



**MICHELLE CARLOTA GONÇALVES**

**PROTEÔMICA DE *ESCHERICHIA COLI*  
ENTEROPATOGÊNICA EM RESPOSTA AO  
CINAMALDEÍDO**

**LAVRAS-MG  
2021**

**MICHELLE CARLOTA GONÇALVES**

**PROTEÔMICA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICA EM RESPOSTA  
AO CINAMALDEÍDO**

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

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2021**

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

Gonçalves, Michelle Carlota.

Proteômica de *Escherichia coli* Enteropatogênica em resposta  
ao cinamaldeído / Michelle Carlota Gonçalves. - 2021.

85 p. : il.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.  
Bibliografia.

1. Bactéria patogênica. 2. Antimicrobiano natural. 3. Adaptação  
microbiana. I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Título.

**MICHELLE CARLOTA GONÇALVES**

**PROTEÔMICA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICA EM RESPOSTA  
AO CINAMALDEÍDO**

**PROTEOMICS OF ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* IN RESPONSE  
TO CINAMALDEHYDE**

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

APROVADA em 30 de setembro de 2021.

Dra. Elaine Maria Seles Dorneles UFLA

Dra. Alcilene de Abreu Pereira IFMG/BambuÍ

Dra. Angelica Cristina de Souza UFLA

Dra. Monique Suela Silva UFLA



Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2021**

*Aos meus pais Edmar e Maria Aparecida pelo amor incondicional.  
Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu a vida, que colocou este sonho em meu coração, me capacitou e proporcionou esta conquista em minha vida, o meu muito obrigada meu pai. “Eu tudo posso naquele que me fortalece!”

Aos meus pais Edmar e Maria Aparecida, por tanto amor a mim concedido, por acreditarem no meu sonho, por me apoiar e me dar estrutura para conquistar o mundo!

Aos meus irmãos Caroline, Guilherme e Lucas por todo amor, carinho, apoio e por acreditarem nos meus sonhos!

Ao meu namorado Ewerton, por estar ao meu lado em todos os momentos, inclusive nos mais difíceis e me acalmar durante o desespero.

Ao James, por tanto amor e por subir no meu notebook várias vezes me fazendo ver que era hora de dar uma pausa para relaxar!

Aos meus amados avós Vovô Joaquim, Vovó Aparecida e Vovó Chiquinha! Meus tesouros, gratidão eterna a vocês. E a todos os meus familiares que trilharam este ciclo comigo.

À minha querida orientadora e pessoa ímpar, Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, que desde o primeiro momento me acolheu, segurou minha mão para trilhar essa trajetória e enriqueceu de forma extraordinária minha vida com seus conhecimentos e principalmente, seu jeito humano de ser!

Aos meus amigos, ah que amigos! Tenho a certeza que são os melhores do mundo. São eles que fazem os momentos felizes serem mágicos e os difíceis se tornarem mais leves, obrigada por tudo! Não citarei nomes, porque eles sabem quem são!

Aos meus amigos e companheiros de laboratório! Agradeço pela união, pelos desafios e por cada conquista obtida nos experimentos. Espero que nos encontremos muitas vezes ainda, nesta aventura chamada vida!

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

Aos responsáveis e técnicos de todos os laboratórios que utilizei, em especial á Eliane pelo apoio e orações.

Ao programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, agradeço pelo crescimento profissional e pessoal obtidos. Bem como, a todas a pessoas que convivi e criamos relações sólidas, incluindo os docentes, técnicos e discentes.

Aos professores Dr. Octávio e Dr. Marcelo que me acolheram tão bem em Brasília para realização de experimento relacionado a tese e aos colegas que lá conheci e compartilhei esta trajetória, o meu muito obrigada cheio de gratidão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

À todos os pesquisadores brasileiros, que em meio a tanta desvalorização da ciência, exercem seu trabalho com dedicação e compromisso para com a sociedade.

Muito obrigada!

*“O Poderoso fez em mim maravilhas,  
e Santo é seu nome!  
A minha alma glorifica ao Senhor,  
Meu espírito exulta de alegria,  
em Deus, meu Salvador!  
Porque olhou para a sua pobre serva!”  
(Magnificat)*



## RESUMO

Este estudo analisou comparativamente a resposta adaptativa da bactéria patogênica *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) frente ao cinamaldeído, componente majoritário do óleo essencial de canela (*Cinnamomum cassia*) como alternativa aos antimicrobianos convencionalmente utilizados. Objetivou identificar quais proteínas, bem como mecanismos adaptativos estão envolvidas na resposta de EPEC ao estresse quando submetida a dose subletal do antimicrobiano favorecendo a adaptação da bactéria a doses antes consideradas letais. Após análises em nanoUPLC-MS<sup>E</sup> foram identificadas 196 proteínas distribuídas entre os grupos experimentais e dessas, 107 foram diferencialmente expressas, dentre as quais, 13 foram superexpressas ( $p > 0,05$ ) e 94 subexpressas ( $p < 0,05$ ) nas células adaptadas. Das proteínas reguladas positivamente, a maioria é citoplasmática e perfazem proteínas relacionadas a processos metabólicos celulares, como lipoproteína de ancoragem de peptídeoglicano (lpp), chaperona envolvidas na resposta ao estresse (ClpB; groL; ahpC), proteínas envolvidas na catálise de reações enzimáticas acelerando reações metabólicas (pgi; pflB; grcA; deoD; gapA; tdcE), metabolismo de carboidratos, aminoácidos (Cada), proteína envolvida na regulação da homeostase (trxA) e uma proteína que ainda não foi caracterizada (yfcZ). Enquanto isso, proteínas relacionadas a tradução, biossíntese lipídica, condensação cromossômica, processos biossintéticos da acetil-CoA, transporte de prótons acoplados a síntese de ATP, ligação de ácido nucleico, biossíntese de proteínas e de carboidratos e divisão celular foram reguladas negativamente, condizendo que agentes estressantes afetam os processos celulares, contribuindo para adaptação. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que EPEC apresentou alterações metabólicas significativas quando em presença do antimicrobiano cinamaldeído.

**Palavras-chave:** Bactéria patogênica. Antimicrobiano natural. Adaptação microbiana. MPLEx. Bioinformática. KEGG. Paintomics.

## ABSTRACT

This study comparatively analyzed the adaptive response of the pathogenic Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) against cinnamaldehyde, the major component of cinnamon essential oil (*Cinnamomum cassia*) as an alternative to conventionally used antimicrobials. It aimed to identify which proteins, as well as adaptive mechanisms, are involved in the EPEC response to stress when subjected to a sublethal dose of the antimicrobial, favoring the adaptation of the bacteria to doses previously considered lethal. After analysis in nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, 196 proteins were identified, distributed among the experimental groups, and of these, 107 were differentially expressed, among which 13 were overexpressed ( $p > 0.95$ ) and 94 underexpressed ( $p < 0.05$ ) in adapted cells. Of the up-regulated proteins, most are cytoplasmic and make up proteinase related to cellular metabolic processes, such as peptide-glycan anchoring lipoprotein (lpp), chaperone involved in the stress response (ClpB; groL; ahpC), proteins involved in the catalysis of enzymatic reactions accelerating metabolic reactions (pgi; pflB; grcA; deoD; gapA; tdcE), carbohydrate metabolism, amino acids (Cada), protein involved in the regulation of homeostasis (trxA) and a protein that has not yet been characterized (yfcZ). Meanwhile, translation-related proteinase, lipid biosynthesis, chromosomal condensation, acetyl-CoA biosynthetic processes, proton transport coupled to ATP synthesis, nucleic acid binding, protein and carbohydrate biosynthesis, and cell division were down-regulated, meaning that stressful agents affect cellular processes, contributing to adaptation. The results obtained in this study showed that EPEC presented significant metabolic alterations when in the presence of the antimicrobial cinnamaldehyde.

**Keywords:** Pathogenic bacteria. Natural antimicrobial. Microbial adaptation. MPLEx. Bioinformatics. KEGG. Paintomics.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>11</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Doenças Transmitidas por alimentos (DTA).....</b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b><i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3</b>	<b>Resposta bacteriana a estresse.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>Óleos essenciais, compostos majoritários a sua atividade antimicrobiana .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Cinamaldeído .....</b>	<b>27</b>
<b>3.5</b>	<b>Adaptação de bactérias a condições subletais .....</b>	<b>29</b>
<b>3.6</b>	<b>Proteômica.....</b>	<b>30</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Identificação de proteínas .....</b>	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO.....</b>	<b>42</b>
	<b>ARTIGO 1 - RESPOSTA PROTEICA DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGÊNICA SUBMETIDA AO ESTRESSE SUBLETAL DE CINAMALDEÍDO .....</b>	<b>42</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

As estimativas da carga de doenças transmitidas por alimentos são importantes para priorizar a política de inocuidade dos alimentos nos níveis nacional e internacional. Em 2015, o grupo de referência em epidemiologia da carga de doenças transmitidas por alimentos da Organização Mundial da Saúde (OMS / FERG) publicou as primeiras estimativas da carga global de doenças transmitidas por alimentos. Os resultados mostraram que, em 2010, 31 agentes patogênicos de origem alimentar e produtos químicos causaram 600 milhões de doenças e 420.000 óbitos (PIRES et al. 2015).

Dentre os casos de óbito, 121.455 foram causados pela bactéria *Escherichia coli* Enteropatogênica e crianças menores de 5 anos foram afetadas de forma desproporcional, sendo acometidas por cerca de 40% das doenças diarreicas e 43% das mortes associadas a doenças diarreicas, além de pessoas que vivem nas áreas mais pobres do mundo (PIRES et al. 2015).

*Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa da família Enterobacteriaceae, anaeróbia facultativa, presente na microbiota comensal do intestino da maior parte dos animais e seres humanos. Embora seja considerada não patogênica, são conhecidos seis patotipos que apresentam patogenicidade em diferentes graus, denominados *E.coli* Enteropatogênica (EPEC), *E.coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* Entero-hemorrágica (EHEC), *E.coli* Enteroagregativa (EA<sub>g</sub>EC), *E.coli* Enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* Difusamente Aderente (DAEC) (RAY; BHUNIA, 2014).

Dentre elas, EPEC destaca-se por causar elevado número de surtos em humanos em países como Inglaterra (SAKKEJHA et al. 2013), Índia (SHETTY et al. 2012), Venezuela (HANNAOUI et al. 2010), Brasil (FRANZOLIN et al. 2005; SPANO et al. 2008) e Nicarágua (VILCHEZ et al. 2009).

Ainda, EPEC foi relacionada a surtos de doenças transmitidas por alimentos como linguiça toscana (FRANCO, 2002), leite pasteurizado (SILVA et al. 2001), carne moída (BERNARDI et al. 2004), alface (MARTINS et al. 2010), água de consumo (CANIZALEZ-ROMAN et al. 2013) e queijo minas frescal (DIAS et al. 2012), sendo responsável por causar doenças diarreicas graves, afetando principalmente crianças e indivíduos imunocomprometidos (DIAS et al. 2012).

Além disso, infecção alimentar causada por EPEC é um problema emergente em indústrias alimentícias, devido ao desenvolvimento progressivo da adaptação microbiana a diversos antimicrobianos (GOUVEIA et al. 2016; HADJILOUKA et al. 2017; OLIVEIRA et al. 2012). Aliado a isto, a crescente preocupação dos consumidores em relação à saúde e à segurança alimentar tem impulsionado a busca por alternativas, surgindo assim, os agentes antibacterianos de origem natural, tais como os óleos essenciais e seus componentes majoritários, derivados de plantas, por apresentarem a atividade antimicrobiana desejada (BOZIK et al. 2018; BURT, 2004; OLIVEIRA et al. 2012; NAZZARO et al. 2013).

Os óleos essenciais são compostos aromáticos, lipofílicos, extraídos de toda parte da planta, oriundos do metabolismo secundário, sintetizados em resposta às diversas condições ambientais como forma de defesa, e com grande aplicação biotecnológica. A ação antimicrobiana apresentada pelos óleos essenciais não depende unicamente da composição química, mas também das propriedades lipofílicas, da solubilidade em água, da potência dos grupos funcionais e da mistura de compostos com diferentes propriedades bioquímicas (BURT, 2004).

O cinamaldeído (aldeído cinâmico ou 3-fenil-2-propenal), componente majoritário do óleo essencial de canela (*Cinamomun sp.*), um álcool terpeno cíclico, é o principal componente ativo do óleo essencial de canela (60-75%). A aprovação pela Food and Drug Administration (FDA) tem levado à ampla utilização em alimentos (LÓPEZ-MATA et al. 2017). Entretanto, o uso de concentrações subletais dos componentes majoritários como antimicrobianos pode levar à adaptação das células expostas a concentrações subletais, fornecendo proteção à subsequente exposição a esse estresse, gerando graves problemas relacionados à inocuidade dos produtos e à saúde do consumidor, além de causar danos econômicos para as indústrias alimentícias.

É plausível considerar que a capacidade para crescer na presença de substâncias tóxicas exige modificações na expressão de genes, ou seja, quando as células são expostas a condições de estresse, elas podem mudar seu perfil proteico, e isso pode contribuir para uma maior sobrevivência e resistência das células, aumentando a capacidade de *Escherichia coli* Enteropatogênica sobreviver a processamentos de alimentos.

A análise da expressão global do proteoma empregando-se a espectrometria de massas, permite observar proteínas (ou genes codificantes) envolvidas em processos dinâmicos que ocorrem após a perturbação de um dado estado fisiológico. A

comparação proteica das células antes e após a perturbação contribui para identificação das proteínas cuja expressão sofreu alteração significativa e permite obter informações sobre o seu possível envolvimento no processo biológico em apreciação.

Dentre as técnicas mais recentes, a cromatografia líquida em nano escala acoplada ao espectrômetro de massa *electrospray*, nanoUPLC/MS<sup>E</sup>, tem ganhado espaço na proteômica quantitativa para identificação de proteínas em nano escala (GEROMANOS et al., 2009; LI et al., 2009) e foi, portanto, empregada neste trabalho.

Diante do exposto, identificar as proteínas expressas por EPEC adaptada ao cinamaldeído em comparação com as proteínas expressas em células não adaptadas, se torna necessário para um maior entendimento de sua posterior sobrevivência ao antibacteriano, quando em dose letal.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar mudanças ocorridas no proteoma da bactéria *Escherichia coli* Enteropatogênica INCQS 00181 (CDC O55) adaptada ao componente majoritário cinamaldeído, utilizado como antimicrobiano em comparação com células não adaptadas.

### 2.1 Objetivos específicos

- Determinar a concentração mínima bactericida do componente majoritário de óleo essencial de *Cinnamomum cassia*, cinamaldeído, sobre EPEC;
- Avaliar a capacidade adaptativa do microrganismo á concentração subletal do componente majoritário cinamaldeído.
- Comparar a proteômica de *Escherichia coli* Enteropatogênica adaptada ao componente majoritário cinamaldeído com células não expostas, utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Doenças Transmitidas por alimentos (DTA)

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são importantes em todo o mundo e resultam em consideráveis taxas de morbidade e mortalidade (KIRK et al., 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que essas doenças afetem 33 milhões de pessoas e ocasionem 420.000 mortes a cada ano (WHO, 2015). Surto e casos esporádicos de DTA são ocorrências regulares em todos os países do mundo (KIRK et al., 2015). Nas últimas décadas, a globalização do comércio de alimentos facilitou a disseminação dos patógenos que causam DTA entre os diferentes países (COULOMBIER; TAKKINEN, 2013). Além disso, tem sido observado um aumento significativo das ocorrências de DTA, relacionado principalmente ao aumento no número de pessoas que consomem refeições fora de casa (CUNHA et al., 2017).

Segundo o Ministério da Saúde (2019a), doença transmitida por alimento é uma síndrome geralmente caracterizada por anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados. Já, o surto de DTA é definido como um episódio em que duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sinais/sintomas após ingerir alimentos e/ou água da mesma origem. Sabe-se que as doenças transmitidas por alimentos podem ser causadas por bactérias, vírus, parasitas, produtos químicos e príons (SCALLAN et al., 2011).

No Brasil, os principais agentes etiológicos responsáveis pelos surtos alimentares entre os anos de 2009 e 2018 foram, em ordem decrescente, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, Coliformes, Norovírus, Rotavírus, *Shigella*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e vírus da hepatite A (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a). Já nos Estados Unidos, os cinco principais patógenos associados às DTAs são Norovirus, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, outros patógenos importantes por normalmente causar hospitalizações são *Clostridium botulinum*, *Listeria*, *E. coli* e *Vibrio* (CDC, 2020a).

Embora haja estimativas sobre as ocorrências de DTAs em diferentes países do mundo, apenas uma pequena proporção dessas doenças é confirmada por testes de laboratório e relatada às agências de saúde pública (SCALLAN et al., 2011). Suspeita-se que, mesmo nos países desenvolvidos, apenas uma pequena fração do total de



incidências seja relatada. Em muitos casos, um indivíduo não procura um médico e, mesmo que o procure, a incidência pode não ser relatada às agências reguladoras. Assim, o verdadeiro ônus das DTAs permanece desconhecido (RAY; BHUNIA, 2014). Diante disso, é importante realizar estudos sobre os microrganismos que causam as DTAs, os principais sintomas e alimentos envolvidos, como por exemplo, a *Escherichia coli* Enteropatogênica.

### 3.2 *Escherichia coli* Enteropatogênica

*Escherichia coli* é uma bactéria capaz de causar significativas doenças, embora possa ser um residente inócuo do trato gastrointestinal de humanos (CROXEN et al., 2013). Segundo dados da OMS, *Escherichia coli* está entre os 4 maiores agentes causadores de doenças diarreicas em todo o mundo (WHO, 2015). *E. coli* foi o terceiro agente mais relacionado às ocorrências microbiológicas de *recalls* em diferentes partes do mundo entre 2008 e 2018, sendo responsável por 210 incidentes / *recalls* (SOON; BRAZIER; WALLACE, 2020).

*Escherichia coli* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbia facultativa, Gram-negativa, móvel, não esporulante, em forma de bastonetes e habitante normal do trato intestinal de humanos e animais de sangue quente e aves (RAY; BHUNIA, 2014). As cepas de *E. coli* patogênicas são divididas em seis grupos, com base em sua capacidade de produzir toxinas e aderir e invadir as células epiteliais do intestino: *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) (ou *E. coli* produtora da toxina Shiga – STEC), *E. coli* Enteroagregativa (EA<sub>g</sub>gEC ou EAEC) e *E. coli* Difusamente Adesiva (DAEC) (CDC, 2014; RAY; BHUNIA, 2014; YENI et al., 2016).

Em condições ótimas, pode se multiplicar em atividade de água (*aw*) acima de 0,95. A temperatura de crescimento varia de 7 a 48 °C, sendo 37 °C a temperatura ótima (VARNAM; EVANS, 1991). No entanto, diversos autores têm observado crescimento em alimentos de algumas cepas de *E. coli* a temperaturas menores, como 4 °C, por vários dias (GONZÁLEZ-MONTALVO et al., 2007).

