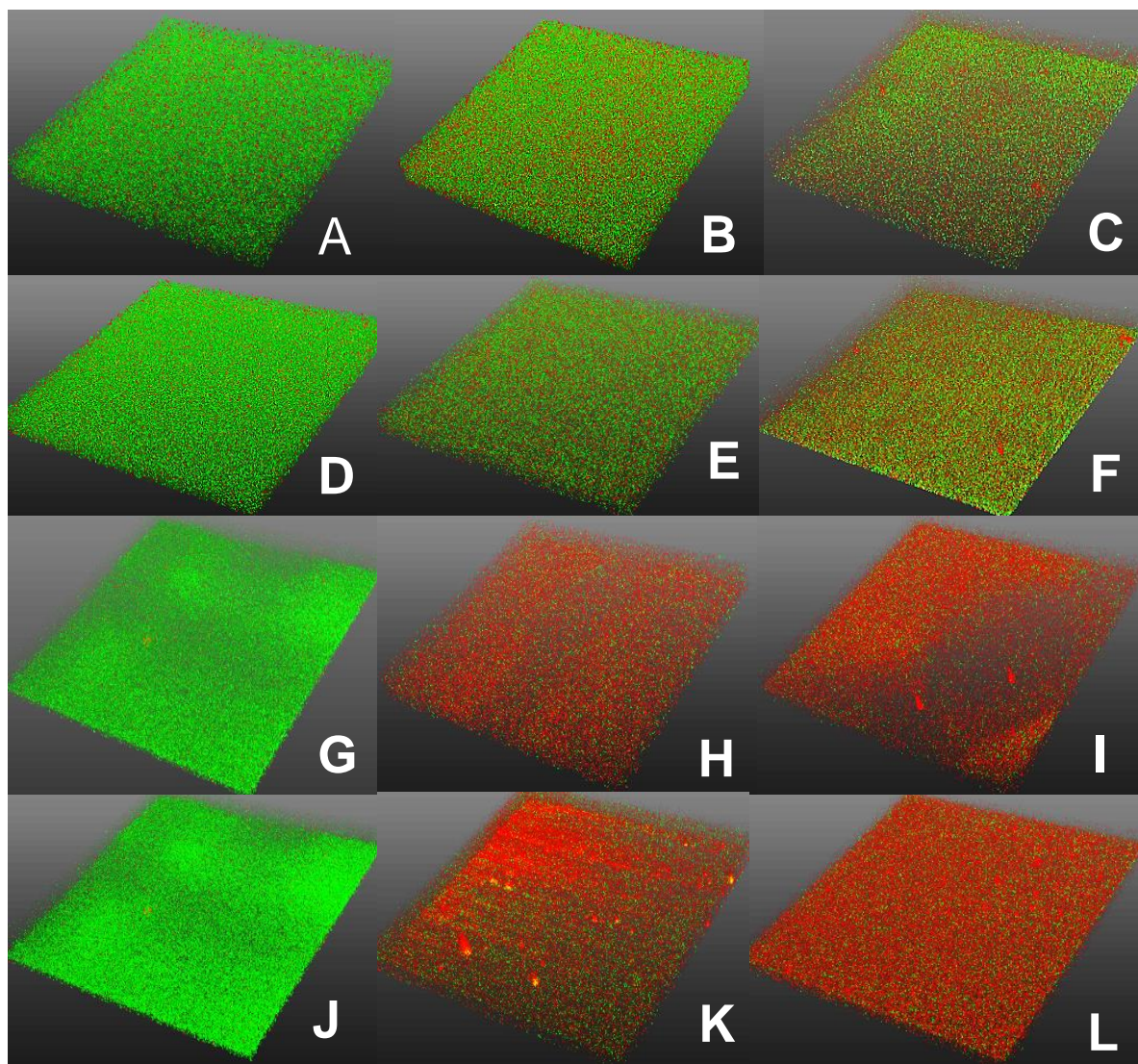


Figura 4. Imagens de Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D de biofilme sobre aço inoxidável de dois isolados de *S. aureus* (S7 e S13) tratados com OE de *P. elongatum*: S7 a 25 °C sem tratamento (A) e após tratamento com 12,5% (B) e 25% (C); S13 a 25°C sem tratamento (D) e após tratamento com 12,5% (E) e 25% (F); S7 a 37°C sem tratamento (G) e após tratamento com 12,5% (H) e 25% (I); S13 a 37°C sem tratamento (J) e após tratamento com 12,5% (K) e 25% (L).

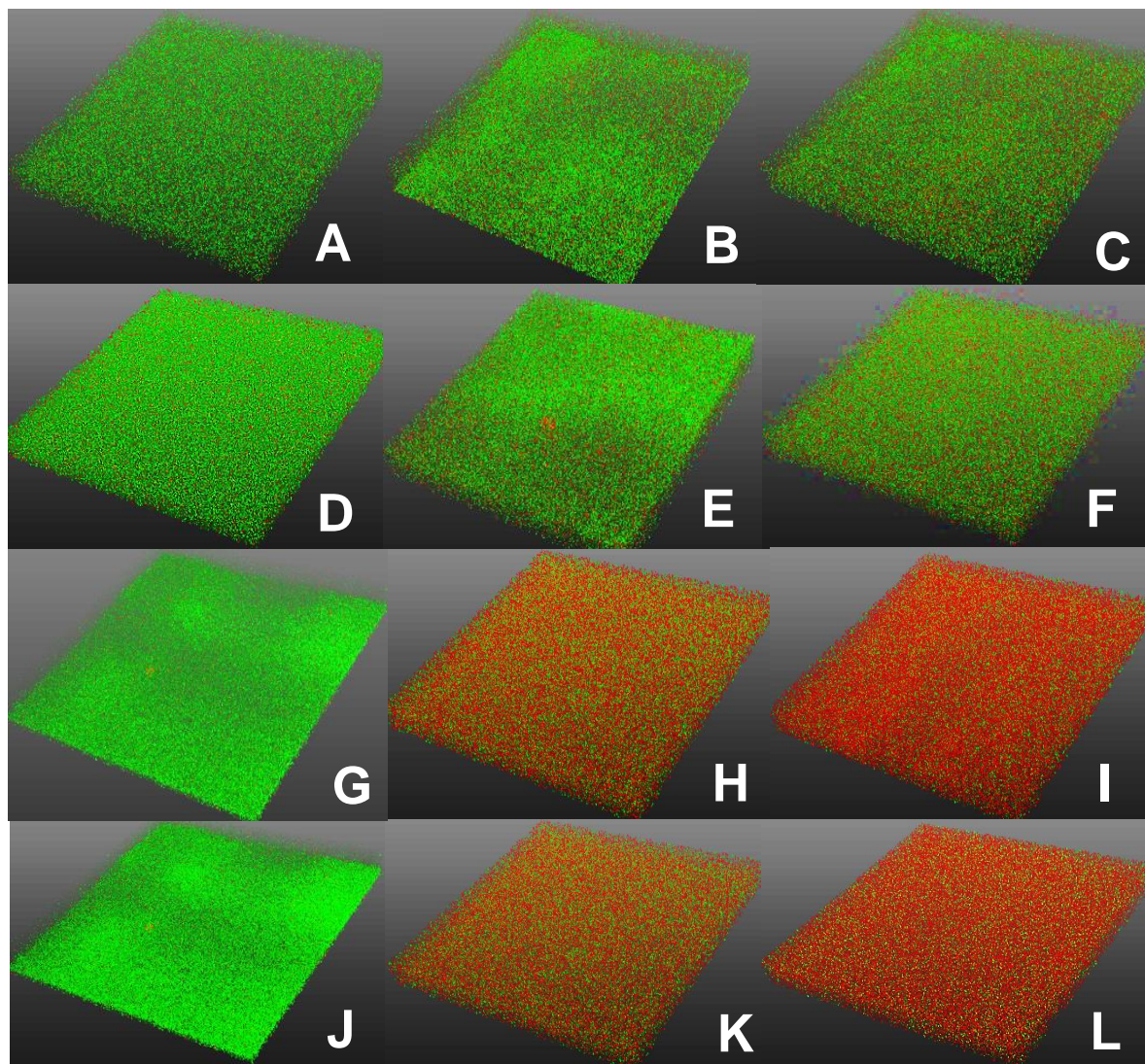


Figura 5. Imagens de Microscopia Confocal de Varredura a Laser em 3D de biofilme sobre aço inoxidável dos isolados de *S. aureus* tratados com OE de *M. setosa*: S7 a 25°C sem tratamento (A) e após tratamento com 12,5% (B) e 25% (C); S13 a 25°C sem tratamento (D) e após tratamento com 12,5% (E) e 25% (F); S7 a 37°C sem tratamento (G) e após tratamento com 12,5% (H) e 25% (I); S13 a 37°C sem tratamento (J) e após tratamento com 12,5% (K) e 25% (L).