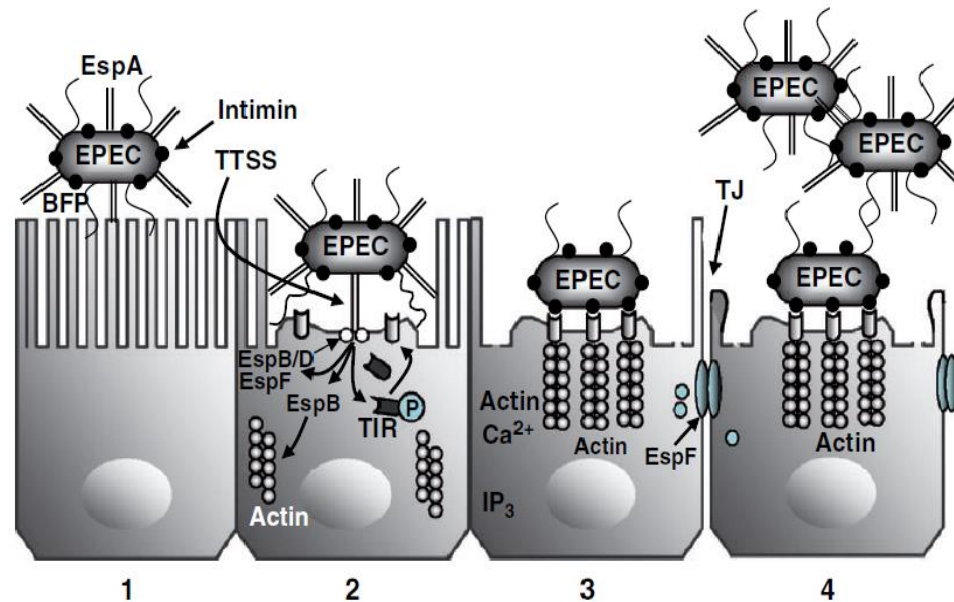
A espécie *E. coli* inclui cepas não virulentas, que têm como hábitat o trato entérico de humanos e animais saudáveis, e cepas altamente patogênicas, responsáveis por provocar surtos de doenças em humanos e animais com considerável taxa de mortalidade. A presença de cepas não patogênicas em alimentos indica contaminação

direta ou indireta de origem fecal, sendo considerado o indicador clássico da possível presença de microrganismos patogênicos. Contagens elevadas de *E. coli*, também, relacionam-se à falta de higiene e falhas no processamento de alimentos (RAY BHUNIA, 2014).

Cepas de *E. coli* Enteropatogênica (EPEC) não produzem toxinas, mas se ligam intimamente às células epiteliais intestinais, destruindo as vilosidades e ocasionando lesões e diarreia. Essas cepas estão associadas à ocorrência de diarreia infantil, sendo a ingestão de  $10^6$  a  $10^9$  células suficientes para desenvolver os sintomas, os quais podem aparecer em três horas. Os sintomas predominantes são gastroenterite, diarreia aquosa abundante, vômito e febre baixa (HERNANDES et al., 2009; OCHOA; CONTRERAS, 2011; RAY BHUNIA, 2014).

EPEC induz uma alteração histopatológica no intestino conhecida como lesão de aderência e eliminação (*attaching and effacing, A/E*). A colonização de EPEC acontece no intestino delgado, no qual a bactéria se fixa firmemente às células epiteliais, (KAPER; NATARO; MOBBLEY, 2004). Esta lesão, ilustrada na **Figura 1**, é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais e rearranjo do citoesqueleto celular, culminando na formação de estrutura semelhante a um pedestal no qual a bactéria permanece ligada (MOXLEY; SMITH, 2010). A formação de lesões A/E resulta na redução da capacidade de absorção de nutrientes pela mucosa intestinal, levando ao rompimento do equilíbrio eletrolítico e, posteriormente, à diarreia (SHAW et al., 2005).

**Figura 1** - Diagrama esquemático mostrando a seqüência de eventos para *E. coli* Enteropatogênica (EPEC) durante a infecção. Evento patogênico pode ser agrupado em quatro estágios: (1) expressão de fatores de adesão, (2) aderência localizada inicial, (3) transdução e contato íntimo e (4) rearranjo do citoesqueleto e formação do pedestal.



Fonte: Bhunia (2008).

A proteína intimina é necessária à adesão bacteriana da célula ao hospedeiro, enquanto a formação de tufo de pili é responsável pela aderência localizada, caracterizada pela habilidade da bactéria em formar microcolônias na superfície das células epiteliais intestinais pela auto-aglutinação das células (OCHOA et al., 2008). Cepas atípicas de EPEC não possuem o gene *bpfA*, formador de tufo de pili, apenas o gene *eae*, produtor de intimina (OCHOA et al., 2008).

Medidas para a prevenção desse patógeno incluem saneamento adequado, cozimento ou aquecimento a temperaturas apropriadas, refrigeração adequada e prevenção da contaminação cruzada em alimentos prontos para o consumo, sanitização de produtos frescos (RAY; BHUNIA, 2014). Além disso, compreender as formas que o microrganismo responde a condições de estresse é fundamental.

### 3.3 Resposta bacteriana a estresse

As bactérias estão amplamente distribuídas na natureza, colonizando tanto superfícies do ambiente quanto de organismos (PHILIPPOT et al. 2010). Contudo, sua distribuição não é homogênea, grupos bacterianos se distribuem em diferentes

proporções e especificidades nos diferentes ambientes naturais (PHILIPPOT et al. 2010). Embora as células bacterianas possam ser movidas facilmente, por ação biótica ou abiótica, sua fixação numa população depende da capacidade de competir por recursos (BORER et al. 2018). Outro fator que exerce um importante filtro seletivo para fixação das espécies numa população é a capacidade de se manter viável frente ao conjunto de condições adversas do ambiente colonizado (FIERER et al. 2003; SCHIMEL et al. 2007).

Um estado de estresse é uma condição que limite a proliferação de uma população bacteriana que na ausência da condição estressante se desenvolveria rapidamente (PAPADIMITRIOU et al. 2016). Um estresse pode ser causado por escassez de nutrientes necessários para o funcionamento do metabolismo celular (WANG et al. 2011). Esse aporte nutricional insuficiente interfere na homeostase celular tendo impactos na composição enzimática, vias metabólicas e morfologia da célula. Na natureza esta é a condição mais frequente a qual as células estão submetidas (NYSTRÖM 2004).

No estresse causado por agentes físico-químico, moléculas presentes no meio intra ou extracelular podem modificar propriedades bioquímicas de componentes celulares sensíveis (COTTER; HILL 2003; LEBEER et al. 2008; PAPADIMITRIOU et al. 2016). Essas modificações resultariam em redução da eficiência com que tais componentes exercem sua função biológica levando a um comprometimento da homeostase celular. Para manter a funcionalidade das vias metabólicas afetadas pela condição de estresse, a célula passa por modificações na constituição dos seus componentes celulares e características fisiológicas que em conjunto configuram o padrão de resposta celular ao estresse (WANG et al. 2011).

Devido a redução de recursos investidos no processo de crescimento e divisão, células sob estresse apresentam um crescimento lento ou mesmo ausente (HECKER; VÖLKER, 2001). Em culturas laboratoriais, cultivos em condições estressantes podem influenciar no tempo de duração da fase lag, fase em que há o ajuste fisiológico da célula às condições do meio, resultando em maior tempo nessa fase e atraso de entrada na fase de crescimento exponencial (ROLFE et al. 2012).

O cold shock domain (CSD), é um dos domínios de ligação a ácidos nucleicos mais conservados entre bactérias, plantas e animais (WOLFFE, 1994). Em bactérias estas proteínas estão relacionadas a vários eventos celulares, incluindo adaptação a baixas temperaturas, crescimento celular, fase estacionária e carência nutricional.

*Escherichia coli* possui proteínas relacionadas ao domínio CSD, as CspC e CspE são produzidas constitutivamente a 37 °C e CspD é a única induzida durante a fase estacionária (PHADTARE; YAMANAKA; INOUE, 2000).

Em ambientes que não suportam o crescimento bacteriano, o rápido aumento no número de células e o metabolismo eficiente alcançados na fase exponencial provocam um acúmulo de metabólitos tóxicos e o esgotamento das fontes nutricionais, que conseqüentemente levam estes microrganismos a atingirem a fase estacionária. A fase estacionária é caracterizada por cessamento de crescimento e a perda da capacidade reprodutiva diminui progressivamente (NYSTRÖM, 2004). Bactérias de vida livre estão a maior parte do tempo nesta fase do crescimento, dada a baixa disponibilidade de nutrientes em determinados ambientes (BROOKS; BUCHANAN, 2010).

Na fase estacionária, as células de *E. coli* se tornam mais resistente a uma série de estresses ambientais, como por exemplo: choque ao calor, estresse oxidativo, condições de pH ácido e variações osmóticas. Essa proteção em grande parte é obtida via um único regulador de transcrição, o fator sigma S (BROOKS; BUCHANAN, 2010; NYSTRÖM, 2004). A resposta ao estresse em geral em *E. coli* é regulada por um fator sigma alternativo ( $\sigma^s$ ), que é codificado pelo gene *rpoS*. O fator  $\sigma^s$  regula a expressão de mais de 50 genes e responde a vários tipos de estresses, como a entrada na fase estacionária, choque osmótico e choque ácido. Foi demonstrado recentemente que em *E. coli*, CspC estabiliza o Mrna de *rpoS* e também interage com Hfq, um dos principais reguladores de *rpoS* (NOGUEIRA, SPRINGER, 2000; COHEN-OR et al., 2010).

Organismos aeróbios utilizam o oxigênio para respiração e oxidação de nutrientes. Produtos reativos de oxigênio, como radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH\cdot$ ) são gerados constantemente em células em crescimento aeróbio, afetando macromoléculas (DNA, lipídeos e proteínas) (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000). Para enfrentar estas espécies reativas de oxigênio (ROS) as bactérias aumentam a expressão de enzimas de detoxificação e proteínas de reparo de DNA. A resposta coordenada ao estresse oxidativo em bactérias ocorre principalmente através de dois reguladores, OxyR e SoxR, sendo que o primeiro responde ao estresse provocado por peróxido de hidrogênio e o segundo responde ao estresse induzido por ânion superóxido (LUSHCHAK, 2010).

Em *E. coli* e outras bactérias, está presente OxyR, um fator de transcrição sensível a peróxido de hidrogênio. OxyR regula a expressão de várias proteínas

envolvidas na resposta a estresse oxidativo, incluindo catalase e glutatona redutase (MONGKOLSUK, HELMANN, 2002).

A forma mais comum de adaptação contra qualquer tipo de estresse em bactérias é modificar o fator sigma utilizado em combinação com o cerne da RNA polimerase. Os fatores sigmas são divididos em duas grandes famílias denominadas família sigma 70 e família sigma 54. A família sigma 70 é dividida em duas subfamílias: a subfamília do sigma 70 e a subfamília ECF (função extra citoplasmática). Esta classificação é feita com base na homologia entre as sequências e estrutura encontrada entre os sigmas ECF e a família dos sigmas 70 (BASHYAM, HASNAIN, 2004).

Fatores sigma ECF são importantes reguladores de resposta a estresse em bactéria e estão envolvidos na regulação da expressão de proteínas presentes na membrana externa ou no espaço periplasmático (BROOKS, BUCHANAN, 2010).

Quanto a limitação de nutrientes, muitas bactérias respondem produzindo um pequeno mensageiro denominado ppGpp (guanosina tetrafosfato). O ppGpp age como regulador global da expressão de genes em bactérias. Foi proposto que este pequeno nucleotídeo é capaz de provocar um redirecionamento na transcrição, facilitando a transcrição de genes importantes para sobrevivência em carência nutricional e outros estresses e desfavorecendo a transcrição de genes envolvidos no crescimento e proliferação celular. Em *E. coli* duas proteínas regulam a produção de ppGpp, RelA e SpoT. SpoT é capaz de sintetizar e hidrolisar ppGpp, já RelA apenas sintetiza (KIM et al., 2010).

Em *E. coli*, CspD age como um inibidor de replicação de DNA e apresenta um importante papel em estresse por carência nutricional (YAMANAKA et al., 2001). Estudos mostraram que *cspD* em *E. coli* é regulado por um sistema de toxina/antitoxina (MqsR/MqsA) (KIM et al., 2010). Sistemas toxina/antitoxina (TA) normalmente são compostos por um par de genes localizados em um operon e são responsáveis por codificar uma toxina, que pode provocar morte celular devido à interrupção de processos celulares essenciais para as bactérias, e uma antitoxina que pode se ligar à toxina e neutralizar esta atividade (KIM et al., 2010).

É comum em bactérias que genes de proteínas envolvidos numa mesma via metabólica ou num mesmo estado fisiológico sejam corregulados. Essa corregulação é o resultado de um mesmo circuito regulatório, onde a transcrição é modulada por um mesmo fator  $\sigma$  (BINDER et al. 2016). O fator  $\sigma^{70}$ , por exemplo, é o responsável pela expressão de genes de metabolismo básico, genes das proteínas do processo de

replicação, transcrição, tradução, metabolismo energético entre outros (BINDER et al. 2016). Por outro lado, fatores  $\alpha$  alternativos possuem regulons mais específicos (PAGET, 2015). Em *E. coli* os fatores  $\alpha^{24}$ ,  $\alpha^{28}$  e  $\alpha^{54}$  são responsáveis por iniciar a transcrição de genes envolvidos na integridade do envelope celular (RUIZ AND SILHAVY 2005), na formação de flagelo (CLARET et al. 2007) e no metabolismo de nitrogênio (REITZER, 2003), respectivamente.

Na natureza, as células bacterianas podem ser expostas a grande variedade de formas de estresse, inclusive simultaneamente. Em organismos modelos como *E. coli*, foi demonstrado que as respostas celulares a diferentes condições de estresse se sobrepõem em determinado ponto. Esse ponto de sobreposição é o componente comum a toda as condições de estresse e foi denominado de resposta geral a estresse (GSR) (BATTESTI et al. 2011).

A GSR possui elementos regulatórios centrais que são ativados independentemente da condição de estresse. Diferentes circuitos resultam na ativação da GSR juntamente com os componentes de resposta específica a condição de estresse. Efeito comum da GSR é a redução da expressão do regulon de  $\alpha^{70}$  em favorecimento de regulons de fatores  $\sigma$  alternativos. Em organismos modelos foi descoberto que os genes envolvidos na GSR são majoritariamente componentes de regulons de fatores  $\alpha$  alternativos específicos, em *E. coli* é o fator  $\alpha^S$  (BATTESTI et al. 2011).

Diferentes mecanismos regulam esses fatores  $\alpha$  alternativos e sua maioria são mecanismos de controle pós-transcricionais. Independente do modelo, esses fatores  $\alpha$ , e por tanto a GSR, são mantidos sobre forte controle negativo em condições favoráveis ao crescimento. Quando um determinado estresse surge e dispara um circuito regulatório, os mecanismos de repressão desses fatores  $\alpha$  são aliviados e a GSR é ativada. No caso de  $\alpha^S$ , diferentes circuitos regulatório convergem para diminuir a repressão desses fatores  $\alpha$  (BATTESTI et al. 2011).

Embora a GSR seja um importante mecanismo de resposta da célula, não é a única via de resposta generalista da célula a condições de estresse. A resposta estrigente tem se mostrado outro importante mecanismo regulatório em condições de estresse. A resposta estrigente é caracterizada pela produção do alarmônio ppGpp(p) pelas proteínas Rel A ou Spo T. O alarmônio produz um efeito pleiotrópico na célula aumentando a força de promotores de fatores  $\sigma$  alternativos, como  $\alpha^S$ , e reduzindo a eficiência de promotores de  $\alpha^{70}$ . A resposta estrigente atua diminuindo a eficiência da formação do complexo da RNA polimerase com  $\alpha^{70}$  favorecendo a formação da

holoenzima RNA polimerase com fatores  $\alpha$  alternativos. A ativação da resposta restrigente leva a uma intensificação do circuito da GSR. Enquanto a resposta restrigente tem sido amplamente descrita em diversos grupos bacterianos, fatores  $\alpha$  específicos associados a condições de estresse não foram descobertos em todos os organismos (BATTESTI et al. 2011).

É sabido que microrganismos sofrem diversos estresses quando expostos as mais diversas condições na indústria alimentícia, porém, estes expressam diferentes proteínas de sobrevivência aos mesmos, principalmente quando expostos a dose subletal, comprometendo a inocuidade do produto e conseqüentemente, a saúde do consumidor. Com isso, alternativas aos conservantes/sanificantes tradicionalmente usados na indústria, têm sido buscadas e os óleos essenciais, bem como seus compostos majoritários são alternativas eficazes.

### **3.4 Óleos essenciais, compostos majoritários a sua atividade antimicrobiana**

Cada vez mais, os consumidores têm dado preferência aos alimentos seguros, prontos para o consumo (minimamente processados) e que provoquem pouco ou nenhum impacto à saúde e ao meio ambiente (SOARES et al., 2009). Nesta perspectiva, o mercado de produtos naturais, como os óleos essenciais, com potencial de aplicação na conservação de alimentos, tem ganhado força frente aos adeptos dos aditivos químicos sintéticos.

A Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, conceitua os óleos essenciais como produtos voláteis de origem vegetal, obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor d'água, destilação à pressão reduzida ou outro método adequado) (BRASIL, 2007).

Os óleos essenciais são compostos líquidos, complexos, bioativos, voláteis, com odor e cor característicos, formados a partir de metabólitos secundários de plantas, presentes em todos os órgãos desta, como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas e cascas. Eles são formados principalmente por classes de ésteres de ácidos graxos, mono e sesquiterpenos, terpenos, fenilpropanonas e álcoois aldeidados (BAKALLI et al., 2008).

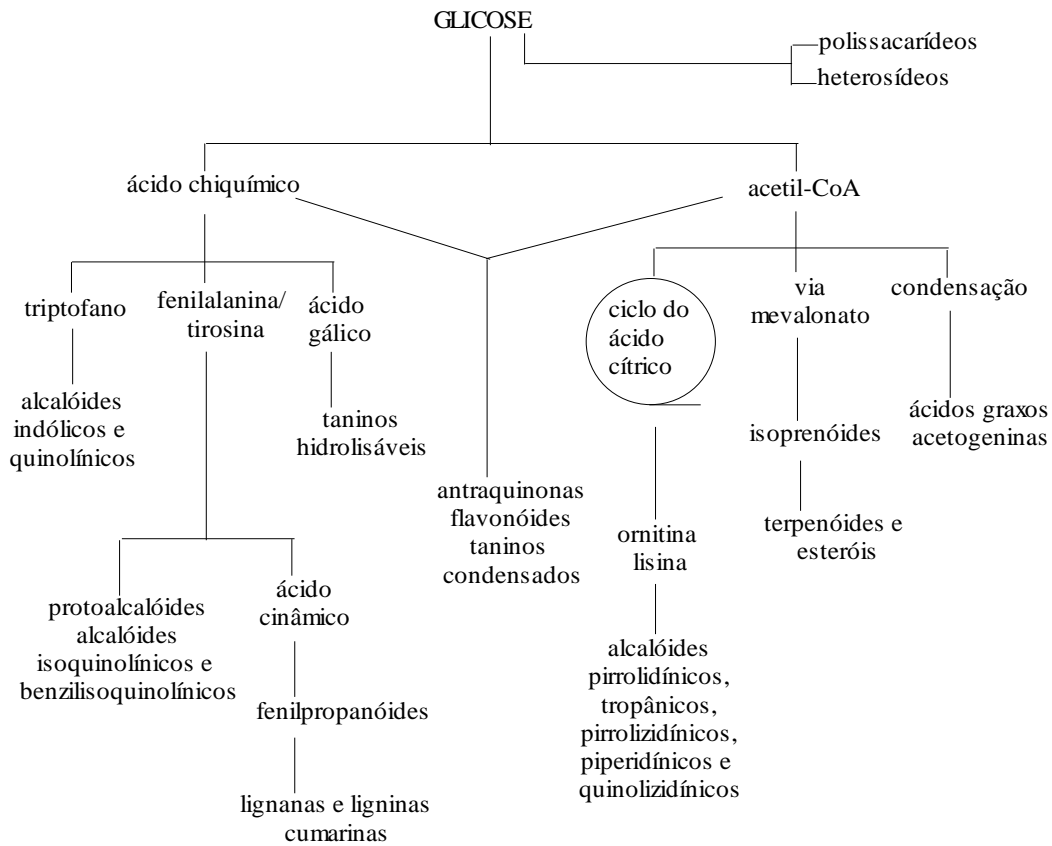
Há mais de seis mil anos suas propriedades medicinais já eram conhecidas pelos egípcios, mas somente a partir da Idade Média, com a descoberta de suas propriedades antimicrobianas, os óleos essenciais passaram a ser extraídos e comercializados pelos



Árabes, que teriam sido os primeiros a desenvolverem métodos como o arraste a vapor e a hidrodestilação, para obtenção destes compostos (BAKALLI et al., 2008). Os óleos essenciais de plantas medicinais contêm cerca de 20-60 componentes em concentrações variadas, têm de dois a três componentes principais, denominados majoritários, em concentrações bastante elevadas, quando comparados com outros componentes (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

Componentes majoritários de óleos essenciais, tornaram-se alternativa para controlar o crescimento de microrganismos devido às suas propriedades antibacterianas, as quais são oriundas da hidrofobicidade dos constituintes químicos. A lipofilicidade dos componentes majoritários permite sua interação com lipídeos na membrana celular, afetando sua permeabilidade e causando alterações na estrutura celular (COSTA et al., 2011).

Nas células, os metabólitos secundários são sintetizados a partir do acetil-CoA, ácido chiquímico, ácido mevalônico e metileritrol fosfato, que são intermediários da via glicolítica. O ácido chiquímico é sintetizado a partir da combinação de um intermediário da glicólise (fosfoenolpiruvato) com um componente da via das pentose-fosfato (eritrose-4-fosfato). Sua via leva à formação dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, que são precursores dos metabólitos secundários aromáticos, como alcaloides, ácido cinâmico, fenilpropanoides e ligninas. A condensação de três moléculas de acetil-CoA origina o ácido mevalônico, enquanto a combinação do piruvato com o gliceraldeído 3-fosfato (via glicolítica), forma o metileritrol fosfato. A via biossintética do metileritrol fosfato, juntamente com a via do mevalonato, origina os esteróis e os terpenoides (**Figura 2**) (DEWICK, 2009; SANTOS, 2004).

**Figura 2** - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários em plantas.

Fonte: Santos (2004).

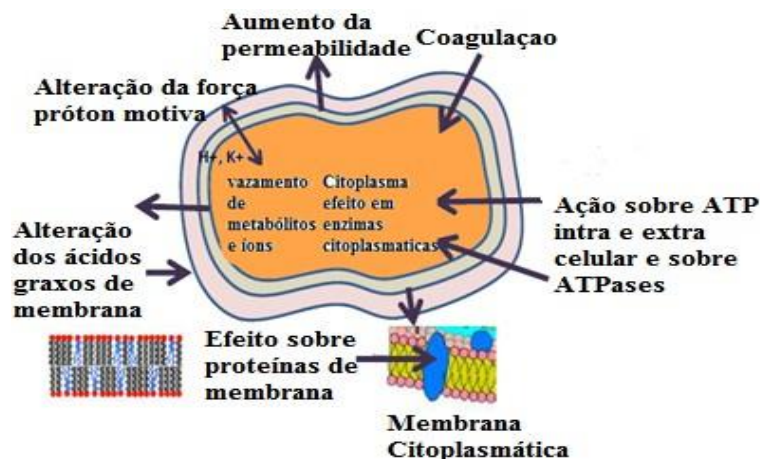
Os derivados do fenilpropanoide são determinantes da atividade biológica contra os microrganismos patogênicos (AKTHAR; DEGAGA; AZAM, 2014; PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006), além de outros constituintes aromáticos e alifáticos caracterizados por baixo peso molecular. Os terpenos são o maior grupo de constituintes naturais de plantas, apresentando grande variedade de tipos estruturais e compostos relevantes (DEGENHARDT; KOLLNER; GERSHENZON, 2009).

Os constituintes do grupo dos terpenos são hidrocarbonetos de fórmula geral  $(C_5H_8)_n$ , formados a partir de unidades de isopreno. Estes compostos podem ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos ou tricíclicos (ABED, 2007). Com base na diversidade da estrutura química, são classificados em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20). A maioria dos componentes de óleos essenciais é de monoterpenos e perfaz, aproximadamente, 90% dos óleos essenciais, sendo estes voláteis e com odor agradável (BAKKALI et al., 2008).

Embora os metabólitos secundários encontrem-se presentes em baixas concentrações nas plantas, a maioria deles, tais como alcaloides, antocianinas, esteroides, flavonoides, quinonas e óleos essenciais, têm sido alvo de inúmeras pesquisas por possuírem diversas aplicações, inclusive nas indústrias alimentícias, como antimicrobianos. Esses compostos apresentam ampla diversidade em estruturas e tamanhos, sendo encontrados e distribuídos por todo o reino vegetal (SANTOS, 2004).

Ressalta a importância de se entender sobre o mecanismo de ação dos óleos essenciais (OLIVEIRA, 2012), dado que este é exercido pelas mutações morfológicas e funcionais da estrutura celular (BURT, 2004). Sobre as bactérias, ocorre a degradação da parede celular, que com o rompimento desta barreira permeável, são comprometidas suas funções celulares, incluindo regulação metabólica e manutenção do estado energético, dentre outras (NAZZARO et al., 2013). Os mecanismos de ação de óleos essenciais e de seus componentes são ilustrados na **Figura 3**.

**Figura 3** - Mecanismos de ação dos óleos essenciais sobre células microbianas.



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

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais é uma característica importante destes compostos que já foi relatada, *in vitro*, em inúmeros trabalhos (BURT, 2004; COELHO, 2014; OLIVEIRA, 2012; PAGNOSSA, 2016). Dessa forma, estudos vêm sendo realizados sobre o emprego de óleos essenciais no controle de microrganismos em alimentos (MARTINS, 2010; OLIVEIRA et al., 2013).

Relatos de pesquisas indicam que bactérias gram-positivas são mais vulneráveis aos óleos essenciais e seus componentes que bactérias gram-negativas, devido à estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas, principalmente pela presença de lipoproteínas e lipopolissacarídeos, que atuam como barreira aos compostos

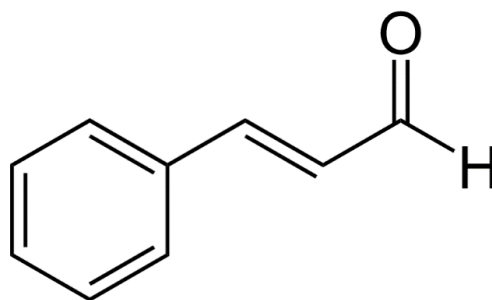
hidrofóbicos. No entanto, isso não significa que as bactérias gram-positivas sejam sempre mais suscetíveis (BURT, 2004).

A eficácia dos óleos essenciais, bem como de seus compostos majoritários frente aos microrganismos contaminantes de alimentos que causam adversidades à saúde humana e prejuízos financeiros aos setores agroindustriais foram e estão sendo comprovadas cientificamente, possibilitando assim, o uso como antimicrobianos e/ou sanitizantes. Porém, conhecer a forma com que os microrganismos sobrevivem quando expostos a estes agentes é extremamente necessário a fim de se criar medidas de controle dos mesmos.

### 3.4.1 Cinamaldeído

O cinamaldeído pertence a subfamília de compostos orgânicos denominada fenilpropanóides que são sintetizados a partir do precursor do aminoácido fenilalanina nas plantas. Os fenilpropanóides têm seu nome devido ao grupo fenol aromático de seis carbonos e à cauda de propeno de três carbonos do ácido cinâmico, produzido na primeira etapa da biossíntese de fenilpropanóide. O fenilpropenos constituem uma parte relativamente pequena dos óleos essenciais, dentre os quais o cinamaldeído é um dos fenilpropanóides mais estudados (PAULI; KUBECZKA, 2010), sua estrutura pode ser observada na **Figura 4**.

**Figura 4** - Estrutura química do cinamaldeído.



Fonte: Da autora (2021).

A atividade antimicrobiana de fenilpropenos depende do tipo e número de substituintes no anel aromático, das cepas microbianas selecionadas, e os parâmetros de teste experimentais, como a escolha de meio de crescimento, temperatura, etc. (PAULI; KUBECZKA, 2010).

O cinamaldeído parece bastante efetivo contra bactérias. Os grupos aldeído são

reativos e têm a capacidade de fazer ligações cruzadas covalentemente com DNA e proteínas por meio de grupos amina, interferindo assim em sua função normal (FERON et al., 1991).

Acredita-se que pelo menos três coisas ocorram: em baixas concentrações, cinamaldeído inibe diferentes enzimas envolvidas na citocinese ou funções celulares menos importantes. Em concentrações subletais, atua como um inibidor de ATPase, e em concentrações letais, ele perturba a membrana celular. Foi estabelecido que o cinamaldeído se liga à proteína FtsZ, inibindo sua polimerização dependente de GTP e, assim, evitando divisão (DOMADIA et al., 2007; HEMAISWARYA et al., 2011). Outras enzimas, por exemplo, a histidina descarboxilase, também é inibido pelo cinamaldeído (WENDAKOON; MORIHIKO, 1995).

Em concentrações subletais, o cinamaldeído ganha acesso a periplasma e inibe a atividade da ATPase transmembrana. As concentrações subletais de cinamaldeído não afetaram a integridade da membrana externa de *E. coli*, mas inibiu o crescimento e bioluminescência de *Photobacterium leiognathi*, indicando que o cinamaldeído ganha acesso ao periplasma e possivelmente também o citoplasma (HELANDER et al., 1998).

A habilidade de cinamaldeído para acessar o periplasma foi confirmado pela demonstração de diminuição na atividade ATPase de membranas celulares isoladas em concentrações crescentes de cinamaldeído (13,6–1362 µg / mL) (GILL; HOLLEY, 2006a, b). A inibição da ATPase foi, no entanto, sugerida não ser a principal causa de morte celular porque a concentração necessária para inibir a ATPase também resultou em ruptura de membrana de células de *E. coli* (681–1362 µg /mL; GILL; HOLLEY, 2006a).

Estudos demonstraram que o cinamaldeído interage com a membrana celular, mas ainda não está claro como ele perturba as membranas. Não é um modo geral de ação do cinamaldeído para romper as membranas, conforme ilustrado por Di Pasqua et al. (2007).

O cinamaldeído altera o perfil lipídico da membrana com grande aumento em ácidos graxos saturados, produzindo uma membrana mais rígida, provavelmente, compensando um efeito fluidificante do cinamaldeído na estrutura celular de *E. coli*, *S. enterica*, *P. fluorescens* e *B. thermosphacta*, enquanto apenas *S. aureus* demonstrou desintegração do envelope celular (DI PASQUA et al., 2006, 2007).

O óleo essencial de *Cinnamomum verum* (73% cinamaldeído) causou despolarização da membrana, perda de integridade da membrana, redução da atividade

respiratória e coagulação do material citoplasmático de *P. aeruginosa*, (BOUHDID et al., 2010).

### 3.5 Adaptação de bactérias a condições subletais

Os mecanismos de resposta ao estresse sofrido pelos microrganismos têm recebido atenção nos últimos anos devido à preocupação com a segurança microbiológica de alimentos (AARESTRUP; WEGENER; COLLIGNON, 2008). A adaptação microbiana a desinfetantes e/ou agentes antimicrobianos tem sido relatada (AGUIAR et al., 2015; COELHO, 2014; PAGNOSSA, 2016). Embora vários métodos para a redução da contaminação microbiana nos alimentos tenham sido desenvolvidos e aplicados nas indústrias de processamento, bactérias respondem prontamente a condições adversas de crescimento (YOON et al., 2015).

Diversos mecanismos de resposta adaptativa são relatados, tornando as bactérias capazes de tolerar tensões ambientais. O estresse subletal induz o condicionamento do microrganismo ao fator estressor, tornando-o fisiologicamente mais tolerante a níveis aumentados do estresse ou proteção cruzada a outros estressores (WANG; GILL; YANG, 2014; SMIGIC et al., 2009). Na maioria dos casos, a adaptação bacteriana a condições estressantes, como exposição a antimicrobianos, resulta no endurecimento da membrana citoplasmática pela modificação na cadeia de ácidos graxos (WANG; GILL; YANG, 2014; YOON et al., 2015).

Na presença de concentrações subletais de óleos essenciais ou outros compostos antimicrobianos, os microrganismos aumentam a expressão de proteínas de resposta ao estresse, reparando as proteínas danificadas. No entanto, quando a concentração de agentes antimicrobianos naturais é mais elevada, esta resposta torna-se incapaz de prevenir a morte celular (BURT et al., 2004; LAMBERT et al., 2001).

Antimicrobianos são utilizados em indústrias alimentícias no intuito de garantir a inocuidade dos produtos produzidos. Com isso, a adaptação bacteriana a esses fatores podem causar impacto significativo na saúde humana, bem como drásticas consequências econômicas.

Em trabalho realizado por Gonçalves (2017), *Escherichia coli* Enteropatogênica INCQS 00181 (CDC O55), a mesma cepa utilizada neste estudo, apresentou capacidade adaptativa ao componente cinamaldeído por crescer em concentração de até duas vezes mais (0,25%) o valor da concentração mínima bactericida, (CMB) 0,125%, após exposta

a concentração subletal de 1/8 CMB. Trabalhos posteriores se fazem necessários a fim de compreender quais proteínas a bactéria expressa em resposta a essa condição estressante.

Há estudos proteômicos na literatura relacionados a resposta de *E.coli* ao estresse (BOZIK et al. 2018; DU et al. 2021), porém, estudos relatando a proteômica de *Escherichia coli* Enteropatogênica adaptada ao cinamaldeído são inexistentes.

### 3.6 Proteômica

As proteínas são polímeros de aminoácidos resultantes da tradução das informações genéticas contida no DNA das células. Em virtude da abundância de funções que elas realizam, as proteínas exercem um papel primordial em quase todos os fenômenos biológicos, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (NELSON & COX, 2005; BRAGA EMÍDIO et al. 2015).

O termo proteoma se origina das palavras proteínas e genoma e foi proposto em 1995, por Wasinger e colaboradores, para proteínas de *Mycoplasma genitalium* e se refere ao complemento proteico do genoma (WASINGER et al., 1995). A proteômica é a ciência que estuda as proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo (WILKINS et al., 1996).

O genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da vida, enquanto que o proteoma é altamente variável e dinâmico. Com a análise proteômica é possível saber se um gene está sendo expresso, calcular a concentração relativa desse produto e estudar de forma descritiva e quantitativa o conjunto de proteínas de uma organela celular ou ecossistemas, considerando suas variações em uma população, mudanças em resposta a um ambiente ou resultantes do desenvolvimento normal ou alterado. É possível também estimar modificações ou interações com outras proteínas, além de poder quantificar proteínas que são expressas em diferentes estágios de vida de um microrganismo ou em diferentes condições experimentais (ARMIROTTI; DAMONTE, 2010).

De maneira geral, as metodologias empregadas em proteômica podem ser classificadas como “*bottom-up*” ou “*top-down*”. O primeiro, também denominado “*shotgun*”, inclui separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após digestão trípica de soluções proteicas complexas, seguida de análise por espectrometria

de massas (“mass spectrometry”, MS). Contrariamente, o “*top down*”, é um processo no qual as proteínas intactas (e não seus peptídeos derivados) são submetidas à análise por MS (ARMIROTTI; DAMONTE, 2010).

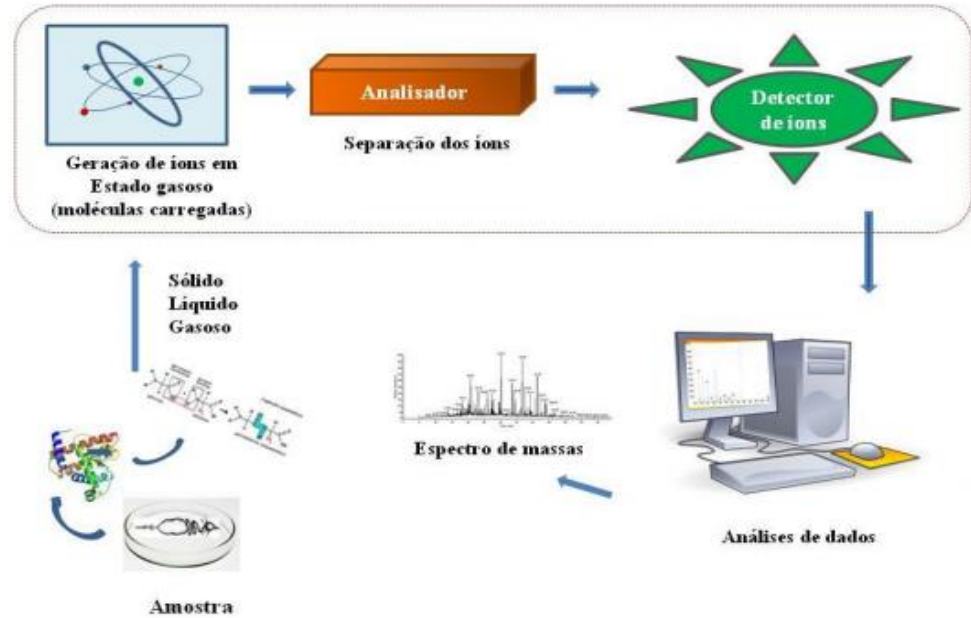
Nos últimos anos, os métodos de análise proteômica, particularmente na identificação de proteínas baseada em MS, vem sendo amplamente aperfeiçoada em virtude dos avanços na instrumentação, na preparação das amostras e nas análises computacionais. O que representava um grande desafio há uns anos atrás em relação ao sequenciamento e a identificação de uma proteína individual, atualmente, a identificação e a quantificação de grande parte das proteínas expressas são realizáveis em um único experimento (WALSH et al., 2010; WALTHER; MANN, 2010).