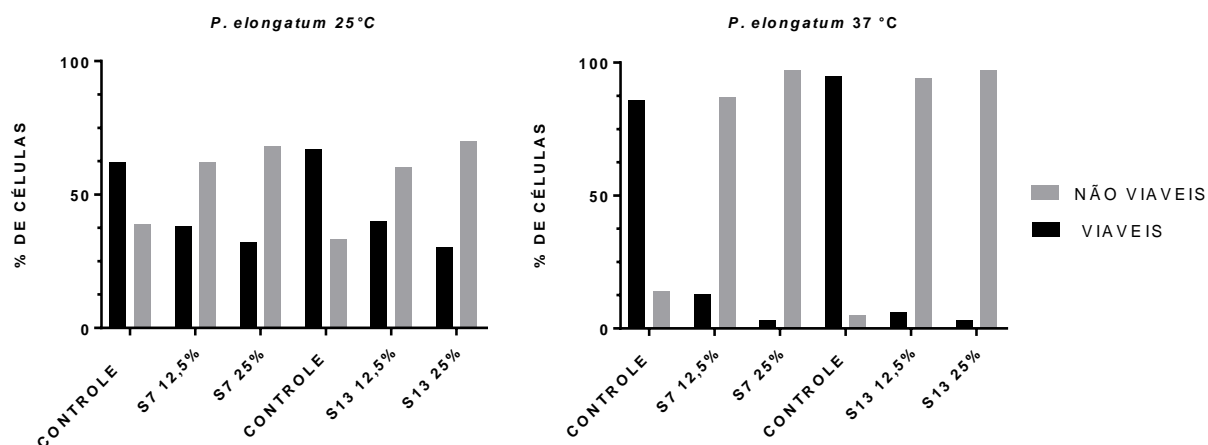


Figura 6. Porcentagens estimadas por microscopia de varredura confocal a laser de células viáveis e não viáveis em biofilme formado em aço inoxidável a 25 °C ou 37 °C em dois isolados de *S. aureus* (S7 e S13) após tratamento com 12,5% ou 25% de OE de *P. elongatum*.

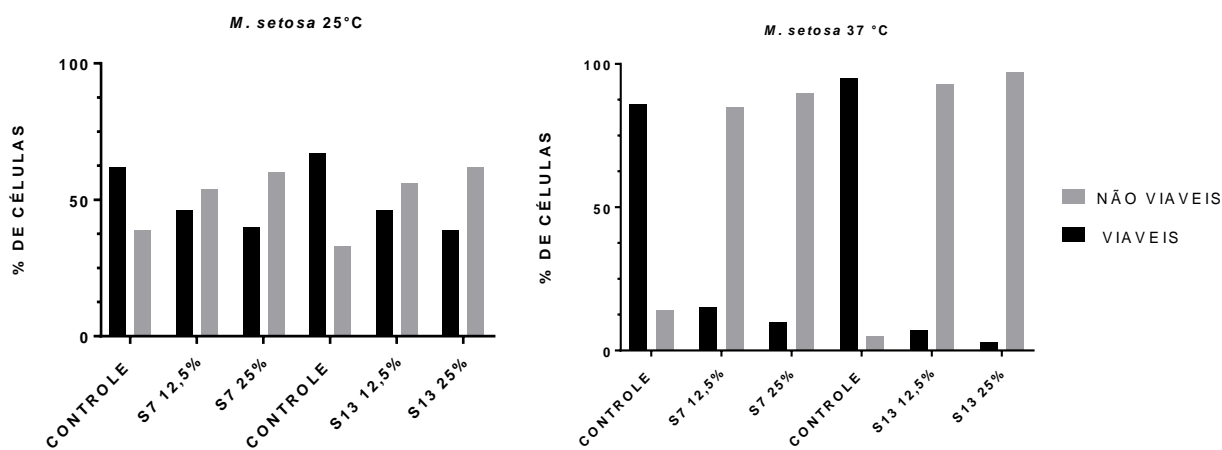


Figura 7. Porcentagens estimadas por microscopia de varredura confocal a laser de células viáveis e não viáveis em biofilme formado em aço inoxidável a 25 °C ou 37 °C em dois isolados de *S. aureus* (S7 e S13) após tratamento com 12,5% ou 25% de OE de *M. setosa*.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Minthostachys setosa* (Briq) analisado por CG-MS

	Nome químico	TR (min)	IR	IR exp	% Relativa
1	Alfa-felandreno	3,09	969	1018	0,09
2	Alfa-pineno	3,19	948	1024	1,61
3	Camfeno	3,37	943	1035	0,08
4	Beta-Pineno	3,80	943	1060	1,16
5	Beta-Mirceno	4,07	958	1076	1,05
6	Alfa-felandreno	4,29	969	1089	0,42
7	(+)-4-Careno	4,53	919	1002	0,10
8	o-Cimeno	4,59	1042	1005	0,30
9	D-Limoneno	4,78	1018	1014	2,53
10	(Z)-Beta-Ocimeno	5,17	976	1032	0,22
11	Gamma-Terpineno	5,36	998	1042	0,18
12	Linalool	6,22	1082	1182	4,91
13	Eucaliptol	4,72	1059	1011	2,22
14	Isomentona	7,45	1148	1133	0,40
15	trans-Isopulegona	7,67	1179	1142	3,92
16	(-)-4-Terpineol	7,97	1137	1154	0,35
17	Pulegona	9,58	1212	1217	57,74
18	Citral	10,18	1174	1239	0,48
19	Piperitenona	11,71	1223	1297	0,92
20	Alfa-Terpinyl acetato	12,46	1333	1326	0,20
21	Citronelol acetato	12,65	1302	1333	0,20
22	(-)-cis-.beta.-Elemene	13,80	1398	1378	0,18
23	(-)-alpha-Gurjunene	14,28	1419	1396	0,37
24	Cariofileno	14,46	1494	1303	7,29
25	Humuleno	15,25	1579	1434	1,93

26	Alloaromadendre ne	15,42	1386	1441	1,24
27	beta.-Cubebene	15,90	1339	1460	0,51
28	Elixeno	16,30	1431	1476	2,79
29	Cadina-1(10),4- diene	16,96	1469	1403	0,47
30	Aromadendrene	17,67	1386	1432	0,24
31	Spathulenol	17,97	1536	1445	0,46
32	Caryophyllene oxide	18,07	1507	1347	0,51
33	(-)-Globulol	18,20	1530	1352	0,57
34	Ledol	18,63	1530	1371	0,48
	Ester 2.84%				
36	1-Octen-3-yl acetato	6,50	1109	1195	2,84
37	m-Eugenol	12,33	1392	1321	0,30
38	Metileugenol	13,52	1361	1367	0,48
39	2H-Pyran-3(4H)- one, 6- ethenyldihydro- 2,2,6-trimethyl-	6,12	1238	1077	0,32
Total identificado (%)					96,9
Compostos agrupados (%)					
	<i>Monoterpenóides</i>				63,89
	Monoterpenos				14,87
	Sesquiterpeno				15,02
	Sesquiterpenóide				2,02
	Fenilpropanoide				0,78
	Éter				0,32

TR: tempo de retenção.

IR: Índice de retenção da literatura (NIST, 2011)

IR exp: Índice de retenção experimental calculado por combinação de C8-C20 n-
alcanos

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de *Piper elongatum* (Vahl) analisado por CG-MS

	Nome químico	TR (min)	IR	IR exp	% relativa
1	alfa.-Phellandrene	3,10	969	1019	0,15
2	alfa-Pineno	3,20	948	1025	2,86
3	Canfeno	3,38	943	1035	0,11
4	beta.-Felaldreno	3,75	964	1057	0,12
5	beta-Pineno	3,82	943	1061	3,26
6	beta.-Pineno	4,08	943	1076	1,42
7	gamma-Terpineno	4,30	998	1089	0,14
8	3-Careno	4,45	948	1098	0,06
9	alfa-Terpineno	4,55	998	1104	2,00
10	o-Cymene	4,61	1042	1006	0,73
12	alfa-Pineno	4,99	948	1024	4,23
13	(Z)-beta-Ocimeno	5,23	976	1035	8,31
14	gamma-Terpineno	5,38	998	1042	2,40
15	alfa-Terpineno	6,02	998	1072	0,92
16	Neo-allo-ocimeno	7,00	993	1116	0,15
17	Eucaliptol	4,78	1059	1014	10,84
18	Linalool	6,18	1082	1080	0,20
19	L-afa-Terpineol	7,58	1143	1138	0,38
20	alfa-Terpineol	8,23	1143	1164	1,70
21	2-Cyclohexen-1-ol, 1- methyl-4-(1- methylethenyl)-, trans-	8,69	1140	1182	0,25
22	Neral	9,38	1174	1209	0,15
23	trans-p-Menth-2-ene- 1,4-diol	9,99	1259	1232	0,06
24	Geranil	10,14	1174	1238	0,14
25	alfa-Cubebeno	12,80	1344	1339	0,20
26	Ylangene	13,32	1221	1359	0,19
27	alfa-Copaene	13,44	1221	1364	1,41