Entre as técnicas proteômicas que permitem separar proteínas de misturas complexas, estão a gel-free baseada no fracionamento por cromatografia líquida (LC), a eletroforese unidimensional (1D-PAGE) e bidimensional (2D-PAGE) acopladas a espectrometria de massas (SINHA; MANN, 2020).

A espectrometria de massa é uma técnica central, que possibilita a análise simultânea de diversas proteínas em uma mesma amostra. Esta técnica é rápida, acurada e extremamente sensível, requerendo pouca quantidade de amostra (BARBOSA et al., 2012; SINHA; MANN, 2020). O espectrômetro de massa é composto por: uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massa que medem a relação entre a massa e a carga ( $m/z$ ) de moléculas ionizadas e um detector que registra o número de íons de cada valor de  $m/z$  (GUMIEL ROCHA, 2016), (**Figura 5**).



**Figura 5** - A metodologia de estudo proteômico envolve extração de proteínas da amostra, separação por cromatografia líquida, ionização, análise e detecção de peptídeos e análise de dados.



Fonte: Gumiel Rocha (2016).

### 3.6.1 Identificação de proteínas

Muitas ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas para a identificação automatizada de peptídeos a partir de nano LC-MS/MS. Esses programas podem ser classificados em duas formas: a busca em um banco de dados (Peptide spectrum match, PSM) e o sequenciamento de novo (*de novo sequencing*) (ZHANG, 2012). A pesquisa automatizada em um banco de dados (Uniprot, NCBI, etc) é extensamente utilizada na proteômica. Nesta categoria de busca encontram-se os programas Mascot (PERKINS et al., 1999), Sequest (ENG et al, 1994), MaxQuant (COX; MANN, 2008).

Neste trabalho foi utilizado o software ProteinLynx Global Server (PLGS) para processamento dos espectros obtidos e realizando-se a comparação com o banco de dados de *Escherichia coli* (NCBI). Posteriormente, as proteínas foram separadas de acordo com a sua função celular utilizando as bases de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes e PaintOmics 3.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C.; COLLIGNON, P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 6, n. 5, p. 733-750, 2008.
- ABED, K. F. Antimicrobial activity of essential oils of some medicinal plants from Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 14, n. 1, p. 53-60, 2007.
- AGUIAR, J. J. S. et al. Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. **European Journal of Integrative Medicine**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 151-156, 2015.
- AKTHAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, Tyler, v. 2, p. 1-7, 2014.
- ARMIROTTI, A.; DAMONTE, G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. **Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 81-94, 2010.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, B.E.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G.M.; HENRIQUE, T.; TROVÓ DE MARQUI, A.V.; TAJARA, E.H. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, 366-375, 2012.
- BASHYAM, M. D.; HASNAIN, S. E. The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 301-308, 2004.
- BATTESTI, A.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, n. 1, p.189–213.2011.
- BERNARDI, E.; ARMAS, R.D.; CALDEIRA, M.F.; RIBEIRO, G.A. Caracterização microbiológica e sorológica de linhagens de *Escherichia coli*, isoladas de carne moída comercializada em Pelotas, RS. **Higiene Alimentar**. v. 18, n. 125, p. 82-86, 2004.
- BINDER, S.C.; ECKWEILER, D.; SCHULZ, S.; BIELECKA, A.; NICOLAI, T.; FRANKE, R.; HAUSSLER, S.; MEYER-HERMANN, M. Functional modules of sigma factor regulons guarantee adaptability and evolvability. **Scientific Reports**, v. 6, n.22212, p. 1-11, 2016.
- BORER, B.; TECON, R.; OR, D. Spatial organization of bacterial populations in response to oxygen and carbon counter-gradients in pore networks. **Nature Communications**, v. 9, n. 769, p. 1-11, 2018.
- BOZIK, M. et al. Stress response of *Escherichia coli* to essential oil components – insights on low-molecular-weight proteins from MALDI-TOF. **Scientific Reports**, v.8, n.1, p.1-9, Aug.2018.

BRAGA EMIDIO, N. et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 4, p. 101–111, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 2**, de 15 janeiro de 2007. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Brasília, DF, 2007. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9a67750047457f218ac0de3fbc4c6735/RDC\\_2\\_2007.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9a67750047457f218ac0de3fbc4c6735/RDC_2_2007.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 15 Ago 2020.

BROOKS, B. E.; BUCHANAN S. K. Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. **Biochimica and Biophysica acta**, v. 1178, n. 9, p.1930–1945, 2009.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 3-8, 2000.

CANIZALEZ-ROMAN, A.; GONZALEZ-NUÑEZ, E.; VIDAL, J.E.; FLORES-VILLASEÑOR, H.; LEÓN-SICAIROS, N. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 1, p.36-45, 2013.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. *E. coli (Escherichia coli)*. 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>. Acesso em: 04 de jul. 2021.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Foodborne Germs and Illnesses**. 2020a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>. Acesso em: 04 de jul. 2021.

CLARET, L. et al. The Flagellar Sigma Factor FliA Regulates Adhesion and Invasion of Crohn Disease-associated *Escherichia coli* via a Cyclic Dimeric GMPdependentPathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 16, n. 282, p. 33275–33283, 2007.

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

COHEN-OR, I. et al. CspC regulates *rpoS* transcript levels and complements *hfq* deletions. **Research in Microbiology**, v. 161, n.8, p. 694-700, 2010.

COTTER, P.D.; HIL, C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 67, n. 3, p.429–453, 2003.

COULOMBIER, D.; TAKKINEN, J. From national to international—challenges in cross-border multi-country, multi-vehicle foodborne outbreak investigations. **European Communicable Disease Bulletin**, v. 18, n. 11, p. 20423, 2013.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, v. 26, n.12, p.1367-1372, 2008.

CROXEN, M. A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

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

CUNHA, F. P. L. et al. *Shigella* sp: um problema de saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 264/265, 2017.

DEGENHARDT, J.; KOLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 70, p. 1621-1637, 2009.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3<sup>rd</sup> ed. London: J. Wiley, 2009. 546 p.

DIAS, M. T. et al. Molecular characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of enteropathogenic *E-coli* (EPEC) isolated from minas soft cheese. **Ciencia E Tecnologia De Alimentos**, v. 32, n. 4, p. 747-753, 2012.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v.54, n. 7, p. 2745–2749,2006.

DI PASQUA, R. et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, 55, 4863–4870, 2007.

DOMADIA, P. et al. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 831–840, 2007.

DU, GAO-FEI. Et al. Proteomic Investigation of the Antibacterial Mechanism of *trans*-Cinnamaldehyde against *Escherichia coli*. **Journal Proteome Research**, v. 20, n. 5, p. 2319-2328, 2021.

ENG, J.K.; MCCORMACK, A.L.; YATES, J.R.; An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 5, n. 11, p. 976–89, 1994.

FERON, V. J. et al. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. **Mutatiton Research**, v. 259, n.3-4, p. 363–385, 1991.

FIERER, N.; SCHIMEL, J.P.; HOLDEN, P.A. Influence of Drying-Rewetting Frequency on Soil Bacterial Community Structure. **Microbial Ecology**, v. 45, n.1, p. 63–71.2003.

FRANCO, R.M. *Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na grande Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana [tese]. Niterói (RJ). Universidade Federal Fluminense; 2002. 153 p.

FRANZOLIN, M.R. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 359-63, 2005.

GEROMANOS, S. J. et al. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. **Proteomics**. v. 9, n. 6, p. 1683-1695, 2009.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1–9, 2006a.

GILL, A. O., HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 2, p.170–174, 2006b.

GONÇALVES, M. C. et al. **Adaptação e adaptação cruzada de *Escherichia coli* enterotoxigênica e enteropatogênica a componentes majoritários de óleos essenciais e ao estresse ácido**. 2017. 61 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

GONZÁLEZ-MONTALVO, B. et al. Influence of oxygen exclusion and *Escherichia coli* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical**, v. 76, n. 2, p. 201-209, 2007.

GOUVEIA, A. R. et al. The antimicrobial effect of rosemary and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* in sous vide cook-chill beef during storage. **Procedia Food Science**, v. 7, p. 173-176. 2016.

GUMIEL ROCHA, M. X. **Identificação da microbiota bacteriana e análise proteômica de trato digestivo de triatomíneos: aspectos da infecção por tripanosomatídeos**. 2016. 183 p. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Rio de Janeiro, 2016.

HADJILOUKA, A. et al. Effect of lemongrass essential oil on *Listeria monocytogenes* gene expression. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 510-516, 2017.

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

HANNAOUI, E. Diarrheagenic *Escherichia coli* associated with acute diarrhea in children of Cumaná, **Investigación Clínica**, v. 51, n. 4, p. 489-500, 2010.

HECKER, M.; VOLKER, U. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. **Advances in Microbial Physiology**. v. 44, n.1, p. 35–91, 2001.

- HELANDER, I. M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gramnegative bacteria. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590–3595, 1998.
- HEMAISWARYA, S. et al. Phenylpropanoids inhibit protofilament formation of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1317–1325, 2011.
- HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, n. 2, p. 137–149, 2009.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, v. 2, n. 1, p. 123-140, 2004.
- KIM, Y. et al. *Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 1105-1121, 2010.
- KIRK, M. D. et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 12, p.e1001921, 2015.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v.72, n. 4, p.728–764, 2008.
- LI, G. Z. et al. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1696-1719, 2009.
- OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropatogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 478-483, 2011.
- LÓPEZ-MATA, M.A. et al. Mechanical, barrier and antioxidant properties of chitosan films incorporating cinnamaldehyde. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p.1–10, 2017.
- LUSHCHAK, V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 175-190, 2010.
- MARTINS, A. G. L. A. et al. Antibacterial activity of essential basil oil against serogroups of enteropa Thogenic *Escherichia coli* isolated from lettuce. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 8, p. 1791-1796, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Informe 2018. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Maio de 2019a. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf>. Acesso em: 25 de jun 2020.

MONGKOLSUK, S.; HELMANN J.D. Regulation of inducible peroxide stress responses. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 9-15, 2002.

MOXLEY, R. A.; SMITH, D. R. Attaching-effacing *Escherichia coli* Infections in Cattle. **Veterinary Clinics of Food Animal**, Philadelphia, v. 26, n. 1, p. 29-56, 2010.

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

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger's Principles of Biochemistry** (4th ed.). New York, New York: W. H. Freeman and Company; 2005.

NYSTROM, T. Stationary-Phase Physiology. **Annual Review Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 161–181, 2004.

NOGUEIRA, T.; SPRINGER, M. Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria. **Current Opinion in Microbiology Approach**, v. 3, n. 2, p. 154-158, 2000.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 5, p. 821-832, 2012.

PAGET, M. Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1245–1265, 2015.

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

PAPADIMITRIOU, K. et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v.80, n. 3, p. 837–890, 2016.

PAULI, A.; KUBECZKA, K. H. Antimicrobial properties of volatile phenylpropanes. **Natural Products Communications**, v. 5, n. 9, p.1387–1394, 2010.

PERKINS, D.N. et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-67, 1999.

PHADTARE, S.; YAMANAKA, K.; INOUE, M. The cold shock response. **EcoSal Plus**, v. 3, n. 1, p.33-45, 2000.

PHILIPPOT, L. et al. The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 523–529, 2010.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

PIRES, S. et al. **Global and regional incidence and mortality of diarrheal diseases commonly transmitted through food**: estimates from the WHO foodborne epidemiology reference group. Oregon: International Association for Food Protection, 2015. Disponível em: <<https://iafp.confex.com/iafp/2015/webprogram/Paper8778.html>>. Acesso em: 05 Abril. 2020.

RAY, B.; BHUNIA, A. **Fundamental Food Microbiology**. 5th edition. Taylor & Francis Group. CRC Press. 2014.

REITZER, L. Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. **Annual Review Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 155–176, 2003.

ROLFE, M.D. et al. Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 686–701, 2012.

RUIZ, N.; SILHAVY, T. J. Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n.2, p. 122–126, 2005.

SAKKEJHA, H.; BYRNE, L.; LAWSON, A.J.; JENKINS C. An update on the microbiology and epidemiology of Enteropathogenic *Escherichia coli* in England 2010-2012. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 1531-1534, 2013.

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

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SCHIMMEL J.; BALSER T. C.; WALLENSTEIN M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1386–1394, 2007.

SHAW, R. K. et al. Interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1243-1251, 2005.

SHETTY, V. A. et al. Prevalence and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adults and children in Mangalore, India. **Journal of Laboratory Physicians**. v. 4, n. 1, p. 24-29, 2012.

SINHA, A.; MANN, M. A beginner's guide to mass spectrometry-based proteomics. **Biochemistry**, v. 42, n. 5, p.64-69, 2020.

SILVA, Z.N. et al. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista Saude Publica**, v. 35, n. 4, p. 375-379, 2001.



- SMIGIC, N. et al. Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 with lactic acid, neutralized electrolyzed oxidizing water and chlorine dioxide followed by growth under sub-optimal conditions of temperature, pH and modified atmosphere. **Food Microbiology**, Cambridge, v. 26, n. 6, p. 629-637, 2009.
- SOARES, N. F. F. et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 370-378, 2009.
- SOON, J. M.; BRAZIER, A. K. M.; WALLACE, C. A. Determining common contributory factors in food safety incidents – A review of global outbreaks and recalls 2008–2018. **Trends in Food Science and Technology**, v. 97, p.76-87, 2020.
- SPANO, L.C. et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n.3, p. 359-63, 2008.
- VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. Temperature on pathogenic bacteria levels and sensory characteristics of packed. **Foodborne pathogens**, v. 17, n. 5, p. 383-388, 2006.
- VILCHEZ, S. et al. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 630-637, 2009.
- WALSH, G.M. et al. Mass spectrometry-based proteomics in biomedical research: emerging Technologies and future strategies. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 12, n. 30, p.1-28, 2010.
- WALTHER, T.C.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. **The Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 4, p. 491-500, 2010.
- WANG, Y. et al. Starvation induces physiological changes that act on the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 342–350, 2011.
- WANG, H.; GILL, C. O.; YANG, X. Development of a real-time PCR procedure for quantification of viable *Escherichia coli* in populations of *E. coli* exposed to lactic acid, and the acid tolerance of verotoxigenic *E. coli* (VTEC) from cattle hides. **Food Control**, v. 43, n. 1, p. 104-109, 2014.
- WASINGER, V. C. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma Genitalium*. **Electrophoresis**, v.16, n. 7, p.1090-1094, 1995.
- WENDAHOON, C. N.; MORIHIKO, S. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 3, p.280–283, 1995.
- WHO. **WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases**. 2015. Disponível em: [https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/ferg\\_infographics/en/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/en/). Acesso em: 01 de jul. 2021.

- WILKINS, M.R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 61-65, 1996.
- WOLFFE, A. P. Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Ybox family of nucleic acid binding proteins. **Bioessays**, v. 16, n.4, p. 245-251, 1994.
- YAMANAKA, K. et al. CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*. **Molecular of Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1572-1584, 2001.
- YENI, F. et al. Most common foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce: a review of recent outbreaks. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 56, n. 9, p. 1532–1544, 2016.
- YOON, Y. et al. Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses. **Food Research International**, v. 72, n. 1, p. 25-36, 2015.
- ZHANG, J. et al. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.11, n. 4, M111.010587, 2012.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

<sup>1</sup> “Artigo elaborado de acordo com o periódico LWT - Food Science and Technology”

**ARTIGO 1 - RESPOSTA PROTEICA DE ESCHERICHIA COLI  
ENTEROPATOGÊNICA SUBMETIDA AO ESTRESSE SUBLETAL DE  
CINAMALDEÍDO**

**PROTEIN RESPONSE OF ENTEROPATHOGENIC ESCHERICHIA COLI  
SUBMITTED TO SUBLETHAL STRESS OF CINAMALDEHYDE**

MICHELLE C. GONÇALVES<sup>1</sup>; ROBERTA H. PICCOLI<sup>2</sup>

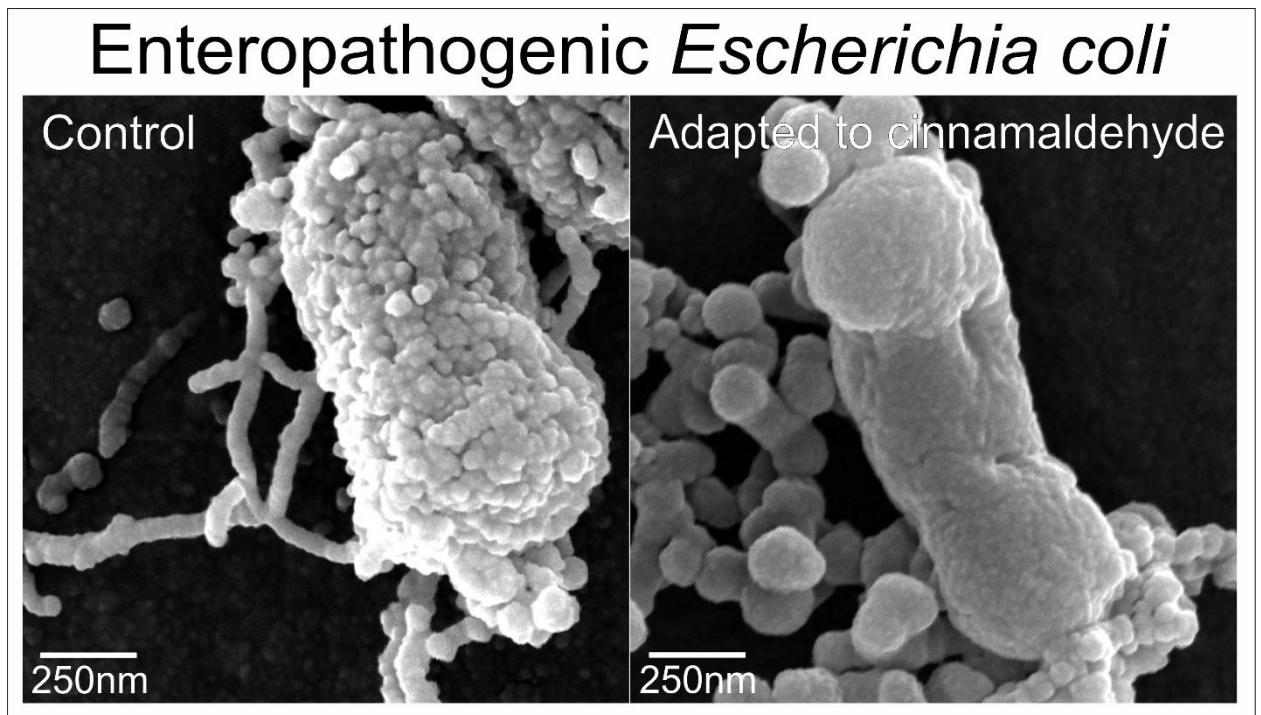
<sup>1</sup> Postgraduate Program in Agricultural Microbiology, Federal University of Lavras, Lavras, 37200-000, MG, Brazil  
Department of in Food Science, Federal University of Lavras, Lavras, 37200-000, MG, Brazil

\*Corresponding Author: Michelle Carlota Gonçalves,  
michellemicroagricola@gmail.com, Tel:+55 (35)99802-3016

## RESUMO

O aumento da tolerância bacteriana aos antimicrobianos tradicionalmente utilizados estimulou a busca por novas alternativas. Este estudo forneceu uma melhor compreensão do impacto de se usar o cinamaldeído na dose subletal em *Escherichia coli* Enteropatogênica através de alterações no perfil proteico. Observamos como a bactéria adaptada ao cinamaldeído ajusta o padrão de expressão proteica e o metabolismo para lidar com os danos induzidos pelo agente e manter sua sobrevivência. Nosso estudo sugere que o cinamaldeído possui atividade antimicrobiana frente a EPEC, tendo como mecanismo de ação a geração do estresse oxidativo, e como forma de adaptação a esse estresse, a bactéria sintetizou a proteína alquilhidroperóxido redutase Subunidade C22 (B7UKP9). A variação proteica foi confirmada também, pela análise de microscopia. Ainda, 58 vias de enriquecimento foram detectadas após análise de bioinformática, porém, as vias correspondentes ao metabolismo do piruvato e vias relacionadas ao transporte de membrana: Transporte ABC e ao sistema fosfotransferase, foram as de maior significância (p-valor <0,05). Em vista do acima exposto, B7UKP9 de EPEC CDC O55 surgiu como uma proteína desintoxicante de hidroperóxido. Este estudo fornece novos insights sobre os comportamentos de adaptação microbiana ao antimicrobiano, reforça a não utilização do antimicrobiano em dose subletal e destaca o risco de desenvolvimento de resistência em bactérias adaptadas.