28	(-)-cis-.beta.-Elemene	13,82	1456	1378	1,72
29	(-)-alpha-Gurjunene	14,28	1419	1396	0,23
30	Cariofileno	14,46	1494	1403	3,80
31	beta.-Cubebeno	14,69	1339	1412	0,30
32	Selina-3,7(11)-diene	14,83	1507	1418	0,17
33	1,1,3a-Trimethyl-7- methylenedecahydro- 1H- cyclopropa[a]naphthale ne	15,43	1398	1442	0,00
34	beta.-Cubebene	15,96	1469	1463	3,14
35	beta.-Selinene	16,04	1469	1466	5,92
36	gamma.-Muurolene	16,13	1435	1470	0,40
37	(-)-.gamma.-Elemene	16,33	1431	1478	0,28
38	alfa.-Muurolene	16,45	1440	1482	5,48
39	alfa.-Guaiene	16,49	1490	1484	0,65
40	gamma.-Muurolene	16,73	1435	1493	0,38
41	beta.-Cadinene	16,98	1440	1504	2,41
42	Espatulanol	17,99	1536	1546	7,22
43	Oxido de cariofileno	18,09	1507	1550	1,13
44	(-)-Globulol	18,22	1530	1555	0,32
45	Cubenol	18,68	1522	1574	0,37
46	tau.-Cadinol	19,51	1580	1610	0,38
47	alpha.-Cadinol	19,77	1580	1621	0,63
48	Miristicina	14,98	1516	1424	3,44
49	Isoeugenyl methyl ether	15,85	1379	1458	0,71
50	Elemicin	17,25	1550	1515	1,76
51	beta.-Asarone	17,76	1568	1536	0,71
52	Methyleugenol	13,63	1361	1371	9,29
53	Safrole	10,60	1327	1255	4,37
54	1,5,9,9-Tetramethyl- 1,4,7-cycloundecatriene	15,26	1579	1435	2,01

Total identificado (%)

99,25

Compostos agrupados (%)	
Monoterpeno	26,86
Sesquiterpeno	26,68
<i>Monoterpenóides</i>	13,37
Sesquiterpenóides	10,05
Fenilpropanoide	9,29
Éter	6,62
Outros	6,38

TR: tempo de retenção.

IR: Índice de retenção da literatura (NIST, 2011)

IR exp: Índice de retenção experimental calculado por combinação de C8-C20 n-
alcanos

Tabela 3. Atividade antimicrobiana (halos em mm) de óleo essencial de *Minthostachys setosa* (Briq) e *Piper elongatum* (Vahl) contra *S. aureus* provenientes de surtos de intoxicação alimentar

Isolados	OE**	OE**	Oxacilina*
	<i>M. setosa</i>	<i>P. elongatum</i>	
S1	15 ± 0	16,5 ± 0	20 ± 1
S2	15,5 ± 0,5	15,5 ± 0,5	21 ± 0,5
S3	15 ± 0	15 ± 0	21 ± 0,5
S4	16,5 ± 0,5	15,5 ± 0,5	20 ± 1
S5	18 ± 2	16 ± 1	22 ± 0,5
S6	17 ± 3	16 ± 0	21 ± 0
S7	16 ± 1	15,5 ± 0,5	20 ± 1
S8	18,5 ± 1,5	15,5 ± 0,5	22 ± 1
S9	17,5 ± 2,5	15 ± 1	20 ± 0,5
S10	17,5 ± 0,5	15,5 ± 0,5	21 ± 0,5
S11	15,5 ± 0,5	15 ± 1	20 ± 0,5
S12	15 ± 0	16 ± 0	21 ± 0,5
S13	16,5 ± 0,5	17,5 ± 0,5	21 ± 0,5
ATCC	16 ± 1	16 ± 0	21 ± 0,5

*Controle positivo ** Óleo essencial

5 CONCLUSÃO GERAL

A avaliação da diversidade genética dos isolados de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica no Rio Grande do Sul, demonstrou que os tipos *spa* identificados nos isolados apresentam relação genética com isolados de origem humana, indicando que os manipuladores podem ter sido uma importante fonte de transmissão deste patógeno para alimentos. Além disso, os grupos agr II e agr III, que foram os prevalentes neste estudo, estão relacionados a isolados produtores de enterotoxinas e formação de biofilme. Todos os isolados apresentaram resistência fenotípica aos antimicrobianos e sanitizantes testados, bem como portavam genes relacionados a resistência a antimicrobianos e genes que codificam bombas de efluxo. Verificou-se que todos os isolados apresentaram habilidade de formar biofilme sobre aço inoxidável a 25 °C e 37 °C, o que representa um risco tanto nos locais de processamento de alimentos, quanto para os consumidores. A atividade antimicrobiana dos OE de *P. elongatum* e *M. setosa* foi concentração e isolado-dependente, reduzindo em até 2,52 log o número de células viáveis do biofilme de *S. aureus*, o que foi corroborado pelos resultados visualizados com a Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Contudo, mais estudos devem ser realizados para avaliar se a associação dos OE com sanitizantes e/ou com outros OE pode aumentar sua eficácia na remoção do biofilme de *S. aureus*.

6 REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. (1999). Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters*. 170(1). p. 151-58.
- ACHEK, R., HOTZEL, H., CANTEKIN, Z., NABI, I., HAMDI, T.M., NEUBAUER, H. & EL-ADAWY, H. (2018). Emerging of antimicrobial resistance in staphylococci isolated from clinical and food samples in Algeria. *BMC Research Notes*. 11(1). p. 1-7.
- ADUKWU, E., ALLEN, S.C. & PHILLIPS, C.A. (2012). The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 113(5). p. 1217-27.
- AHMADY, M. & KAZEMI, S. (2013). Detection of the enterotoxigenic genes (*sei, sej*) in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis milk in the West Azerbaijan of Iran. *Comparative Clinical Pathology*. 22(4). p. 649-54.
- AMMAR, A.M., ATTIA, A.M., ABD EL-HAMID, M.I., EL-SHORBAGY, I.M. & ABD EL-KADER, S.A. (2016). Genetic basis of resistance waves among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from milk and meat products in Egypt. *Cellular and Molecular Biology*. 62(10). p. 7-15.
- ANDRADE, N.J., BRIDGEMAN, T.A. & ZOTTOLA, E.A. (1998). Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as

- determined by plate count and impedance methods. *Journal of Food Protection*. 61(7). p. 833-38.
- ANTIABONG, J.F., KOCK, M.M., BELLEA, N.M. & EHLERS, M.M. (2017). Diversity of Multidrug Efflux Genes and Phenotypic Evaluation of the In vitro Resistance Dynamics of Clinical Staphylococcus Aureus Isolates Using Methicillin; a Model β -lactam. *The Open Microbiology Journal*. 11. p. 132-41.
- ARGUDÍN, M.Á., MENDOZA, M.C. & RODICIO, M.R. (2010). Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. *Toxins*. 2(7). p. 1751-73.
- ARMAS, J.R., QUIROZ, J.R., ROMAN, R.A., SANCHEZ, J.O., PACHECO, M.P., VALDIVIA, L.H., RIVERA, E.C., ASMAT, R.C. & ANAMPA-GUZMÁN, A. (2016). Antibacterial Activities of Essential Oils from Three Medicinal Plants in Combination with EDTA against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Microbiology Research Journal International*. p. 1-10.
- AVILA-NOVOA, M.G., IÑÍGUEZ-MORENO, M., SOLÍS-VELÁZQUEZ, O.A., GONZÁLEZ-GÓMEZ, J.P., GUERRERO-MEDINA, P.J. & GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M. (2018). Biofilm Formation by Staphylococcus aureus Isolated from Food Contact Surfaces in the Dairy Industry of Jalisco, Mexico. *Journal of Food Quality*. 2018. p. 1746139.
- BAE, Y.M., BAEK, S.Y. & LEE, S.Y. (2012). Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. 153(3). p. 465-73.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D. & IDAOMAR, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*. 46(2). p. 446-75.
- BALABAN, N. & RASOOLY, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International journal of food microbiology*. 61(1). p. 1-10.
- BASTOS, C.P., BASSANI, M.T., MATA, M.M., LOPES, G.V. & DA SILVA, W.P. (2017). Prevalence and expression of staphylococcal enterotoxin genes in Staphylococcus aureus isolated from food poisoning outbreaks. *Canadian Journal of Microbiology*. 63(10). p. 834-40.
- BECKER, K., FRIEDRICH, A.W., PETERS, G. & VON EIFF, C. (2004). Systematic survey on the prevalence of genes coding for staphylococcal enterotoxins SEIM, SEIO, and SEIN. *Molecular Nutrition & Food Research*. 48(7). p. 488-95.
- BEN SAID, M., ABBASSI, M.S., GÓMEZ, P., RUIZ-RIPA, L., SGHAIER, S., EL FEKIH, O., HASSEN, A. & TORRES, C. (2017). Genetic characterization of Staphylococcus aureus isolated from nasal samples of healthy ewes in Tunisia. High prevalence of CC130 and CC522 lineages. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 51. p. 37-40.
- BENKERROUM, N. (2018). Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview. *Critical reviews in food science and nutrition*. 58(12). p. 1943-70.
- BERTHOLD-PLUTA, A., STASIAK-RÓŻAŃSKA, L., PLUTA, A. & GARBOWSKA, M. (2019). Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against Cronobacter strains. *European Food Research and Technology*. 245(5). p. 1137-47.
- BIBALAN, M.H., SHAKERI, F., JAVID, N., GHAEMI, A. & GHAEMI, E.A. (2014). Accessory gene regulator types of Staphylococcus aureus isolated in Gorgan, North of Iran. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 8(4). p. DC07.
- BITRUS, A., PETER, O., ABBAS, M. & GONI, M. (2018). Staphylococcus aureus: a review of antimicrobial resistance mechanisms. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*. 4(2). p. 43-54.

- BJORLAND, J., STEINUM, T., KVITILE, B., WAAGE, S., SUNDE, M. & HEIR, E. (2005). Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *Journal of clinical microbiology*. 43(9). p. 4363-68.
- BLAIOTTA, G., ERCOLINI, D., PENNACCHIA, C., FUSCO, V., CASABURI, A., PEPE, O. & VILLANI, F. (2004). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. *Journal of applied microbiology*. 97(4). p. 719-30.
- BRACK, A. (1999). *Diccionario Enciclopédico de plantas útiles del Perú*. Cusco-Perú: Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas.
- BRASIL. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Brasil 2019. Disponível em: <
<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresentacao-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf> >. Acesso em: 24 de Abril 2021.
- BRAZAO, M.A., BRAZAO, F., GUILHERME, J. & MONTEIRO, M. (2014). Antibacterial activity of the Piper aduncum oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 13(6). p. 517-26.
- BRIDIER, A., SANCHEZ-VIZUETE, P., GUILBAUD, M., PIARD, J.C., NAÏTALI, M. & BRIANDET, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*. 45(Pt B). p. 167-78.
- BUDRI, P.E., SILVA, N.C., BONSAGLIA, E.C., JÚNIOR, A.F., JÚNIOR, J.A., DOYAMA, J.T., GONÇALVES, J.L., SANTOS, M., FITZGERALD-HUGHES, D. & RALL, V.L. (2015). Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *Journal of dairy science*. 98(9). p. 5899-904.
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3). p. 223-53.
- CAMPANA, R. & BAFFONE, W. (2018). Carvacrol efficacy in reducing microbial biofilms on stainless steel and in limiting re-growth of injured cells. *Food Control*. 90. p. 10-17.
- CAMPANA, R., CASETTARI, L., FAGIOLI, L., CESPI, M., BONACUCINA, G. & BAFFONE, W. (2017). Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 241. p. 132-40.
- CANO, C., BONILLA, P., ROQUE, M. & RUIZ, J. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Mintostachys mollis* (muña). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 25. p. 298-301.
- CARNEIRO, V.A., MELO, R.S., PEREIRA, A.M.G., AZEVEDO, Á.M.A., MATOS, M.N.C., CAVALCANTE, R.M.B., ROCHA, R.R., DE QUEIROZ ALBUQUERQUE, V., GUERRERO, J.A.P. & CATUNDA, F.E.A. (2020). *Essential Oils as an Innovative Approach against Biofilm of Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus*. In: *Bacterial Biofilms*. IntechOpen
- CECCHINI, M.E., PAOLONI, C., CAMPRA, N., PICCO, N., GROSSO, M.C., PEREZ, M.L., ALUSTIZA, F., CARIDDI, N. & BELLINGERI, R. (2021). Nanoemulsion of

- Minthostachys verticillata essential oil. In-vitro evaluation of its antibacterial activity. *Heliyon*. 7(1). p. e05896.
- CLSI, C.L.S.I. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Clinical Laboratory Standards Institute 2016.
- COLOMBARI, V., MAYER, M.D., LAICINI, Z.M., MAMIZUKA, E., FRANCO, B.D., DESTRO, M.T. & LANDGRAF, M. (2007). Foodborne outbreak caused by *Staphylococcus aureus*: phenotypic and genotypic characterization of strains of food and human sources. *Journal of Food Protection*. 70(2). p. 489-93.
- COLLERY, M.M., SMYTH, D.S., TUMILTY, J.J.G., TWOHIG, J.M. & SMYTH, C.J. (2009). Associations between enterotoxin gene cluster types egc1, egc2 and egc3, agr types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*. 58(Pt 1). p. 13-25.
- CONCEIÇÃO, T., COELHO, C., DE LENCASTRE, H. & AIRES-DE-SOUSA, M. (2016). High prevalence of biocide resistance determinants in *Staphylococcus aureus* isolates from three African countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60(1). p. 678-81.
- CONCEIÇÃO, T., DE LENCASTRE, H. & AIRES-DE-SOUSA, M. (2021). Prevalence of biocide resistance genes and chlorhexidine and mupirocin non-susceptibility in Portuguese hospitals during a 31-year period (1985-2016). *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 24. p. 169-74.
- CUCARELLA, C., SOLANO, C., VALLE, J., AMORENA, B., LASA, Í. & PENADÉS, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*. 183(9). p. 2888-96.
- CHAIBENJAWONG, P. & FOSTER, S.J. (2011). Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Archives of microbiology*. 193(2). p. 125-35.
- CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W., ZADERNOWSKA, A., NALEPA, B., SIERPIŃSKA, M. & ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł. (2014). Retail ready-to-eat food as a potential vehicle for *Staphylococcus* spp. harboring antibiotic resistance genes. *Journal of Food Protection*. 77(6). p. 993-98.
- CHEN, Q. & XIE, S. (2019). Genotypes, enterotoxin gene profiles, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* associated with foodborne outbreaks in Hangzhou, China. *Toxins*. 11(6). p. 307.
- CHIEFFI, D., FANELLI, F., CHO, G.-S., SCHUBERT, J., BLAIOTTA, G., FRANZ, C.M., BANIA, J. & FUSCO, V. (2020). Novel insights into the enterotoxigenic potential and genomic background of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Food microbiology*. 90. p. 103482.
- CHOI, N.Y., KIM, B.R., BAE, Y.M. & LEE, S.Y. (2013). Biofilm formation, attachment, and cell hydrophobicity of foodborne pathogens under varied environmental conditions. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 56(2). p. 207-20.
- CHOUHAN, S., SHARMA, K. & GULERIA, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*. 4(3). p. 58.
- CHUQUIMANGO FUENTES, S.P. **Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de piper angustifolium (matico) sobre cepas de staphylococcus aureus meticilino resistente y pseudomonas aeruginosa**. 2017. 74 (Bachiller en Medicina Humana). Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- DADGOSTAR, P. (2019). Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and drug resistance*. 12. p. 3903.