**Palavras-chave:** Bactéria patogênica; Antimicrobiano natural; Proteínas de resposta ao estresse oxidativo; MPLEx; KEGG; Paintomics



## **SIGNIFICÂNCIA**

O estudo da proteômica quantitativa de EPEC exposta ao cinamaldeído em concentração subletal, mostrou que essa condição induz a uma gama de variações de proteínas super e subexpressas, dentre elas várias associadas à resposta ao estresse de modo geral. Essa informação é importante, uma vez que, os componentes majoritários de óleos essenciais têm sido sugeridos como antimicrobianos alternativos aos convencionais. Contudo quando utilizado de forma inadequada, esse componente pode induzir EPEC a desenvolver tolerância a outras condições de estresse fato que pode levar a maiores dificuldades no controle da bactéria.

## **HIGHLIGHTS**

Estresse subletal do cinamaldeído induz uma resposta metabólica ao estresse em EPEC. A proteômica possibilita o entendimento do aumento de tolerância bacteriana a antimicrobiano.

Cinamaldeído causa estresse oxidativo em EPEC.

EPEC sintetiza a proteína B7UKP9\_ECO27 como forma de adaptação ao cinamaldeído.

O metabolismo do piruvato e os sistemas de transporte ABC e Fosfotransferase sobressaíram como mecanismo adaptativo.

## 1. INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é importante porque é o principal da biologia organismo modelo, é um comensal comum do trato gastrointestinal de humanos e animais (Croxen et al., 2013), embora existam seis patotipos capazes de causar doenças em diferentes graus. Segundo dados da OMS, *Escherichia coli* está entre os 4 maiores agentes causadores de doenças diarreicas em todo o mundo (WHO, 2015). *E. coli* foi o terceiro agente mais relacionado às ocorrências microbiológicas de *recalls* em diferentes partes do mundo entre 2008 e 2018, sendo responsável por 210 incidentes / *recalls* (Soon; Brazier; Wallace, 2020).

*Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), foi o primeiro patotipo de *E. coli* a ser implicado em doenças humanas (Bact & Neapolitanum, 1944). E continua sendo uma das principais causas de diarreia infantil em países em desenvolvimento (Serapio-Palacios & Finlay, 2020). No entanto, como se constatou que as cepas de EPEC não invadiam células ou liberavam toxinas difusíveis, surgiram dúvidas sobre seu potencial patogênico nas décadas de 1960 e 1970. Contudo, a evidência decisiva de que a EPEC é um potencial patógeno humano surgiu pela indução de diarreia em voluntários humanos (Levine, 1978). Tornando-se responsável por causar elevado número de surtos em humanos em países como Inglaterra (Sakkejha et al. 2013), Índia (Shetty et al. 2012), Venezuela (Hannaoui et al. 2010), Brasil (Franzolin et al. 2005; Spano et al. 2008) e Nicarágua (Vilchez et al. 2009).

EPEC foi responsável também, por surtos de doenças transmitidas por alimentos, como linguiça toscana (Franco, 2002), leite pasteurizado (Silva et al. 2001), carne moída (Berbarli et al. 2004), alface (Martins et al. 2010), tomate (Gómez-Aldapa et al. 2013), água de consumo (Canizalez-Roman et al. 2013), leite de ovelha (Otero et al. 2013) e queijo minas frescal (Dias et al. 2012), sendo responsável por causar doenças diarreicas graves, afetando principalmente crianças e indivíduos imunocomprometidos (Dias et al. 2012). Portanto, seu controle em alimentos faz-se necessário.

A busca constante por alimentos seguros e mais naturais possível, tem feito com que indústrias alimentícias explorem alternativas plausíveis aos conservantes comumente empregados. Principalmente por já terem sido associados a efeitos adversos (Pinelli et al., 2021). Com isso, metabólitos secundários derivados de plantas, como os óleos essenciais despertaram a atenção por serem conhecidos por sua ação antimicrobiana e antioxidante e são utilizados como aromatizantes naturais em

alimentos, sendo empregados por diversas civilizações desde a antiguidade (Oliveira et al., 2019; Pinelli et al., 2021). Além disso, o fato de serem geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) impulsionou seu uso em indústrias alimentícias (USFDA, 2015; Almeida et al., 2019).

A utilização desses metabólitos com atividade antimicrobiana, obtidos a partir de fontes vegetais se tornou um “ponto de acesso de pesquisa”. As bactérias não podem desenvolver resistência a esses antimicrobianos prontamente (Abed et al., 2020). O Cinamaldeído é o composto majoritário do óleo essencial obtido da casca do caule de canela, *Cinnamomum cássia* (Ferro et al., 2016) e tem demonstrado boa atividade antimicrobiana contra *E.coli* (Bozik et al., 2018; Shen et al., 2015). Por isso, o selecionamos para realização de um estudo proteômico elucidando os mecanismos de resposta de EPEC adaptada ao composto.

*Escherichia coli* foi uma das primeiras espécies a ter seu genoma sequenciado e continua sendo um dos organismos modelo mais bem caracterizados. Conseqüentemente, um número significativo de proteínas já foram identificadas neste organismo. Porém, talvez seja surpreendente que estudos recentes tenham mostrado novas descobertas a respeito da resposta proteica de *E.coli* em inúmeras situações, e há evidências substanciais indicando que muitos mais ainda precisam ser descobertos (Hemm et al., 2020) .

Há estudos proteômicos na literatura relacionados a resposta de *E.coli* ao estresse por cinamaldeído (Calvano et al. 2016; Bozik et al. 2018; Du et al. 2021), porém, estudos relatando a forma com que EPEC responde ao estresse subletal de cinamaldeído são escassos e se fazem necessários. E por isso, decidimos avaliar esta atividade neste trabalho por análise proteômica “gel free” utilizando um nanoUPLC-MS<sup>E</sup>.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de condução do experimento e componente majoritário

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do departamento de ciências dos alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras, no Laboratório de Análises Proteômicas e Bioquímicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília e no Laboratório de Espectrometria de Massa da Emprapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Utilizou-se o componente cinamaldeído (93 mg/mL), adquirido da Sigma-Aldrich®.

### 2.2 Microrganismo, padronização e manutenção do inóculo

A cepa utilizada em todo o experimento foi *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) INCQS 00181 (CDC O55), cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). A cultura estoque permaneceu armazenada em meio de congelamento (glicerol, 15 mL; peptona bacteriológica, 0,5 g; extrato de levedura, 0,3 g; NaCl, 0,5 g e água destilada, 100 mL, pH 7,0) a -18°C. A bactéria foi reativada pela transferência de alíquotas de 100 µl das culturas estoque para tubos contendo 10 mL de caldo infusão cérebro de coração (BHI) e incubação a 37 °C por 24 horas. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento (DO 600nm) em caldo BHI e plaqueamento em ágar tripton de soja (TSA) com incubação a 37°C. Padronizou-se a cultura em, aproximadamente, 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

### 2.3 Concentração mínima bactericida do cinamaldeído sobre EPEC

A concentração mínima bactericida do componente majoritário cinamaldeído foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (2019), com adaptações. Soluções contendo cinamaldeído nas concentrações de 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,31 e 0,15 mg/mL foram elaboradas em caldo BHI acrescido 5 (mg/mL) de Tween 80. Alíquotas de 10 µL das culturas padronizadas foram inoculadas em 150 µL das soluções e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, 10µl das culturas foram plaqueadas



em TSA e incubadas a 37 °C por 24 horas. Foram elaborados dois controles: o positivo, contendo BHI, 5 mg/mL de Tween 80 e 10 µL de inóculo padronizado e o negativo contendo BHI, 5 mg/ml de Tween 80 e cinamaldeído, nas diferentes concentrações testadas. Foi considerada a concentração mínima bactericida (CMB) a concentração em que, após a incubação, não houve crescimento em placas. O experimento foi realizado em triplicata e três repetições.

#### **2.4 Adaptação de EPEC ao cinamaldeído**

As células de EPEC foram expostas as concentrações subletais de cinamaldeído. As doses subletais foram determinadas com base nas CMB, sendo equivalentes a CMB/4 e CMB/8 (Lundén et al., 2003; Santos et al., 2018), com adaptações. Em tubos tipo Falcon contendo 36 mL de caldo BHI e 5mg/mL de Tween 80 adicionou-se o cinamaldeído nas concentrações subletais. Após homogeneização, alíquotas de 4 mL de inóculo padronizado foram adicionadas ao meio e os tubos foram incubados a 37 °C por 6 horas. Após esse período, as culturas foram centrifugadas (5.000 x g por 5 min) e o sobrenadante descartado. As células adaptadas foram coletadas e lavadas (3x) com solução salina, sendo ressuspensas em caldo BHI e padronizadas (~ 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>).

#### **2.5 Avaliação da adaptação de EPEC ao cinamaldeído**

Foi utilizada a técnica de microdiluição (NCCLS, 2019), com adaptações. Alíquotas de 10 µL das células ressuspensas e padronizadas foram inoculadas em 150 µL de caldo BHI adicionado de Tween 80 (5mg/mL) e diferentes concentrações de cinamaldeído (CMB/2; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2CMB) com incubação a 37 °C por 24 horas. Após esse período, alíquotas de 10µl das culturas foram plaqueadas em TSA e incubadas a 37 °C por 24 horas. As células de EPEC foram classificadas como capazes de se adaptarem quando observado seu crescimento em placas após cultivo em presença do componente em concentrações iguais ou maiores que a CMB. Paralelamente, realizou-se o mesmo procedimento com células de EPEC não expostas a doses subletais. A dose subletal em que a bactéria apresentou maior capacidade adaptativa foi selecionada para realização das análises proteômicas (Di Pasqua et al., 2010).

## **2.6 Análise proteômica**

### **2.6.1 Adaptação de EPEC ao cinamaldeído**

A cepa foi cultivada em tubo tipo falcon contendo 50 mL de meio BHI, 5 mg/mL de Tween 80 e 0,156 mg/mL de cinamaldeído (concentração subletal) a 37 °C por 6 horas. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 5.000 x g por 5 min, as células adaptadas recuperadas e lavadas (3x) com solução salina e ressuspensas em água Milli-Q para utilização. Células controle (crescidas apenas no meio de cultura), também foram cultivadas para o estudo.

### **2.6.2 Precipitação e extração das proteínas**

Para extração das proteínas totais utilizou-se a metodologia MPLEx descrita por Burnum-Johnson, et al. (2017) e Nakayasu, et al. (2016). Inicialmente, 10 mL da cultura foram centrifugados a 11.000 rpm, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foram adicionados 2 mL de tampão A ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) a 50 mM, a amostra foi submetida a centrifugação a 11.000 x g, por 10 min a 4 °C, foi retirado o sobrenadante e o pellet ressuspensado em 150  $\mu\text{L}$  do tampão A e adicionados 600  $\mu\text{L}$  do tampão B ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ ). A amostra foi homogeneizada em agitador tipo vórtex por 1 min e submetida ao banho de gelo por 5 min. Após o resfriamento, as células foram novamente centrifugadas, como descrito, sendo as frações superiores e inferiores (metabólitos e lipídios) retiradas. A fração proteica (encontrada no meio), em estado sólido, foi lavada com 200  $\mu\text{L}$  de metanol (P.A.), homogeneizada em agitador tipo vórtex por 1 min e novamente centrifugada. O sobrenadante foi descartado, a amostra ressuspensada no tampão A e sonicada por 15 ciclos de 60 s com intervalos de 60 s entre os ciclos.

### **2.6.3 Quantificação de proteína total**

As amostra protéicas foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina sérica bovina (BSA) (DO 595 nm) como padrão e utilizadas para análise no LC-MS.

#### **2.6.4 Preparação da amostra protéica para aquisição no LC-MS**

As amostras de EPEC susceptíveis e adaptadas, de três réplicas biológica, foram digeridas com tripsina para análise proteômica. Alíquotas de 100 µg de proteína total de cada amostra foram transferidas para microtubos e adicionados 20 µL de 50 mM de formiato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_2$ ) e 50 µL de solução RapiGest SF (Waters). Foram adicionados 5 µL de 10 mM dithiothreitol (GE Healthcare) e em seguida, a amostra foi agitada e incubada a 60°C por 30 min. Após o período de incubação, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente, até esfriamento e centrifugadas a 11.000 rpm por 15 segundos. Foram adicionados 5 µL de iodoacetamida (300 mM) (GE Healthcare), com posterior agitação e incubação por 30 min, a temperatura ambiente, e protegido da luz. Após, foram adicionados 20 µL de solução tripsina em 50 mM de bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) na concentração de 1:100 enzima:proteína, as amostras foram agitadas novamente e incubadas a 37 °C por 16 h para digestão.

Seguida a digestão, para hidrólise e precipitação do surfactante, adicionou-se 20 µL de ácido trifluoroacético (5% v/v), homogeneizadas em agitador tipo vortex e incubadas a 37°C por 90 min. Após centrifugação a 14000 rpm, 6°C por 30 min, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo e o líquido evaporado em concentrador a vácuo. As amostras foram ressuspensas em 195 µL de formiato de amônio e adicionado de 5 µL de fosforilase B como padrão de digestão protéica (concentração final de 50 fmol). As amostras digeridas foram então transferidas para o frasco de 12x32 mm (Waters), etiquetadas e encaminhadas para aquisição de dados.

#### **2.6.5 Aquisição do espectro no LC-MS**

Para maior confiabilidade do resultado, foram estabelecidas três réplicas biológicas e três réplicas técnicas de cada réplica biológica, para cada grupo controle e adaptada e para aquisição do perfil protéico foram realizadas corridas separadas de cada réplica biológica, levando-se em consideração a reprodutibilidade das triplicatas.

Foram utilizados métodos modificados conforme descrito por Murad et al. (2011). A separação em nano escala dos fragmentos trípticos, foi executada usando um sistema cromatográfico nanoACQUITY™ system (Waters Corp.). Foi usada como pré-coluna, uma Trap Column 100 A, 5 µM, 180 µM x 20 mm e uma coluna analítica UPLC Column 1.8 µM HSS T3 75 µM x 150 mm, ambas de fase reversa (Waters). Na corrida,

a fase móvel A foi uma solução de 0,1% de ácido fórmico em água, a fase móvel B foi 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. Os peptídeos foram separados usando um gradiente de 7-35% B por 37 min, em um fluxo de 600  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  seguido de uma lavagem de 5 min com 85% da fase móvel B. A coluna foi reequilibrada às condições iniciais por 10 min. A temperatura da coluna foi mantida a 35 °C. A injeção foi configurada de modo a aplicar o conteúdo exato do loop de injeção. A massa de correção lock mass Glu-fibrino peptide (GFP), foi injetada no spray de referência *NanoLockSpray* do espectrômetro de massas utilizando o sistema fluídico do espectrômetro, usando um fluxo constante de 200  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , em uma concentração de 320 fmol da GFP.

Os peptídeos tripticos foram analisados usando um espectrômetro de massas SYNAPT G2 HDMS<sup>TM</sup> (Waters, Manchester, UK). Para todas as análises, o espectrômetro foi operado em modo positivo utilizando um *nanoSpray* e com resolução de, no mínimo, 20000 *full-width half-maximum* (FWHM). O analisador foi calibrado exatamente utilizando as massas dos íons b+ e y+ da GFP[M+2H]<sup>2+</sup> = 785. 8426. A massa do *spray* de referência foi amostrada com intervalo de 30 s. As massas usadas por tempo de retenção (*Exact mass retention time* – EMRT, iniciais em inglês) foram adquiridas em aquisição independente, alternando de baixa para alta energia. O espectro contínuo foi coletado, em cada modo, em 1.5 s com um atraso de scan de 0.1 s. Em modo de baixa energia (MS mode), foi usado 3 eV de energia de colisão constante. Em modo de energia elevado (fragmentation), foi usado uma rampa de 12 á 45 eV durante os 1.5 *scans*.

### 2.6.6 Identificação protéica e processamento de dados por LC-MS

Foi utilizado espectrômetro SYNAPT G2, um ESI-Q-TOF, acoplado a um nano-UPLC nanoACQUITY. Os espectros de massa obtidos com nanoUPLC-MS, foram processados, utilizando-se o software ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.0 (Waters). A identificação de proteínas, foi mediada pelo algoritmo de contabilização de íons do *software* incorporado ao programa (Li et al., 2009; Geromanos et al., 2009) e realizando-se a comparação com um genoma de *Escherichia coli* Enteropatogênica. Para análise de quantificação protéica, a medida de intensidade observada de três peptídeos protótipos de cada proteína, foi quantificada a partir da intensidade medida dos peptídeos protótipos identificados do padrão externo utilizando-se algoritmos dedicados (Silva et al., 2005). A identificação de proteínas foi executada atendendo os

seguintes critérios: no mínimo um fragmento por peptídeo, no mínimo 3 fragmentos por proteína, no mínimo um peptídeo por proteína, modificações variáveis de acetilação no N-terminal, N desaminação, Q desaminação e oxidação M, modificação fixa de C-carbamidometil, taxa de 4% de falsos positivos, proteína de calibração fosforilase B, concentração de proteína de calibração de 150 fmol, digestão executada por tripsina e permitido o erro de clivagem em 1.

Foram separadas as proteínas comuns, exclusivas e diferenciais (aumentadas e/ou diminuídas) entre cada um dos grupos experimentais usando-se o PLGS e a análise estatística de distribuição normal, onde para análise de proteínas aumentadas e/ou diminuídas, utilizou-se a razão logarítmica das concentrações de proteínas em fmol com autonormalização dos dados.