- DE OLIVEIRA, M.D.L.B., DE FRANÇA, T.A.R., CAVALCANTE, F.S.A. & LIMA, R.A. (2020). O GÊNERO Piper NO BRASIL: O ESTADO DA ARTE DA PESQUISA. *Biodiversidade*. 19(3). p.
- DE SOUSA, D.P., NÓBREGA, F.F., DE LIMA, M.R. & DE ALMEIDA, R.N. (2011). Pharmacological activity of (R)-(+)-pulegone, a chemical constituent of essential oils. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 66(7-8). p. 353-59.
- DENAYER, S., DELBRASSINNE, L., NIA, Y. & BOTTELDOORN, N. (2017). Food-borne outbreak investigation and molecular typing: high diversity of *Staphylococcus aureus* strains and importance of toxin detection. *Toxins*. 9(12). p. 407.
- DESAI, M.A., SONI, K.A., NANNAPANENI, R., SCHILLING, M.W. & SILVA, J.L. (2012). Reduction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and polystyrene surfaces by essential oils. *Journal of Food Protection*. 75(7). p. 1332-37.
- DEVI, K.P., NISHA, S.A., SAKTHIVEL, R. & PANDIAN, S.K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of ethnopharmacology*. 130(1). p. 107-15.
- DO NASCIMENTO MARTINEZ, L., DA SILVA RODRIGUES, F.L., DA SILVA, N.B., DOS SANTOS, E.V. & COSTA, J.D.A.N. (2020). AVALIAÇÃO ETNOBOTÂNICA DAS ESPÉCIES DAS FAMÍLIAS ASTERACEAE E LAMIACEAE UTILIZADAS COM POTENCIAL MEDICINAL NA REGIÃO DE PORTO VELHO–RONDÔNIA. *Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente*. 8(2). p. 431-45.
- DONAGHY, J.A., JAGADEESAN, B., GOODBURN, K., GRUNWALD, L., JENSEN, O.N., JESPER, A., KANAGACHANDRAN, K., LAFFORGUE, H., SEEFELDER, W. & QUENTIN, M.-C. (2019). Relationship of sanitizers, disinfectants, and cleaning agents with antimicrobial resistance. *Journal of Food Protection*. 82(5). p. 889-902.
- DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 15(2). p. 167-93.
- DOS SANTOS, A.L., SANTOS, D.O., DE FREITAS, C.C., FERREIRA, B.L.A., AFONSO, I.F., RODRIGUES, C.R. & CASTRO, H.C. (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 43(6). p. 413-23.
- DOS SANTOS RODRIGUES, J., DE SOUZA, N., SCARANO, J., DE SOUSA, J., LIRA, M., DE FIGUEIREDO, R., DE SOUZA, E. & MAGNANI, M. (2018). Efficacy of using oregano essential oil and carvacrol to remove young and mature *Staphylococcus aureus* biofilms on food-contact surfaces of stainless steel. *LWT*. 93. p. 293-99.
- EFSA. (2013). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal*. 11(5). p. 3196.
- EFSA. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. 16(12). p. 05500.
- ESTRELA, C., RIBEIRO, R.G., ESTRELA, C.R., PÉCOR, J.D. & SOUSA-NETO, M.D. (2003). Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Brazilian dental journal*. 14(1). p. 58-62.
- EUZEBY, J. **List of bacterial names with standing in nomenclature. 2019.** <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm> Acesso em. 21: 54 p. 2019.
- FEO, V.D., RICCIARDI, A.I., BISCARDI, D. & SENATORE, F. (1998). Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epl.(Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*. 10(1). p. 61-65.
- FERNÁNDEZ-FUENTES, M.A., ABRIOUEL, H., ORTEGA MORENTE, E., PÉREZ PULIDO, R. & GÁLVEZ, A. (2014). Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram

- positive bacteria from organic foods. *International Journal of Food Microbiology*. 172. p. 49-56.
- FITZPATRICK, F., HUMPHREYS, H. & O'GARA, J.P. (2005). Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*. 43(4). p. 1973-76.
- FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J., SZEWZYK, U., STEINBERG, P., RICE, S.A. & KJELLEBERG, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 14(9). p. 563-75.
- FOSTER, T.J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS microbiology reviews*. 41(3). p. 430-49.
- FRENCH, P. (2006). Dry matter intake and blood parameters of nonlactating Holstein and Jersey cows in late gestation. *Journal of dairy science*. 89(3). p. 1057-61.
- FRIEDRICZEWSKI, A.B. **Efeito da formação de biofilme por *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala sobre a sensibilidade a sanitizantes**. 2017. Universidade Federal de Pelotas
- GAO, S., LIU, G., LI, J., CHEN, J., LI, L., LI, Z., ZHANG, X., ZHANG, S., THORNE, R.F. & ZHANG, S. (2020). Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (*Cymbopogon flexuosus*) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* Species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10(810). p.
- GHAZNAVI-RAD, E. & EKRAMI, A. (2018). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates, isolated from a Burn Hospital in southwest Iran in 2006 and 2014. *International Journal of Microbiology*. 2018. p.
- GNANADHAS, D.P., MARATHE, S.A. & CHAKRAVORTTY, D. (2013). Biocides–resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert opinion on investigational drugs*. 22(2). p. 191-206.
- GOLONKA, E., FILIPEK, R., SABAT, A., SINCZAK, A. & POTEMPA, J. (2004). Genetic characterization of staphopain genes in *Staphylococcus aureus*. *Biological chemistry*. 385(11). p. 1059-67.
- GOMES-FERNANDES, M., LAABEI, M., PAGAN, N., HIDALGO, J., MOLINOS, S., HERNANDEZ, R.V., DOMÍNGUEZ-VILLANUEVA, D., JENKINS, A.T.A., LACOMA, A. & PRAT, C. (2017). Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections. *PloS one*. 12(4). p. e0175552.
- GRAPE, M., SUNDSTRÖM, L. & KRONVALL, G. (2003). Sulphonamide resistance gene sul3 found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52(6). p. 1022-24.
- GREEN, M.R. & SAMBROOK, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- GREENFIELD, R.A., SLATER, L.N., BRONZE, M.S., BROWN, B.R., JACKSON, R., IANDOLO, J.J. & HUTCHINS, J.B. (2002). Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. *The American journal of the medical sciences*. 323(6). p. 326-40.
- GROSS, M., CRAMTON, S.E., GÖTZ, F. & PESCHEL, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and immunity*. 69(5). p. 3423-26.

- GUIMARÃES, A.C. & MEIRELES, L.M. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules* 24(13). p.
- HANSON, B., DRESSLER, A., HARPER, A., SCHEIBEL, R., WARDYN, S., ROBERTS, L., KROEGER, J. & SMITH, T. (2011). Prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health*. 4(4). p. 169-74.
- HASSANZADEH, S., MASHHADI, R., YOUSEFI, M., ASKARI, E., SANIEI, M. & POURMAND, M.R. (2017). Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. *Microbial Pathogenesis*. 111. p. 71-74.
- HASSANZADEH, S., POURMAND, M.R., MASHHADI, R. & GHAZVINI, K. (2020). Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among Staphylococcus aureus; A systematic review. *Microbial pathogenesis*. 139. p. 103850.
- HAUBERT, L., KRONING, I., IGLESIAS, M. & PADILHA, W. (2017). First report of the Staphylococcus aureus isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene dfrG and transposon family Tn916-1545. *Microbial Pathogenesis*. 113. p. 242-47.
- HENNEKINNE, J.-A. (2018). *Staphylococcus aureus as a leading cause of foodborne outbreaks worldwide*. In: Staphylococcus aureus. Elsevier, p.129-46.
- HENNEKINNE, J.-A., DE BUYSER, M.-L. & DRAGACCI, S. (2012). Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. 36(4). p. 815-36.
- HOLEČKOVÁ, B., HOLODA, E., FOTTA, M., KALINÁČOVÁ, V., GONDOL, J. & GROLMUS, J. (2002). Occurrence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in food. *Ann Agric Environ Med*. 9. p. 179-82.
- IZANO, E.A., AMARANTE, M.A., KHER, W.B. & KAPLAN, J.B. (2008). Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 74(2). p. 470-76.
- JARRAUD, S., LYON, G., FIGUEIREDO, A., GÉRARD, L., VANDENESCH, F., ETIENNE, J., MUIR, T. & NOVICK, R. (2000). Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*. 182(22). p. 6517-22.
- JARRAUD, S., MOUGEL, C., THIOULOUSE, J., LINA, G., MEUGNIER, H., FOREY, F., NESME, X., ETIENNE, J. & VANDENESCH, F. (2002). Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and immunity*. 70(2). p. 631-41.
- JARRAUD, S., PEYRAT, M.A., LIM, A., TRISTAN, A., BES, M., MOUGEL, C., ETIENNE, J., VANDENESCH, F., BONNEVILLE, M. & LINA, G. (2001). egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in Staphylococcus aureus. *The Journal of Immunology*. 166(1). p. 669-77.
- JAVDAN, S., NARIMANI, T., ABADI, M.S.S. & GHOLIPOUR, A. (2019). Agr typing of Staphylococcus aureus species isolated from clinical samples in training hospitals of Isfahan and Shahrekord. *BMC Research Notes*. 12(1). p. 1-6.
- JENSEN, S.O. & LYON, B.R. (2009). Genetics of antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus. *Future Microbiology*. 4(5). p. 565-82.
- JIA, K., FANG, T., WANG, X., LIU, Y., SUN, W., WANG, Y., DING, T., WANG, J., LI, C. & XU, D. (2019). Antibiotic Resistance Patterns of Staphylococcus aureus Isolates from Retail Foods in Mainland China: A Meta-Analysis. *Foodborne Pathogens and Disease*. p.

- JIANG, H., CHENG, H., LIANG, Y., YU, S., YU, T., FANG, J. & ZHU, C. (2019). Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli* Isolates From *Penaeus vannamei* and Pork From Large Markets in Zhejiang, China. *Frontiers in Microbiology*. 10. p. 1787.
- JIMÉNEZ, J.N., OCAMPO, A.M., VANEGAS, J.M., RODRIGUEZ, E.A., MEDIAVILLA, J.R., CHEN, L., MUSKUS, C.E., VÉLEZ, L.A., ROJAS, C. & RESTREPO, A.V. (2012). CC8 MRSA strains harboring *scc mec* type *ivc* are predominant in Colombian hospitals. *PLoS One*. 7(6). p. e38576.
- JOHLER, S., LAYER, F. & STEPHAN, R. (2011). Comparison of virulence and antibiotic resistance genes of food poisoning outbreak isolates of *Staphylococcus aureus* with isolates obtained from bovine mastitis milk and pig carcasses. *Journal of Food Protection*. 74(11). p. 1852-9.
- JOHLER, S., MACORI, G., BELLIO, A., ACUTIS, P.L., GALLINA, S. & DECASTELLI, L. (2018). Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. *Journal of Dairy Science*. 101(4). p. 2915-20.
- JOSHI, S.G., PAFF, M., FRIEDMAN, G., FRIDMAN, G., FRIDMAN, A. & BROOKS, A.D. (2010). Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: a biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *American Journal of Infection Control*. 38(4). p. 293-301.
- KADARIYA, J., SMITH, T.C. & THAPALIYA, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed research international*. 2014. p.
- KADARIYA, J., THAPALIYA, D., BHATTA, S., MAHATARA, R.L., BEMPAH, S., DHAKAL, N. & SMITH, T.C. (2019). Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Healthy Adults Is more Common in Bhutanese Refugees in Nepal than Those Resettled in Ohio. *BioMed Research International*. 2019. p. 5739247.
- KAVANAUGH, N.L. & RIBBECK, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 78(11). p. 4057-61.
- KEHRENBERG, C. & SCHWARZ, S. (2001). Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. *FEMS microbiology letters*. 205(2). p. 283-90.
- KERNBERGER-FISCHER, I.A., KRISCHEK, C., STROMMINGER, B., FIEGEN, U., BEYERBACH, M., KREIENBROCK, L., KLEIN, G. & KEHRENBERG, C. (2018). Susceptibility of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates of various clonal lineages from Germany to eight biocides. *Applied and Environmental Microbiology*. 84(13). p.
- KERRN, M., KLEMMENSEN, T., FRIMODT-MØLLER, N. & ESPERSEN, F. (2002). Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 50(4). p. 513-16.
- KHADEMI, F., GHANBARI, F., MELLMANN, A., NAJAFZADEH, M.J. & KHALEDI, A. (2016). Phylogenetic relationships among *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples in Mashhad, Iran. *Journal of infection and public health*. 9(5). p. 639-44.

- KIKUVI, G., SCHWARZ, S., OMBUI, J., MITEMA, E. & KEHRENBURG, C. (2007). Streptomycin and chloramphenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolates from cattle, pigs, and chicken in Kenya. *Microbial drug resistance*. 13(1). p. 62-68.
- KIM, Y., KIM, H., BEUCHAT, L.R. & RYU, J.H. (2018). Development of non-pathogenic bacterial biofilms on the surface of stainless steel which are inhibitory to *Salmonella enterica*. *Food Microbiology*. 69. p. 136-42.
- KINGSHOTT, P., WEI, J., BAGGE-RAVN, D., GADEGAARD, N. & GRAM, L. (2003). Covalent attachment of poly (ethylene glycol) to surfaces, critical for reducing bacterial adhesion. *Langmuir*. 19(17). p. 6912-21.
- KITIS, M. (2004). Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment international*. 30(1). p. 47-55.
- KOREEN, L., RAMASWAMY, S.V., GRAVISS, E.A., NAIDICH, S., MUSSER, J.M. & KREISWIRTH, B.N. (2004). spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *Journal of clinical microbiology*. 42(2). p. 792-99.
- KRONING, I., HAUBERT, L., RAUBER, N., BARCELLOS, I., KLEIN, L., RAMIRES, T. & PADILHA, W. (2020). New spa types, resistance to sanitisers and presence of efflux pump genes in *Staphylococcus aureus* from milk. *International Dairy Journal*. 109. p. 104712.
- KRONING, I., IGLESIAS, M., SEHN, C., GANDRA, T., MATA, M. & DA SILVA, W. (2016). *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. *Food Microbiology*. 58. p. 105-11.
- KRONING, I.S., IGLESIAS, M.A., MENDONÇA, K.S., LOPES, G.V. & SILVA, W.P. (2018). Presence of Classical Enterotoxin Genes, agr Typing, Antimicrobial Resistance, and Genetic Diversity of *Staphylococcus aureus* from Milk of Cows with Mastitis in Southern Brazil. *Journal of Food Protection*. 81(5). p. 738-42.
- KURODA, M. et al. (2001). Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*. 357(9264). p. 1225-40.
- LABRECK, P.T. et al. (2018). Conjugative Transfer of a Novel Staphylococcal Plasmid Encoding the Biocide Resistance Gene, qacA. *Frontiers in Microbiology*. 9(2664). p.
- LANGSRUD, S., SIDHU, M.S., HEIR, E. & HOLCK, A.L. (2003). Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 51(4). p. 283-90.
- LASA, I. & PENADÉS, J.R. (2006). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in microbiology*. 157(2). p. 99-107.
- LAURA TICONA, J. (2019). Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*); muña (*Minthostachys mollis*) frente a *Staphylococcus aureus* y Coliformes fecales. p.
- LE LOIR, Y., BARON, F. & GAUTIER, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*. 2(1). p. 63-76.
- LETERTRE, C., PERELLE, S., DILASSER, F. & FACH, P. (2003). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 95(1). p. 38-43.
- LI, G., WU, S., LUO, W., SU, Y., LUAN, Y. & WANG, X. (2015a). *Staphylococcus aureus* ST6-t701 isolates from food-poisoning outbreaks (2006–2013) in Xi'an, China. *Foodborne Pathogens and Disease*. 12(3). p. 203-06.
- LI, L., FENG, W., ZHANG, Z., XUE, H. & ZHAO, X. (2015b). Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes and genotypes of coagulase-positive

- Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine mastitis. *BMC Veterinary Research*. 11. p. 168-75.
- LI, Q., SHERWOOD, J. & LOGUE, C. (2007). Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison. *Letters in applied microbiology*. 44(1). p. 86-91.
- LINDE, G.A., COLAUTO, N.B., ALBERTÓ, E. & GAZIM, Z. (2016). Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 18(1). p. 191-200.
- LISTER, J.L. & HORSWILL, A.R. (2014). Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 4. p. 178.
- LOCK, O., PEREZ, E., VILLAR, M., FLORES, D. & ROJAS, R. (2016). Bioactive compounds from plants used in Peruvian traditional medicine. *Nat Prod Commun*. 11(3). p. 315-37.
- LOCK, O. & ROJAS, R. (2004). Química y farmacología del *Piper aduncum* L. ("Matico"). *Revista de QUÍMICA*. 18(2). p. 27-32.
- LV, F., LIANG, H., YUAN, Q. & LI, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*. 44(9). p. 3057-64.
- MA, Y., ZHAO, Y., TANG, J., TANG, C., CHEN, J. & LIU, J. (2018). Antimicrobial susceptibility and presence of resistance & enterotoxins/enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *CyTA-Journal of Food*. 16(1). p. 76-84.
- MAIA, D.S.V., HAUBERT, L., KRONING, I.S., SOARES, K.D.S., OLIVEIRA, T.L. & DA SILVA, W.P. (2020). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning outbreaks and effect of *Butia odorata* Barb. Rodr. Extract on planktonic and biofilm cells. *LWT*. 117. p. 108685.
- MANTILLA GERMAN, S.F. & YUPANQUI ROJAS, E.K. (2018). Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Mintostachys mollis* "muña" sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. p.
- MARQUES, S.C., REZENDE, J.D.G.O.S., ALVES, L.A.D.F., SILVA, B.C., ALVES, E., ABREU, L.R.D. & PICCOLI, R.H. (2007). Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38(3). p. 538-43.
- MARTINEAU, F., PICARD, F.J., GRENIER, L., ROY, P.H., OUELLETTE, M. & BERGERON, M.G. (2000). Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46(4). p. 527-34.
- MC CARLIE, S., BOUCHER, C.E. & BRAGG, R.R. (2020). Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *Drug Resistance Updates*. 48. p. 100672.
- MEESILP, N. & MESIL, N. (2019). Effect of microbial sanitizers for reducing biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel by cultivation with UHT milk. *Food Science and Biotechnology*. 28(1). p. 289-96.
- MEREGHETTI, L., QUENTIN, R., MARQUET-VAN DER MEE, N. & AUDURIER, A. (2000). Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Appl Environ Microbiol*. 66(11). p. 5083-86.
- MERZ, A., STEPHAN, R. & JOHLER, S. (2016). *Staphylococcus aureus* isolates from goat and sheep milk seem to be closely related and differ from isolates detected from bovine milk. *Frontiers in Microbiology*. 7. p. 319.