O valor de p utilizado afirmou se a expressão de proteína encontrava-se aumentada ( $p > 0,95$ ) ou diminuída ( $p < 0,05$ ). Qualquer valor entre esses extremos, indica ausência de alteração na expressão das mesmas. Proteínas que repetem sua expressão tanto nas réplicas biológicas, quanto nas técnicas, foram consideradas proteínas comuns aos diferentes grupos, proteínas exclusivas foram consideradas as proteínas presentes em um grupo específico com base nas réplicas. Primeiro, usamos o valor de fold change [Log (e) ratio] para determinar quanto a expressão da proteína foi aumentada ou diminuída entre dois grupos. Em seguida, um valor de variância foi utilizado, indicando o quanto uma proteína variou entre as réplicas biológica e técnica de cada grupo. Assim, apenas as proteínas que apresentaram expressão diferencial com razão Log (e)  $\geq 0,5$  e variância  $\leq 0,51$  foram consideradas significativas. Em adição, dentro de cada grupo, as proteínas foram separadas de acordo com a sua função celular utilizando as bases de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) e PaintOmics 3 (<http://www.paintomics.org>).

## **2.7 O efeito do cinamaldeído na morfologia da bactéria foi avaliado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para realização da análise, foi usado células de EPEC crecidas apenas no meio de cultura (controle) e células adaptadas na dose subletal (1/8) de cinamaldeído (ver item 2.4). Após as condições de preparação, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (2,5% glutaraldeído e 2,5% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, CaCl<sub>2</sub> 0,001 M, pH 7,2) por 24 h. As amostras foram desidratadas em séries

ascendentes de soluções de acetona 25%, 50%, 75%, 90% e 100%; o último em triplicado) por 10 minutos em cada etapa. As amostras foram levadas a um ponto crítico (Bal - tec CPD 030 Balzers, Liechtenstein), secas e revestidas com ouro. As estruturas foram observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura, FEG Tescan Clara Sem / Stem Ultra High Resolution. As imagens foram geradas e gravadas digitalmente em condições de trabalho de 250.000x e uma distância de trabalho de 1 µm.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O mundo está entrando em uma era pós-antibióticos, e há uma necessidade urgente de novos agentes à medida que a resistência se transformou em uma grande ameaça global (Bombaywala et al., 2021). Nos últimos anos, os extratos de ervas têm sido um ponto importante de pesquisa no campo da descoberta de medicamentos antibacterianos. O cinamaldeído é o componente majoritário do óleo essencial de *Cinnamomun cassia*, é um agente antibactericida, natural, seguro com potencial utilização em indústrias de alimentos (Du et al., 2021). Considerando que a comum exposição bacteriana a doses subletais de antimicrobianos é extremamente importante para adquirir informações moleculares mais detalhadas relacionadas aos mecanismos pelos quais as bactérias se adaptam a estes agentes.

Verificou-se neste estudo que o cinamaldeído (CIN) inibe o crescimento de EPEC na CMB de 1, 25 mg/mL. Resultados relatando a atividade antimicrobiana de CIN em EPEC também foram relatados na literatura, 6 mg/mL (Oliveira et al., 2012), 8mg/mL (Pei et al., 2009).

Assim, foi testada a capacidade adaptativa de EPEC ao CIN pela exposição da bactéria nas concentrações de 0,312 e 0,156 mg/mL de cinamaldeído, respectivamente, 1/4 e 1/8 da CMB obtida e essa capacidade foi avaliada após 6h de exposição. EPEC não se adaptou a dose subletal de 1/4 do cinamaldeído porém, foi capaz de se adaptar a dose subletal de 1/8 do componente majoritário, por ser capaz de crescer em presença de cinamaldeído em concentração de 2,5 mg/mL (2x CMB).

A consequência da adaptação de outro patotipo de *E.coli* ao cinamaldeído já foi relatada anteriormente. (Yuan et al., 2018) verificaram que *E. coli* O157: H7 previamente adaptada ao trans-cinamaldeído mostrou resistência aumentada contra o composto quando utilizado em dose letal e subsequentemente ao calor e estresses oxidativos. Complementariamente, resolvemos avaliar mecanismos pelos quais o

patógeno alimentar, *Escherichia coli* Enteropatogênica sobrevive ao antimicrobiano antes considerado letal as células, através da proteômica quantitativa corroborando com seu uso em indústrias alimentícias.

Após análise de adaptação, realizamos um estudo proteômico comparativo utilizando cepa de *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) controle e adaptada ao antimicrobiano. Para tanto, EPEC foi exposta a dose subletal (0,156 mg/ mL) de cinamaldeído. As células do controle e do tratamento foram submetidos a análises proteômicas utilizando nanoUPLC-MS<sup>E</sup>.

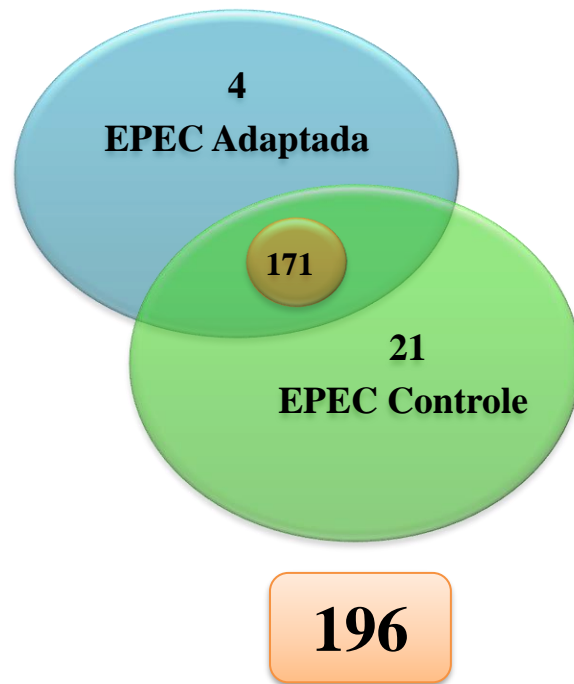
### 3.1 Resposta proteica de EPEC e análise de bioinformática

Diferenças na expressão de proteínas foram detectadas entre amostras controle e adaptada. As proteínas do lisado bacteriano total de EPEC, da cepa controle e adaptada ao cinamaldeído, foram obtidas. Após a extração, obteve-se um rendimento proteico total de 1,9 a 2,4 mg. Posteriormente, o nanoUPLC-MS<sup>E</sup> foi utilizado para comparar o perfil proteômico da cepa em ambas as condições, identificando as diferenças significativas entre os grupos experimentais. As culturas foram cultivadas sob condições ideais de crescimento.

Após o processamento dos dados, foi possível identificar 196 proteínas distribuídas entre os grupos experimentais, 21 proteínas são únicas do grupo EPEC controle, 4 proteínas são únicas do grupo EPEC adaptadas ao cinamaldeído e 171 proteínas comuns nas duas condições (**Figura 1 A**). Proteínas com uma expressão fold change  $\geq 1$  e P-valor  $< 0.05$  foram consideradas significativamente proteínas diferencialmente expressas. Para construir um perfil funcional das proteínas identificadas, as proteínas foram separadas em categorias e subcategorias usando as bases de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), PaintOmics 3 e NevOmics. Foram obtidas 58 vias de enriquecimento e dessas, 2 com maior significância e as atribuições obtidas foram distribuídas em cinco classes biológicas. Segundo o banco de dados, as classes biológicas atribuídas foram processos celulares (6,35%), processamento de informações ambientais (4,76%), processamento de informações genéticas (6,35%), doenças humanas (1,59%) e metabolismo (80,95%) (**Figura 1 B**).

**Figura 1** - Classificação proteica de EPEC de acordo com as classes biológicas do PaintOmics.

**A**



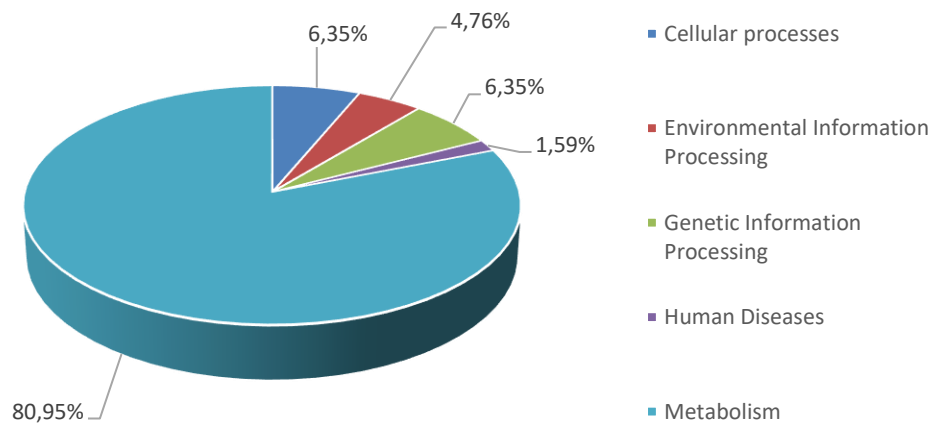
58 Found Pathways



2 Significant

**B**

### Category Distribution



Legenda: (A) diagrama de Venn mostrando as proteínas identificadas através do nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, correlacionando EPEC - grupos controle e adaptado. (B) Classes biológicas atribuídas para um total de



196 proteínas identificadas em todos os grupos experimentais com representatividade das subcategorias envolvidas em cada classe biológica.

### 3.1.2 Vias enriquecidas e vias de maior significância: Via do metabolismo do piruvato e via de transporte de membrana

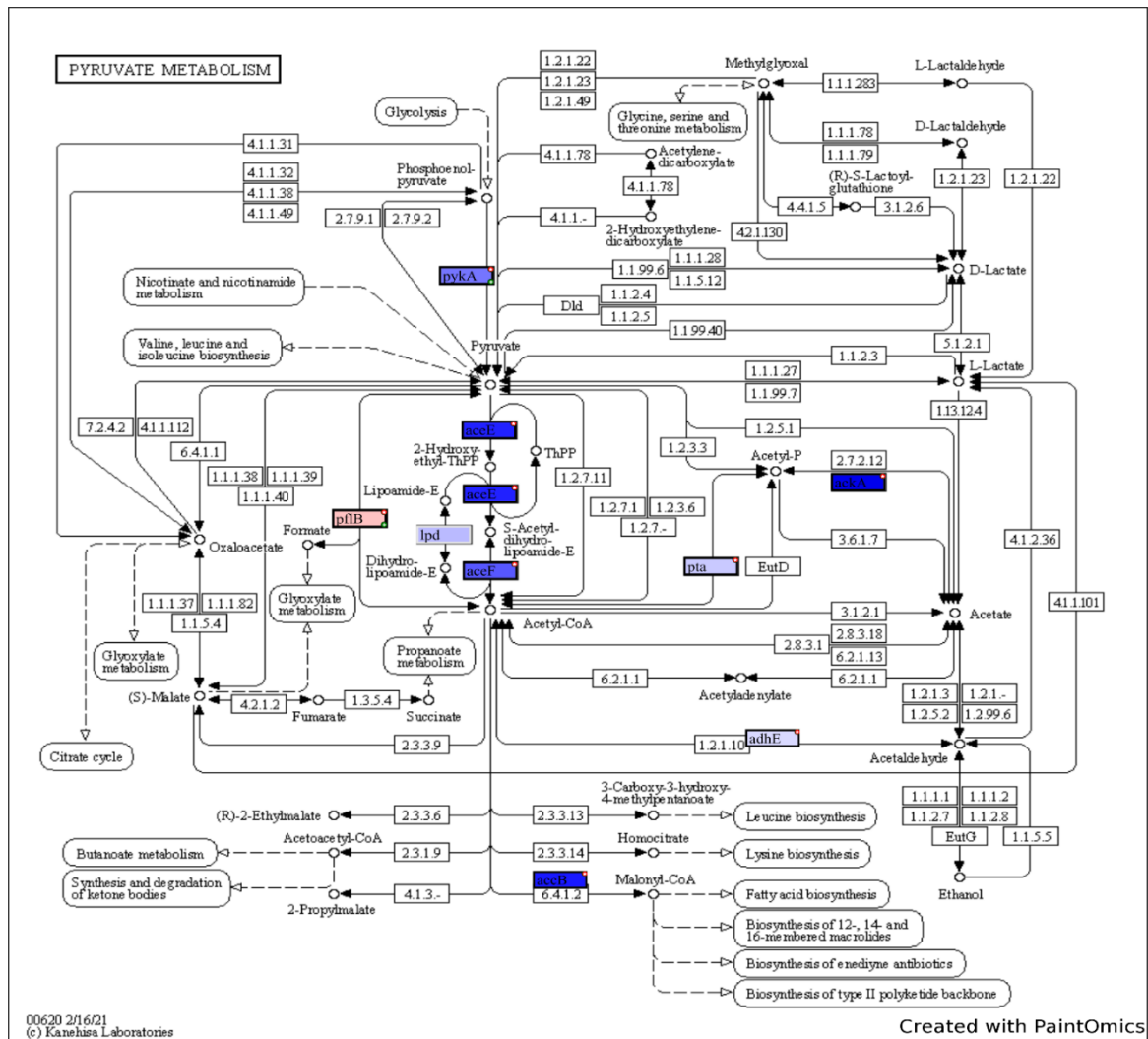
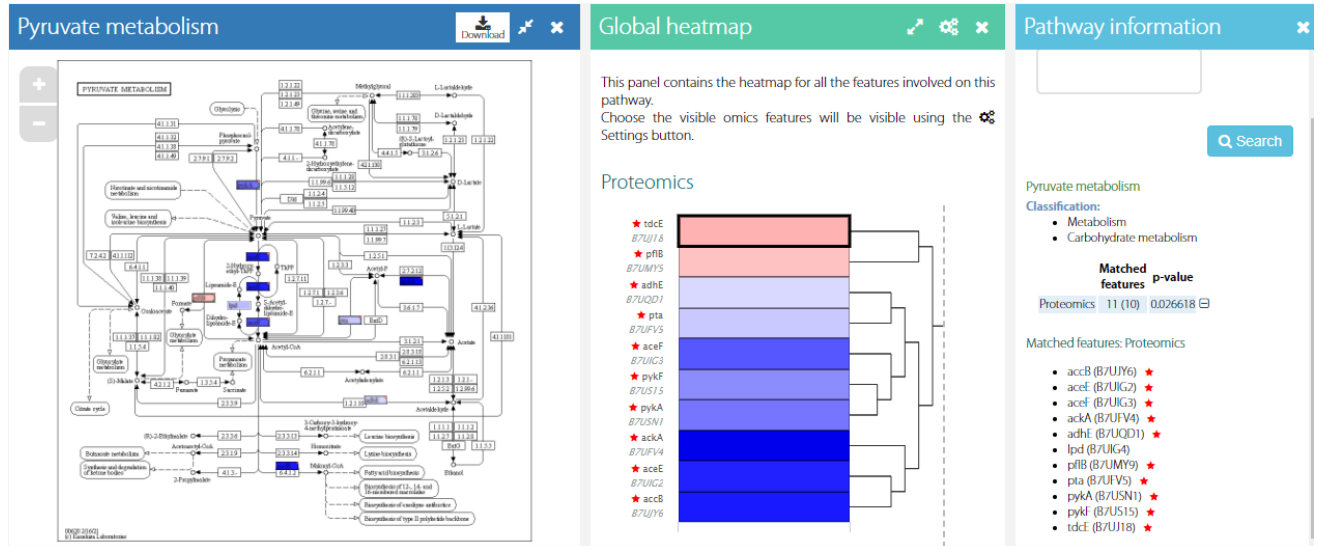
As vias foram consideradas significativamente enriquecidas pelo (p-valor  $<0,05$ ). As vias enriquecidas são ordenadas pelo valor p combinado. Foram obtidas 58 vias na análise de bioinformática pelo software PaintOmics. Dessas, duas apresentaram maior significância, a via do metabolismo do piruvato e a via do metabolismo microbiano em ambientes diversos (relacionada ao transporte de membrana: Transporte ABC e ao sistema fosfotransferase). Além do sistema de dois componentes relacionados a transdução de sinal). Essas estão explanadas na **Figura 2**. Ainda, é possível observar a via de enriquecimento e as informações relacionadas a mesma (**Figura 3 e 4**).