- MIAO, J., LIN, S., SOTEYOME, T., PETERS, B.M., LI, Y., CHEN, H., SU, J., LI, L., LI, B. & XU, Z. (2019). Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* under food heat processing conditions: first report on CML production within biofilm. *Scientific reports*. 9(1). p. 1-9.
- MILLEZI, A.F., COSTA, K.A.D., OLIVEIRA, J.M., LOPES, S.P., PEREIRA, M.O. & PICCOLI, R.H. (2019). Antibacterial and anti-biofilm activity of cinnamon essential oil and eugenol. *Ciência Rural*. 49(1). p.
- MONTIRONI, I.D., CARIDDI, L.N. & REINOSO, E.B. (2016). Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Argentina de Microbiología*. 48(3). p. 210-16.
- MONZOTE, L., SCULL, R., COS, P. & SETZER, W.N. (2017). Essential oil from *Piper aduncum*: Chemical analysis, antimicrobial assessment, and literature review. *Medicines (Basel)*. 4(3). p. 49.
- MORENTE, E.O., FERNÁNDEZ-FUENTES, M.A., BURGOS, M.J.G., ABRIOUEL, H., PULIDO, R.P. & GALVEZ, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *International journal of food microbiology*. 162(1). p. 13-25.
- MOROCCO QUISPE, S.K. **Caracterización micro-histológico, físico y químico del aceite esencial de las hojas de matico (*Piper aduncum*), extraído por arrastre de vapor en un equipo modular**. 2017. 137 (Ingeniero Químico). Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Altiplano, Perú.
- MOSTACERO, J., MEJÍA, F. & GAMARRA, O. (2002). Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. *Volumen II Trujillo: Editora Normas Legales*. p. 868-70.
- MURAKAMI, K., MINAMIDE, W., WADA, K., NAKAMURA, E., TERAOKA, H. & WATANABE, S. (1991). Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 29(10). p. 2240-44.
- MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S. & PFALLER, M.A. (2017). *Microbiología médica*. Elsevier Health Sciences.
- NAZZARO, F., FRATIANNI, F., DE MARTINO, L., COPPOLA, R. & DE FEO, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*. 6(12). p. 1451-74.
- O'NEILL, E., POZZI, C., HOUSTON, P., SMYTH, D., HUMPHREYS, H., ROBINSON, D.A. & O'GARA, J.P. (2007). Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *Journal of clinical microbiology*. 45(5). p. 1379-88.
- OLONITOLA, O.S., FAHRENFELD, N. & PRUDEN, A. (2015). Antibiotic resistance profiles among mesophilic aerobic bacteria in Nigerian chicken litter and associated antibiotic resistance genes. *Poultry Science*. 94(5). p. 867-74.
- ONO, H.K., HIROSE, S., NAITO, I., SATO'O, Y., ASANO, K., HU, D.L., OMOE, K. & NAKANE, A. (2017). The emetic activity of staphylococcal enterotoxins, SEK, SEL, SEM, SEN and SEO in a small emetic animal model, the house musk shrew. *Microbiology and Immunology*. 61(1). p. 12-16.
- OTOYA, V.L. (2020). Consideraciones para el uso y estudio de la "muña" peruana *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb y *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling. *Ethnobotany Research and Applications*. 19. p. 1-9.
- OUMZIL, H., GHOULAMI, S., RHAJAOU, M., ILIDRISSI, A., FKI-H-TETOUBANI, S., FAID, M. & BENJOUAD, A. (2002). Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 16(8). p. 727-31.

- PANG, Y., BOSCH, T. & ROBERTS, M. (1994). Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. *Molecular and cellular probes*. 8(5). p. 417-22.
- PANTOSTI, A., SANCHINI, A. & MONACO, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. p.
- PAPARELLA, A., SERIO, A., ROSSI, C., MAZZARRINO, G. & LÓPEZ, C.C. (2018). *Food-Borne Transmission of Staphylococci*. In: Pet-To-Man Travelling Staphylococci. ed. Londres: Elsevier, p.71-94.
- PARIZZI, S.Q.F., ANDRADE, N.J.D., SILVA, C.A.D.S., SOARES, N.D.F.F. & SILVA, E.A.M.D. (2004). Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 47(1). p. 77-83.
- PEÑA, D. & GUTIÉRREZ, M. (2018). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre microorganismos frecuentes en vías respiratorias bajas. *Revista Ciencia y Tecnología*. 13(3). p. 55-66.
- PEREIRA, V., LOPES, C., CASTRO, A., SILVA, J., GIBBS, P. & TEIXEIRA, P. (2009). Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology*. 26(3). p. 278-82.
- PERIASAMY, S., JOO, H.-S., DUONG, A.C., BACH, T.-H.L., TAN, V.Y., CHATTERJEE, S.S., CHEUNG, G.Y. & OTTO, M. (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(4). p. 1281-86.
- PEROVIĆ, S., VEINOVIĆ, G. & ANTIĆ-STANKOVIĆ, J. (2018). A review on antibiotic resistance: origin and mechanisms of bacterial resistance as biological phenomenon. *Genetika*. 50(3). p. 1123-35.
- PICHERSKY, E., NOEL, J.P. & DUDAREVA, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*. 311(5762). p. 808-11.
- PINCHUK, I.V., BESWICK, E.J. & REYES, V.E. (2010). Staphylococcal enterotoxins. *Toxins*. 2(8). p. 2177-97.
- PINTO, D.M.L. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling**. 2010. 81 (Mestre). Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, Brasil.
- PINTO, R.M., SOARES, F.A., REIS, S., NUNES, C. & VAN DIJCK, P. (2020). Innovative strategies toward the disassembly of the EPS matrix in bacterial biofilms. *Frontiers in Microbiology*. 11. p. 952.
- RADICE, M., PIETRANTONI, A., GUERRINI, A., TACCHINI, M., SACCHETTI, G., CHIURATO, M., VENTURI, G. & FORTUNA, C. (2019). Inhibitory effect of *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. and *Piper aduncum* L. essential oils from Ecuador on West Nile virus infection. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 153(3). p. 344-51.
- RAHIMI, E. & ALIAN, F. (2013). Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. *Veterinarski arhiv*. 83(1). p. 23-30.
- RAPINI, L., TEIXEIRA, J., MARTINS, N., CERQUEIRA, M., SOUZA, M. & PENNA, C. (2004). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* sp. strains isolated from type" coalho" cheese. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 56(1). p. 130-33.
- RAUT, J.S. & KARUPPAYIL, S.M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*. 62. p. 250-64.

- REIS-TEIXEIRA, F.B.D., ALVES, V.F. & MARTINIS, E.C.P.D. (2017). Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48(3). p. 587-91.
- REYES-JURADO, F., MUNGUÍA-PÉREZ, R., CID-PÉREZ, T.S., HERNÁNDEZ-CARRANZA, P., OCHOA-VELASCO, C.E. & AVILA-SOSA, R. (2020). Inhibitory Effect of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) Essential Oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Typhimurium* Biofilm Formation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 4(36). p.
- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., ALONSO-CALLEJA, C., ONICIUC, E.A., CAPITA, R., GALLEGU, D., GONZÁLEZ-MACHADO, C., WAGNER, M., BARBU, V., EIROS-BOUZA, J.M., NICOLAU, A.I. & HERNÁNDEZ, M. (2018). Characterization of Biofilms Formed by Foodborne Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*. 9. p. 3004.
- RONNER, A.B. & WONG, A.C.L. (1993). Biofilm Development and Sanitizer Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-n Rubber. *Journal of Food Protection*. 56(9). p. 750-58.
- ROSENTHAL, C.B., MOOTZ, J.M. & HORSWILL, A.R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilm formation and inhibition. In: Antibiofilm Agents from Diagnosis to Treatment and Prevention. ed. Verlag Berlin Heidelberg: Springer Science & Business Media, p.233-55.
- ROUSSEL, S., FELIX, B., VINGADASSALON, N., GROU, J., HENNEKINE, J.-A., GUILLIER, L. & AUVRAY, F. (2015). *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France: comparison of different molecular typing methods, including MLVA. *Frontiers in Microbiology*. 6(882). p.
- ROY, A., PARK, H.-J., ABDUL, Q.A., JUNG, H.A. & CHOI, J.S. (2018). Pulegone Exhibits Anti-inflammatory Activities through the Regulation of NF- κ B and Nrf-2 Signaling Pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Natural Product Sciences*. 24(1). p. 28-35.
- SCHILCHER, K. & HORSWILL, A.R. (2020). Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 84(3). p.
- SCHMIDT-LEBUHN, A. (2008). Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Mintostachys* (Lamiaceae). *Journal of ethnopharmacology*. 118(3). p. 343-53.
- SCHMIEDER, R. & EDWARDS, R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiology*. 7(1). p. 73-89.
- SCHWARTZ, K., GANESAN, M., PAYNE, D.E., SOLOMON, M.J. & BOLES, B.R. (2016). Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Molecular microbiology*. 99(1). p. 123-34.
- SEIER-PETERSEN, M.A., NIELSEN, L.N., INGMER, H., AARESTRUP, F.M. & AGERSO, Y. (2015). Biocide susceptibility of *Staphylococcus aureus* CC398 and CC30 isolates from pigs and identification of the biocide resistance genes, *qacG* and *qacC*. *Microbial Drug Resistance*. 21(5). p. 527-36.
- SENATORE, F. (1998). Volatile constituents of *Mintostachys setosa* (Briq.) Epl.(Lamiaceae) from Peru. *Flavour and Fragrance Journal*. 13(4). p. 263-65.
- SHOPSIN, B., MATHEMA, B., ALCABES, P., SAID-SALIM, B., LINA, G., MATSUKA, A., MARTINEZ, J. & KREISWIRTH, B. (2003). Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(1). p. 456-59.

- SILVA, J.F.M., FEITOSA, A.C. & RODRIGUES, R.M. (2017). Staphylococcus aureus em alimentos. *DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins*. 4(4). p. 15-31.
- SINGH, G., BROOR, S. & AGARWAL, P. (2018). Molecular characterisation of Staphylococcus aureus using spa typing as a diagnostic tool in Haryana, India. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 36(1). p. 26.
- SLANY, M., OPPELT, J. & CINCAROVA, L. (2017). Formation of Staphylococcus aureus biofilm in the presence of sublethal concentrations of disinfectants studied via a transcriptomic analysis using transcriptome sequencing (RNA-seq). *Applied and environmental microbiology*. 83(24). p. e01643-17.
- SMITH, T.C. & PEARSON, N. (2011). The emergence of Staphylococcus aureus ST398. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 11(4). p. 327-39.
- SMYTH, D.S., HARTIGAN, P.J., MEANEY, W.J., FITZGERALD, J.R., DEOBALD, C.F., BOHACH, G.A. & SMYTH, C.J. (2005). Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPIbov are predominant among Staphylococcus aureus isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *Journal of Medical Microbiology*. 54(4). p. 401-11.
- SOUZA, V.C. & LORENZI, H.J. (2008). *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. Instituto Plantarum Nova Odessa.
- SPEZIALE, P. & PIETROCOLA, G. (2020). The multivalent role of fibronectin-binding proteins A and B (FnBPA and FnBPB) of Staphylococcus aureus in host infections. *Frontiers in Microbiology*. 11. p. 2054.
- SPEZIALE, P., PIETROCOLA, G., FOSTER, T.J. & GEOGHEGAN, J.A. (2014). Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 4. p. 171.
- STROMMINGER, B., KETTLITZ, C., WERNER, G. & WITTE, W. (2003). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus. *Journal of clinical microbiology*. 41(9). p. 4089-94.
- SUTCLIFFE, J., GREBE, T., TAIT-KAMRADT, A. & WONDRACK, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 40(11). p. 2562-66.
- TAHERI, N., ARDEBILI, A., AMOUZANDEH-NOBAVEH, A. & GHAZNAVI-RAD, E. (2016). Frequency of antiseptic resistance among Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolated from a university hospital in central Iran. *Oman Medical Journal*. 31(6). p. 426.
- TAN, L., LI, S.R., JIANG, B., HU, X.M. & LI, S. (2018). Therapeutic Targeting of the Staphylococcus aureus Accessory Gene Regulator (agr) System. *Frontiers in Microbiology*. 9(55). p.
- TANG, C., CHEN, J., ZHANG, L., ZHANG, R., ZHANG, S., YE, S., ZHAO, Z. & YANG, D. (2020). Exploring the antibacterial mechanism of essential oils by membrane permeability, apoptosis and biofilm formation combination with proteomics analysis against methicillin-resistant staphylococcus aureus. *International Journal of Medical Microbiology*. 310(5). p. 151435.
- TANG, J., ZHOU, R., SHI, X., KANG, M., WANG, H. & CHEN, H. (2008). Two thermostable nucleases coexisted in Staphylococcus aureus: evidence from mutagenesis and in vitro expression. *FEMS microbiology letters*. 284(2). p. 176-83.
- THOMAS, D., JARRAUD, S., LEMERCIER, B., COZON, G., ECHASSERIEAU, K., ETIENNE, J., GOUGEON, M.-L., LINA, G. & VANDENESCH, F. (2006). Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from

- recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infection and Immunity*. 74(8). p. 4724-34.
- THOMPSON, T.A. & BROWN, P.D. (2017). Association between the agr locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* model. *International Journal of Infectious Diseases*. 54. p. 72-76.
- TORRENEGRA-ALARCÓN, M., GRANADOS-CONDE, C., DURÁN-LENGUA, M., LEÓN-MÉNDEZ, G., YÁÑEZ-RUEDA, X., MARTÍNEZ, C. & PÁJARO-CASTRO, N. (2016). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*. *Orinoquia*. 20(1). p. 69-74.
- ULLOA, C.U., ZARUCCHI, J.L. & LEÓN, B. (2004). Diez años de adiciones a la flora del Perú: 1993-2003. p.
- VASCONCELOS, N., CRODA, J. & SIMIONATTO, S. (2018). Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microbial pathogenesis*. 120. p. 198-203.
- VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D., CABO, M.L. & RODRÍGUEZ-HERRERA, J.J. (2015). Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Food Science and Technology International*. 21(8). p. 559-70.
- VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D., HABIMANA, O. & HOLCK, A. (2013). Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. *Current Microbiology*. 66(2). p. 110-21.
- VERAS, H.N., RODRIGUES, F.F., BOTELHO, M.A., MENEZES, I.R., COUTINHO, H.D. & DA COSTA, J.G. (2014). Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the bacterium isolated from root canals. *ScientificWorldJournal*. 2014. p. 471580.
- VIÇOSA, G.N. (2012). Variabilidade genética e identificação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru e queijo frescal. p.
- VIÇOSA, G.N., LE LOIR, A., LE LOIR, Y., DE CARVALHO, A.F. & NERO, L.A. (2013). egc characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates obtained from raw milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 165(3). p. 227-30.
- WANG, D., ZHANG, L., YONG, C., SHEN, M., ALI, T., SHAHID, M., HAN, K., ZHOU, X. & HAN, B. (2017a). Relationships among superantigen toxin gene profiles, genotypes, and pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 100(6). p. 4276-86.
- WANG, W., BALOCH, Z., JIANG, T., ZHANG, C., PENG, Z., LI, F., FANNING, S., MA, A. & XU, J. (2017b). Enterotoxigenicity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from retail food in China. *Frontiers in Microbiology*. 8. p. 2256.
- WANG, X., WANG, X., WANG, Y., GUO, G., USMAN, T., HAO, D., TANG, X., ZHANG, Y. & YU, Y. (2014). Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. *Letters in Applied Microbiology*. 58(6). p. 527-34.
- WATTINGER, L., STEPHAN, R., LAYER, F. & JOHLER, S. (2012). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates associated with food intoxication with isolates from human nasal carriers and human infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 31(4). p. 455-64.
- WHO. **Global action plan on antimicrobial resistance 2015**. Switzerland WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 2019.

- WHO. Foodborne diseases. 2021. Disponível em: < https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1 >. Acesso em: 09/05/2021.
- WU, S., HUANG, J., WU, Q., ZHANG, F., ZHANG, J., LEI, T., CHEN, M., DING, Y. & XUE, L. (2018). Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated From Retail Vegetables in China. *Frontiers in Microbiology*. 9(1263). p.
- YANG, Q., LUO, J., LV, H., WEN, T., SHI, B., LIU, X. & ZENG, N. (2019). Pulegone inhibits inflammation via suppression of NLRP3 inflammasome and reducing cytokine production in mice. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 41(3). p. 420-27.
- ZAKI, M.E.S., BASTAWY, S. & MONTASSER, K. (2019). Molecular study of resistance of *Staphylococcus aureus* to antiseptic quaternary ammonium compounds. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 17. p. 94-97.
- ZAMAN, S.B., HUSSAIN, M.A., NYE, R., MEHTA, V., MAMUN, K.T. & HOSSAIN, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*. 9(6). p. e1403-e03.
- ZHANG, C., SHEN, Y. & DONG, M. (2013). Distribution, polymorphism and temporal expression of *egc* in *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in China. *Food Control*. 29(1). p. 279-85.
- ZOCHE, F. **Staphylococcus aureus enterotoxigênicos: PCR para detecção em queijo Minas Frescal e caracterização do agrupamento *egc* em isolados obtidos em alimentos de origem animal**. 2008. UFPEL
- ZOCHE, F., BASTOS, C.P. & SILVA, W.P.D. (2010). Detecção de genes do cluster *egc* em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal. *Ciência Rural*. 40(5). p. 1134-40.