**Figura 2** - Resultados da análise de enriquecimento da via do PaintOmics.

Pathway enrichment						
Search <input type="text"/>		<input type="checkbox"/> Regular expression	<input type="checkbox"/> Case sensitive	<input type="checkbox"/> Search by gene/compound	Show FDR: <span>None</span>	Show combined p-values: <span>Fisher</span>
Paint	Pathway name	Features		Significance tests		External links
		Unique genes	Unique metabol.	Proteomics	Combined p-value (Fisher)	
<input checked="" type="checkbox"/>	Pyruvate metabolism	11	0	0.02662	0.02662	<a href="#">KEGG</a> <a href="#">PubMed</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Microbial metabolism in diverse environments	29	0	0.03675	0.03675	<a href="#">KEGG</a> <a href="#">PubMed</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Butanoate metabolism	5	0	0.07767	0.07767	<a href="#">KEGG</a> <a href="#">PubMed</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Taurine and hypotaurine metabolism	4	0	0.13145	0.13145	<a href="#">KEGG</a> <a href="#">PubMed</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Propanoate metabolism	6	0	0.23838	0.23838	<a href="#">KEGG</a> <a href="#">PubMed</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Biosynthesis of secondary metabolites	24	0	0.33517	0.33517	<a href="#">KEGG</a> <a href="#">PubMed</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	5	0	0.34655	0.34655	<a href="#">KEGG</a> <a href="#">PubMed</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Carbon metabolism	21	0	0.36122	0.36122	<a href="#">KEGG</a> <a href="#">PubMed</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Glycolysis / Gluconeogenesis	13	0	0.36560	0.36560	<a href="#">KEGG</a> <a href="#">PubMed</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-Alanine metabolism	2	0	0.36789	0.36789	<a href="#">KEGG</a> <a href="#">PubMed</a>

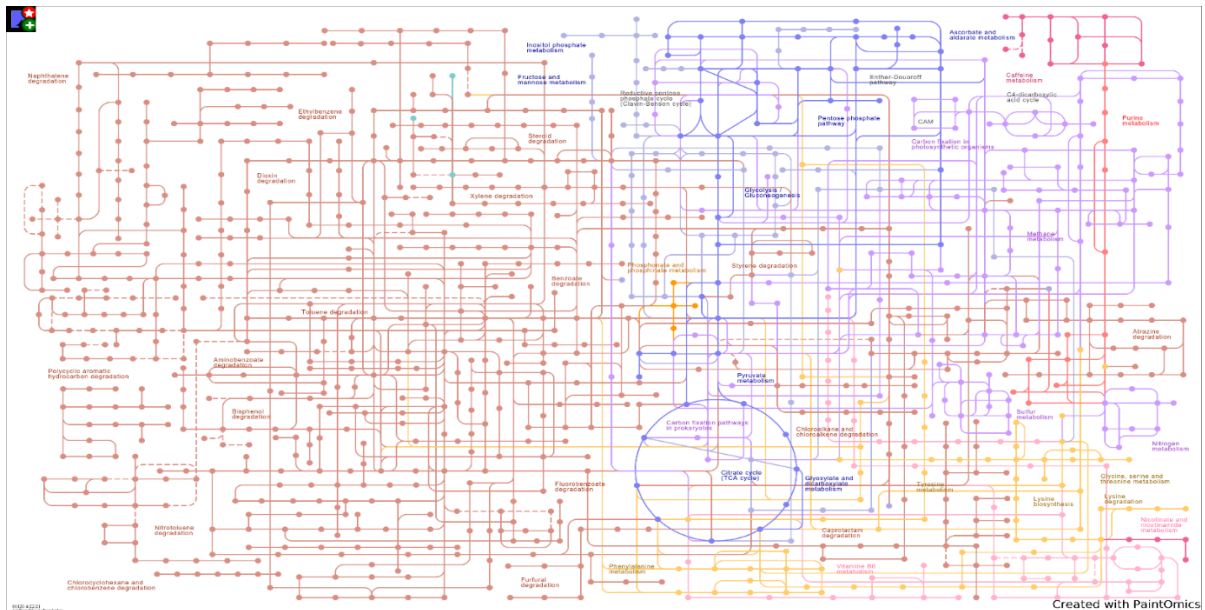
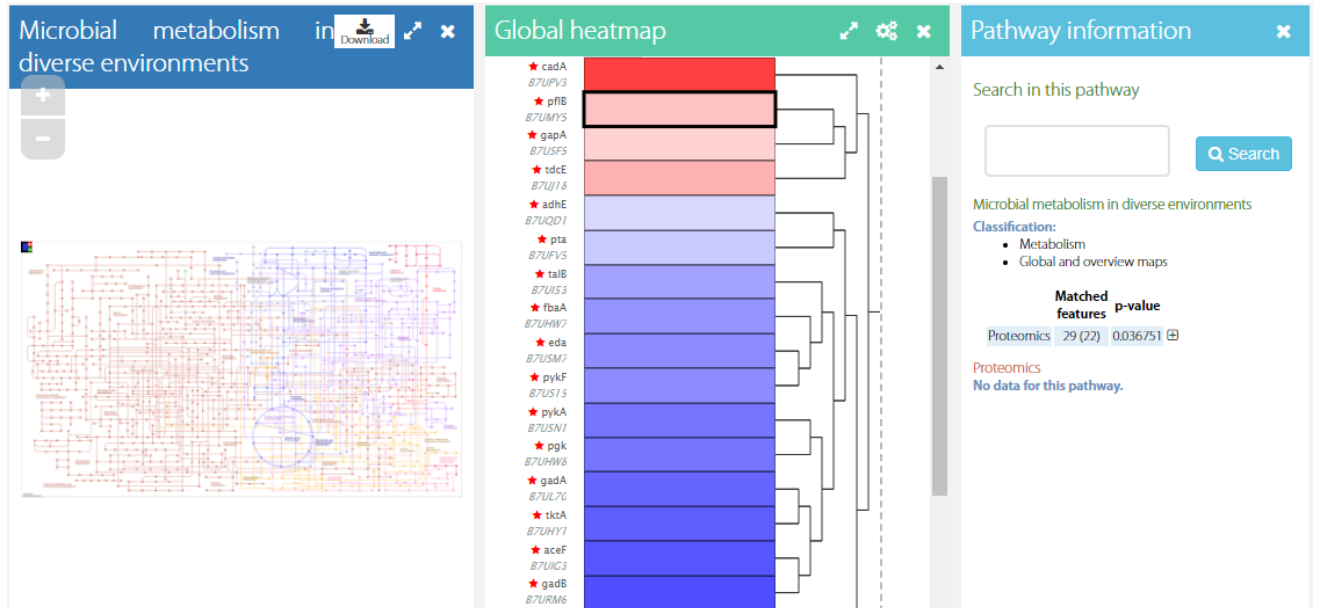
Legenda: Um total de 58 vias foram relatadas e 2 delas foram consideradas significativamente enriquecidas (p-valor  $<0,05$ ). As vias enriquecidas são ordenadas pelo valor p combinado. As posições superiores correspondem às vias mais significativas. Uma escala de cores é usada para destacar o nível de enriquecimento para cada via onde quanto maior a intensidade do vermelho, maior a significância.

Figura 3 - Via do metabolismo do piruvato no PaintOmics 3.



Legenda: O layout para exploração de vias é dividido em três painéis. O painel principal (A) contém o diagrama interativo da via, o painel Heatmap global (B) exhibe dados ômicos na forma de mapas de calor e o painel Informações da via (C) contém funções de pesquisa e resumo (D) contém a via de forma ampliada.

**Figura 4** - Via metabolismo microbiano em ambientes diversos no PaintOmics 3.



Legenda: O layout para exploração de vias é dividido em três painéis. O painel principal (A) contém o diagrama interativo da via, o painel Heatmap global (B) exibe dados ômicos na forma de mapas de calor e o painel Informações da via (C) contém funções de pesquisa e resumo e (D) contém a via de forma ampliada.

As vias correspondentes ao metabolismo do piruvato e ao metabolismo microbiano em ambientes diversos (relacionada ao transporte de membrana: Transporte ABC e ao sistema fosfotransferase), foram as de maior significância neste estudo ( $p$ -valor  $<0,05$ ).

O piruvato desempenha um papel central no metabolismo e constitui o ponto de ramificação que leva (via acetil-coA) ao ciclo do ácido tricarboxílico e para a síntese de ácidos graxos, para aminoácidos, como a alanina, e para a gliconeogênese (via oxaloacetato). Em

condições anaeróbicas, as bactérias podem mudar para a fermentação e reduzir os compostos orgânicos para manter o equilíbrio de  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ . O piruvato é então reduzido a lactato, oxidado a formato ou descarboxilado a acetaldeído (Gasperotti et al., 2020).

Durante a glicólise, a glicose é convertida em duas moléculas de piruvato. Alguns organismos têm a via de Entner-Doudoroff, na qual o 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato é clivado diretamente em piruvato e gliceraldeído 3-fosfato. A última molécula é convertida em piruvato pelas enzimas da via glicolítica. Além disso, as bactérias que podem crescer em meios ricos em aminoácidos como alanina, serina, cisteína, glicina e triptofano são catabolizados em piruvato (Gasperotti et al., 2020). Os níveis de piruvato parecem refletir a relação quantitativa entre a disponibilidade de carbono e nitrogênio na célula e afetam a biossíntese de aminoácidos (Chubukov et al., 2014).

Aqui, identificamos as proteínas Piruvato formato-liase (formato C-acetiltransferase-tdcE; pflB) através do NevOmics. Essas são responsáveis pela conversão de piruvato em acetil-CoA e formato em *Escherichia coli* por um mecanismo homolítico único que envolve um radical livre abrigado na estrutura da proteína (Wagner et al., 1992).

Estudos demonstraram que o cinamaldeído interage com a membrana celular, mas ainda não está claro como ele perturba as membranas (Di Pasqua et al. 2010). Encontramos neste estudo alguns mecanismos relacionados a essa interação, visto que as vias de transporte ABC e fosfotransferase em EPEC foram consideradas com alta significância na análise de bioinformática, relacionando-se a adaptação de EPEC ao cinamaldeído.

Sistemas de transporte que contêm proteínas periplasmáticas de ligação, bem como um transportador de membrana e proteínas que hidrolisam ATP são denominados sistema de transporte ABC (ATP-binding cassette – cassete de ligação a ATP), uma propriedade estrutural de proteínas que se ligam a ATP. Os transportadores ABC são responsáveis pela captação de compostos orgânicos, como açúcares e aminoácidos, nutrientes inorgânicos como sulfato e fosfato, e metais traço (Madigan et al. 2010).

A exportação de proteínas é importante as bactérias, uma vez que várias enzimas bacterianas atuam quando localizadas extracelularmente (exoenzimas). Exoenzimas hidrolíticas como amilase ou celulase, são excretadas diretamente ao meio externo, onde clivam o amido ou a celulose, respectivamente, em glicose, que pode então ser utilizada pela célula como fonte de carbono ou de energia. Em *E.coli*, várias enzimas estão localizadas no periplasma, e devem atravessar a membrana citoplasmática alcançando o citoplasma a fim de atuarem (Madigan et al. 2010).

Neste estudo, EPEC adaptada expressou as chaperonas (clpB, groL) e um lipoproteína de membrana externa (lpp). As lipoproteínas são componentes da membrana externa que atuam na síntese da parede celular, diversos sistemas de secreção e bombas de efluxo de antibióticos. Além disso, a maquinaria de membrana externa requer uma ou mais lipoproteínas. Acredita-se que essa dependência explique a essencialidade da chaperona periplasmática (Grabowicz & Silhavy, 2017). Ekiert et al. (2017) observaram que a proteína MlaD de *E. coli*, forma um anel associado a um complexo transportador ABC na membrana externa. É uma proteína solúvel de ligação a lipídios, transporta os lipídios entre o MlaD e um complexo de proteínas da membrana externa.

O sistema fosfotransferase é uma forma de transporte no qual a substância transportada é quimicamente modificada durante a sua captação através da membrana e envolve o transporte de glicose, frutose e manose em *E. coli*. Durante o transporte esses compostos são modificados por fosforilação (Madigan et al. 2010). Em *E. coli*, a atividade fosfoenolpiruvato-carboidrato fosfotransferase (PTS) tem um papel crucial no sistema de sinalização global que controla o consumo preferencial de glicose em relação a outras fontes de carbono. Interessantemente, quando a célula é exposta a misturas de carboidratos, o PTS impede a expressão de genes catabólicos e a atividade dos sistemas de transporte de açúcares não PTS por repressão catabólica de carbono (CCR) (Escalante et al., 2012).

### 3.2 Análise de bioinformática utilizando o NevOmics

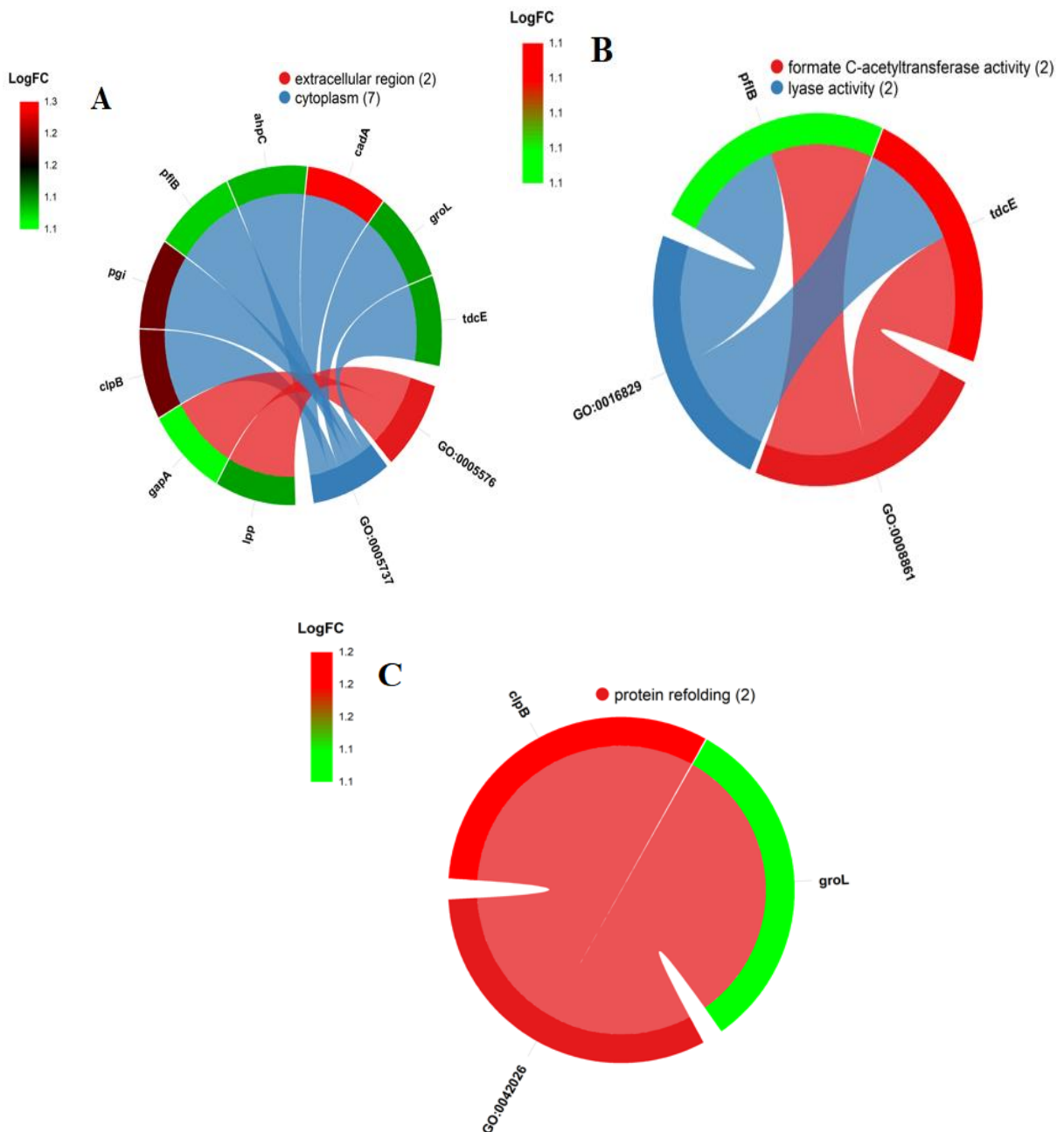
Analizamos com NeVOmics uma lista de entrada com as proteínas mais abundantes (up reguladas) e menos abundantes (down reguladas) em EPEC adaptada ao cinamaldeído. Realizamos uma análise de enriquecimento para Gene Ontology com as vias KEGG obtidas.

Proteínas relacionadas a componentes celulares, funções moleculares e ao processo biológico foram up reguladas (**Figura 5 A, B, C**). Estas são responsáveis pela resposta ao estresse sofrido pela bactéria. Perfazem proteínas citoplasmáticas (clpB, pgi, pflB, ahpC, cadA, groL, tdcE), uma proteína de ancoragem de peptidoglicano (lpp) e uma relacionada ao metabolismo de glicose (gapA) (**Figura 5 A**). Dessas, duas estão envolvidas aos processos de metabolismo de carboidrato (pflB e tdcE) (**Figura 5 B**). Além de duas chaperonas (groL e clpB) (**Figura 5C**), sendo uma com atividade específica de resposta ao estresse (clpB), de acordo com informações obtidas pelo UniProt.

Com relação as proteínas down reguladas (**Figura 6 A**), estas perfazem a classe de processos biológicos. Estão principalmente relacionadas a tradução. Contudo, as análises de

bioinformática sugerem que interferências na tradução de proteínas, motilidade celular e diversas respostas ao estresse, principalmente em resposta ao estresse oxidativo, podem estar envolvidos no mecanismo adaptativo de EPEC ao cinamaldeído.

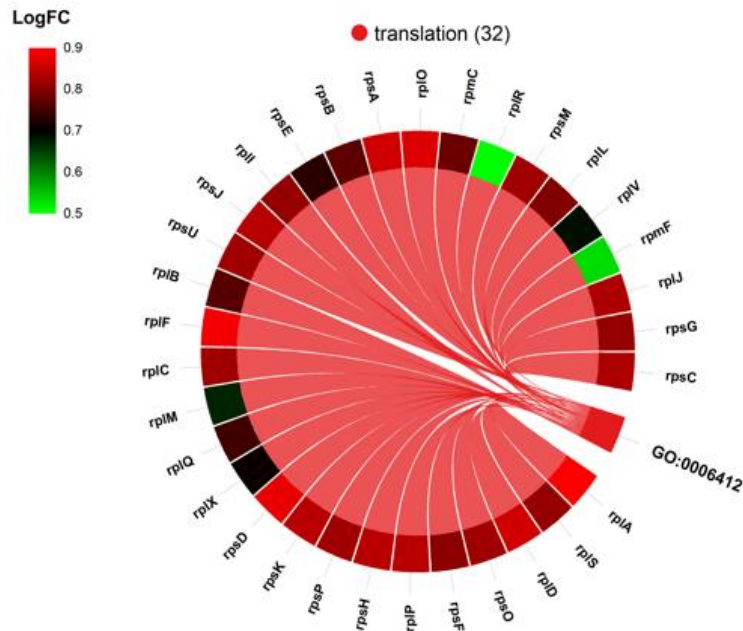
**Figura 5** - Análise de enriquecimento com NeVOmics de um conjunto de dados de proteínas up reguladas mostrando alteração significativa de abundância.



Legenda: Diagrama de acordes agrupado por cores. As cores nos acordes correspondem as funções moleculares (A), componentes celulares (B) ou processos biológicos (termos GO), ligando cada proteína a função a qual está relacionada. As cores que aparecem nas seções do círculo externo ao lado de cada proteína correspondem a abundância fold-chang encontrada no estudo (logFC:  $\log^2$  Fold-Change). Os

componentes celulares foram determinados com base nos resultados de  $-\log_{10}$  de 0.05, usado como referência para o valor p. E também  $-\log_{10}$  do valor p ajustado.

**Figura 6** - Análise de enriquecimento com NeVOmics de um conjunto de dados de proteínas down reguladas mostrando alteração significativa de abundância.



Legenda: Diagrama de acordes agrupado por cores. As cores nos acordes correspondem ao processo biológico (termos GO), ligando cada proteína a função a qual está relacionada. As cores que aparecem nas seções do círculo externo ao lado de cada proteína correspondem a abundância fold-chang encontrada no estudo e área de acordo com a escala do mapa de calor ( $\log_{FC}$ :  $\log^2$  Fold-Change). Os componentes celulares foram determinados com base nos resultados de  $-\log_{10}$  de 0.05, usado como referência para o valor p. E também  $-\log_{10}$  do valor p ajustado.

### 3.3 Proteínas comuns, diferenciais e únicas entre todos os grupos

As proteínas de cada grupo experimental foram comparadas a fim de identificar as proteínas comuns e exclusivas entre elas. Foram identificadas 196 proteínas perfazendo os grupos controle e adaptada ao cinamaldeído, sendo que 21 e 4 proteínas foram únicas nos grupos controle e adaptada, respectivamente. E em relação as proteínas compartilhadas, o diagrama de Venn mostrou que 171 proteínas identificadas eram comum aos grupos analisados (**Figura 1 A; Tabela 1**).

As proteínas de EPEC das condições controle e adaptada foram analisadas em relação à sua expressão diferencial. Foi observado que entre as 107 proteínas identificadas com expressão diferencial, 13 foram aumentadas, a maioria é citoplasmática e perfazem proteínas relacionadas a processos metabólicos celulares, como lipoproteína de ancoragem de peptídeoglicano (lpp), chaperona envolvidas na resposta ao estresse (ClpB; groL; ahpC), proteínas envolvidas na catálise de reações enzimáticas acelerando reações metabólicas (pgi; pflB; grcA; deoD; gapA;

tdcE), metabolismo de carboidratos, aminoácidos (CadA), proteína envolvida na regulação da homeostase (trxA) e uma proteína não foi caracterizada (yfcZ). Enquanto as que encontraram-se diminuídas perfazem 94 proteínas relacionadas a tradução, biossíntese lipídica, condensação cromossômica, processos biossintéticos da acetil-CoA, transporte de prótons acoplados a síntese de ATP, ligação de ácido nucleico, biossíntese de proteínas e de carboidratos e divisão celular (**Tabela 2**). Em complementação, um gráfico elucidando percentualmente a localização celular das proteínas diferencialmente expressas foi apresentado (**Figura 7**). Esses achados contribuem para elucidação dos mecanismos pelos quais EPEC sobrevive ao estresse causado pelo cinamaldeído.

**Tabela 1** - Proteínas únicas identificadas nas condições controle e adaptada ao cinamaldeído.

Unique	Gene	Accession	Description
Controle	FetP	FETP_ECO27	Probable Fe 2 trafficking protein
Controle	SygB	SYGB_ECO27	Glycine tRNA ligase beta subunit
Controle	FumB	B7UPU4_ECO27	Fumarate hydratase class I
Controle	NapB	B7UFL6_ECO27	Periplasmic nitrate reductase electron transfer subunit
Controle	RecA	RECA_ECO27	Protein RecA
Controle	AtpH	ATPD_ECO27	ATP synthase subunit delta
Controle	rpmA	RL27_ECO27	50S ribosomal protein L27
Controle	rplW	B7UK42_ECO27	50S ribosomal protein L23
Controle	grxC	B7ULG6_ECO27	Glutaredoxin
Controle	FabZ	FABZ_ECO27	3 hydroxyacyl acyl carrier protein dehydratase
Controle	AsnS	B7UN16_ECO27	Asparagine tRNA ligase
Controle	AnsB	B7UI04_ECO27	Periplasmic L asparaginase
Controle	KatG	B7UNR7_ECO27	Catalase peroxidase
Controle	GltX	B7UGA5_ECO27	Glutamate tRNA ligase
Controle	YhcB	B7UJW5_ECO27	Uncharacterized protein
Controle	SecB	SECB_ECO27	Protein export protein
Controle	Sra	B7URM0_ECO27	30S ribosomal subunit protein S22
Controle	SerC	SERC_ECO27	Phosphoserine aminotransferase
Controle	PyrB	PYRB_ECO27	Aspartate carbamoyltransferase
Controle	Pgm	B7UKX0_ECO27	Phosphoglucomutase
Controle	Fuma	B7URV2_ECO27	Fumarate hydratase class I
Adaptada	NemA	B7URZ1_ECO27	N ethylmaleimide reductase FMN linked
Adaptada	Ssb	B7UPM8_ECO27	Single stranded DNA binding protein
Adaptada	hslU	HSLU_ECO27	ATP dependent protease ATPase subunit
Adaptada	YqhD	B7UIR2_ECO27	Alcohol dehydrogenase NAD P dependent

Fonte: Do autor (2021).

**Tabela 2** - Proteínas diferencialmente expressas em EPEC. Identificadas pela proteômica.



<b>Accession</b>	<b>UniProt</b>	<b>Protein</b>	<b>Gene</b>	<b>Score</b>	<b>Cell</b>	<b>Protein Description</b>	<b>Biological Classes</b>
<b>UniProt</b>	<b>Expression</b>	<b>Expression</b>			<b>location</b>		
B7US16	B7US16_ECO27	Upregulated	lpp	22670,33	ME	Murein lipoprotein	Peptidoglycan-anchor protein metabolic process of response Stress
B7UH27	B7UH27_ECO27	Upregulated	clpB	6082,8	C	Chaperone protein ClpB	Gluconeogenesis, Glycolysis carbohydrate metabolic process
B7UPI6	G6PI_ECO27	Upregulated	pgi	1119,65	C	Glucose 6 phosphate isomerase	catalytic activity
B7UMY9	B7UMY9_ECO27	Upregulated	pflB	27891,35	C	Pyruvate formate lyase I	purine nucleoside metabolic process
B7UH18	GRCA_ECO27	Upregulated	grcA	114615,4	C	Autonomous glycyl radical cofactor	Uncharacterized protein response to oxidative stress
B7UR12	DEOD_ECO27	Upregulated	deoD	630,8	MC/P	Purine nucleoside phosphorylase DeoD type	glucose metabolic process cellular amino acid metabolic process
B7UG00	B7UG00_ECO27	Upregulated	yfcZ	32663,23	-	Uncharacterized protein	cell redox homeostasis/glycerol ether metabolic process
B7UKP9	B7UKP9_ECO27	Upregulated	ahpC	35578,22	C	Alkyl hydroperoxide reductase C22 subunit	protein refolding
B7USF9	B7USF9_ECO27	Upregulated	gapA	28643,64	P	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	carbohydrate metabolic process acetyl-CoA carboxylase activity
B7UPV3	B7UPV3_ECO27	Upregulated	cadA	827,27	C	Lysine decarboxylase 1	alcohol metabolic process carbohydrate metabolic process
B7UMN6	B7UMN6_ECO27	Upregulated	trxA	1016,87	MC	Thioredoxin	acetyl-CoA biosynthetic process tryptophanyl-tRNA aminoacylation
B7UPW3	CH60_ECO27	Upregulated	groL	10785,42	C	60 kDa chaperonin	superoxide dismutase activity transcription, DNA-templated
B7UJ18	B7UJ18_ECO27	Upregulated	tdcE	1898,66	C	Pyruvate formate lyase 4 2 ketobutyrate formate lyase	lyase activity (Catalysis)
B7UJY6	B7UJY6_ECO27	Downregulated	accB	640,37	C	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl CoA carboxylase	fatty acid biosynthetic process regulation of translation
B7UQD1	B7UQD1_ECO27	Downregulated	adhE	10610,6	C	Aldehyde alcohol dehydrogenase	ligand-gated ion channel activity
B7UI53	B7UI53_ECO27	Downregulated	talB	3456,12	C	Transaldolase	fatty acid biosynthetic process lysyl-tRNA aminoacylation (Catalytic activity)
B7UFV5	B7UFV5_ECO27	Downregulated	pta	5422,48	C	Phosphate acetyltransferase	translation
B7UK89	B7UK89_ECO27	Downregulated	trpS	3194,52	C	Tryptophan tRNA ligase	
B7URZ6	B7URZ6_ECO27	Downregulated	sodB	5563,94	C	Superoxide dismutase	
B7UM71	RPOZ_ECO27	Downregulated	rpoZ	2614,69	C	DNA directed RNA polymerase subunit ômega	
B7USM7	B7USM7_ECO27	Downregulated	eda	2459,5	C	Multifunctional 2 keto 3 deoxygluconate 6 phosphate aldolase and 2 keto 4 hydroxyglutarate aldolase	
B7UJ86	ACCA_ECO27	Downregulated	accA	896,78	C	Acetyl coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	
B7UPD9	RL1_ECO27	Downregulated	rplA	12500,26	C	50S ribosomal protein L1	
B7UM07	B7UM07_ECO27	Downregulated	glnH	670,02	MC	Glutamine transporter subunit	
B7UPA9	B7UPA9_ECO27	Downregulated	fabG	1347,8	C	3 oxoacyl acyl carrier protein reductase	
B7UHT9	B7UHT9_ECO27	Downregulated	lysS	2922,02	C	Lysine tRNA ligase	
B7UH55	RL19_ECO27	Downregulated	rplS	5133,42	C	50S ribosomal protein L19	

<b>Acession UniProt</b>	<b>UniProt Expression</b>	<b>Protein Expression</b>	<b>Gene</b>	<b>Score</b>	<b>Cell location</b>	<b>Protein Description</b>	<b>Biological Classes</b>
B7UK43	RL4_ECO27	Downregulated	RplD	8495,51	C	50S ribosomal protein L4	translation
B7UJ60	RS15_ECO27	Downregulated	RpsO	2531,36	C	30S ribosomal protein S15	translation
B7UQC8	B7UQC8_ECO27	Downregulated	GalU	860,6	C	UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase	biosynthetic process
B7UQK9	RS6_ECO27	Downregulated	RpsF	8334,88	C	30S ribosomal protein S6	translation
B7UGB8	B7UGB8_ECO27	Downregulated	Crr	6919,59	C	Glucose specific enzyme IIA component of PTS	phosphoenolpyruvate
B7UK37	RL16_ECO27	Downregulated	rplP	6948,14	C	50S ribosomal protein L16	translation
B7UPB0	ACP_ECO27	Downregulated	acpP	13914,4	C	Acyl carrier protein	Lipid biosynthesis
B7USN1	B7USN1_ECO27	Downregulated	pykA	1687,84	C	Pyruvate kinase	Glycolysis
B7UH62	GRPE_ECO27	Downregulated	grpE	5144,46	C	Protein GrpE	protein folding
B7UK30	RS8_ECO27	Downregulated	rpsH	2210,08	C	30S ribosomal protein S8 574521 GN rpsH PE 3	translation
B7UH58	RS16_ECO27	Downregulated	rpsP	9897,21	C	30S ribosomal protein S16	translation
B7URR6	B7URR6_ECO27	Downregulated	ydfZ	5274,46	-	Uncharacterized protein	Uncharacterized protein
B7UK21	RS11_ECO27	Downregulated	rpsK	8946,71	C	30S ribosomal protein S11	translation
B7UGN0	B7UGN0_ECO27	Downregulated	Bcp	1341,32	P	Thiol peroxidase Bcp thioredoxin dependent	cell redox homeostasis
B7UK20	RS4_ECO27	Downregulated	rpsD	11565,17	C	30S ribosomal protein S4	translation
B7UK33	RL24_ECO27	Downregulated	rplX	24010,79	C	50S ribosomal protein L24	translation
B7UGB5	B7UGB5_ECO27	Downregulated	cysK	2546,33	C	Cysteine synthase	Amino-acid biosynthesis, Cysteine biosynthesis
B7UK18	RL17_ECO27	Downregulated	rplQ	8530,7	ME	50S ribosomal protein L17	translation
B7UJW3	RL13_ECO27	Downregulated	rplM	9437,96	ME	50S ribosomal protein L13	translation
B7UQA3	KDSA_ECO27	Downregulated	kdsA	1856,42	C	2 dehydro 3 deoxyphosphooctonate aldolase	Lipopolysaccharide biosynthesis
B7ULL2	B7ULL2_ECO27	Downregulated	cydA	1634,63	MC	Cytochrome d terminal oxidase subunit I	aerobic electron transport chain
B7UK44	RL3_ECO27	Downregulated	rplC	10634,47	ME	50S ribosomal protein L3	translation
B7UHY9	METK_ECO27	Downregulated	metK	2579,04	C	S adenosylmethionine synthase	One-carbon metabolism
<b>Acession UniProt</b>	<b>UniProt Expression</b>	<b>Protein Expression</b>	<b>Gene</b>	<b>Score</b>	<b>Cell location</b>	<b>Protein Description</b>	<b>Biological Classes</b>

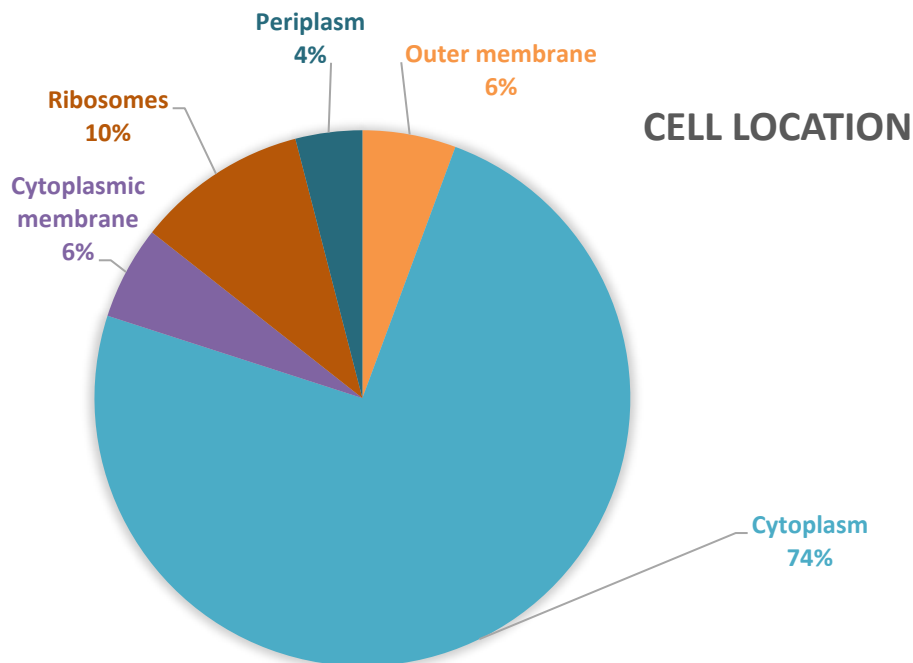
B7UPV9	B7UPV9_ECO27	Downregulated	aspa	5230	C	Aspartate ammonia lyase	aspartate metabolic process
B7UK29	RL6_ECO27	Downregulated	RplF	11684,9	R	50S ribosomal protein L6	translation
B7UK41	RL2_ECO27	Downregulated	RplB	2220,68	R	50S ribosomal protein L2	translation
B7UIX3	RS21_ECO27	Downregulated	RpsU	7795,56	R	30S ribosomal protein S21	translation
B7UL70	B7UL70_ECO27	Downregulated	GadA	22134,65	C	Glutamate decarboxylase	glutamate metabolic process
B7UK45	RS10_ECO27	Downregulated	RpsJ	9482,96	C	30S ribosomal protein S10	translation
B7UQL2	RL9_ECO27	Downregulated	RplI	23171,97	R	50S ribosomal protein L9	translation
B7URM6	B7URM6_ECO27	Downregulated	gadB	22063,24	C	Glutamate decarboxylase	glutamate metabolic process
B7UMJ9	ATPA_ECO27	Downregulated	atpA	4202,32	C	ATP synthase subunit alpha	ATP synthesis coupled proton transport
B7UMY4	SYS_ECO27	Downregulated	serS	1664,45	C	Serine tRNA ligase	Protein biosynthesis 5-phosphoribose 1-diphosphate biosynthetic process
B7UR11	DEOB_ECO27	Downregulated	deoB	2196,13	C	Phosphopentomutase HU DNA binding transcriptional regulator	chromosome condensation
B7UPF5	B7UPF5_ECO27	Downregulated	hupA	65578,42	C	alpha subunit	'de novo' AMP biosynthetic process
B7UQI6	PURA_ECO27	Downregulated	pura	1773,19	C	Adenylosuccinate synthetase	pyruvate dehydrogenase (acetyl- transferring) activity
B7UIG2	B7UIG2_ECO27	Downregulated	aceE	4232,93	C	Pyruvate dehydrogenase E1 component	cellular stress response to acidic pH
B7UL62	B7UL62_ECO27	Downregulated	hdeB	23110,81	P	Acid stress chaperone HdeB	translation
B7UK27	B7UK27_ECO27	Downregulated	rpsE	8815,1	C	30S ribosomal protein S5	glycolytic process
B7UHW7	B7UHW7_ECO27	Downregulated	fbaA	6722,09	C	Fructose bisphosphate aldolase class II	peptide usually present at the N-terminus of proteins
B7UL51	B7UL51_ECO27	Downregulated	Slp	16202,55	ME	Outer membrane lipoprotein	translational termination
B7UIL7	RRF_ECO27	Downregulated	Frr	1930,95	C	Ribosome recycling factor	translation
B7UIL4	RS2_ECO27	Downregulated	rpsB	6891,87	C	30S ribosomal protein S2	GTPase activity
B7UK50	EFG_ECO27	Downregulated	fusA	7848,78	C	Elongation factor G	Glycolysis
B7US15	B7US15_ECO27	Downregulated	pykF	8787,39	C	Pyruvate kinase	Cell cycle, Cell division
B7UJQ9	TIG_ECO27	Downregulated	Tig	3873,75	C	Trigger factor	glycine decarboxylation via glycine cleavage system
B7UHV2	GCSH_ECO27	Downregulated	gcvH	13361,96	C	Glycine cleavage system H protein	transcription, DNA-templated
B7UK19	B7UK19_ECO27	Downregulated	rpoA	4281,32	C	DNA directed RNA polymerase subunit alpha	glutamine biosynthetic process
B7UNJ2	B7UNJ2_ECO27	Downregulated	glnA	3877,29	C	Glutamine synthetase	Protein biosynthesis
B7UK49	B7UK49_ECO27	Downregulated	tufA	40671,28	C	Elongation factor Tu	

<b>Accession UniProt</b>	<b>UniProt Expression</b>	<b>Protein Expression</b>	<b>Gene</b>	<b>Score</b>	<b>Cell location</b>	<b>Protein Description</b>	<b>Biological Classes</b>
B7UMZ7	B7UMZ7_ECO27	Downregulated	rpsA	5968,06	R	30S ribosomal protein S1	translation
B7UK25	RL15_ECO27	Downregulated	rplO	9165,61	R	50S ribosomal protein L15	translation
B7UK36	RL29_ECO27	Downregulated	rpmC	38987,34	R	50S ribosomal protein L29	translation
B7UHY1	B7UHY1_ECO27	Downregulated	tktA	2915,56	C	Transketolase	Transferase
B7UKR5	B7UKR5_ECO27	Downregulated	cspE	11642,78	C	DNA binding transcriptional repressor ATP dependent Clp protease proteolytic subunit	DNA binding
B7UJR0	B7UJR0_ECO27	Downregulated	clpP	1186,65	C	ATP dependent Clp protease proteolytic subunit	serine-type endopeptidase activity
B7UKZ0	B7UKZ0_ECO27	Downregulated	asd	1360,01	C	Aspartate semialdehyde dehydrogenase	Amino-acid biosynthesis
B7UK28	RL18_ECO27	Downregulated	rplR	3226,45	C	50S ribosomal protein L18	translation
B7UKF4	KAD_ECO27	Downregulated	adk	2440,83	C	Adenylate kinase HU DNA binding transcriptional regulator	AMP salvage
B7UJR3	B7UJR3_ECO27	Downregulated	hupB	10557,36	C	beta subunit	chromosome condensation
B7UPE3	B7UPE3_ECO27	Downregulated	rpoC	1342,36	C	DNA directed RNA polymerase subunit beta	transcription, DNA-templated
B7UJN8	RISB_ECO27	Downregulated	ribH	1498,17	C	67 dimethyl 8 ribityllumazine synthase	riboflavin biosynthetic process
B7UK22	B7UK22_ECO27	Downregulated	rpsM	7561,27	C	30S ribosomal protein S13	translation
B7UPE1	RL7_ECO27	Downregulated	rplL	11021,96	R	50S ribosomal protein L7 L12	translation
B7UFV4	B7UFV4_ECO27	Downregulated	ackA	4186,8	MC	Acetate kinase	acetyl-CoA biosynthetic process
B7UIM3	B7UIM3_ECO27	Downregulated	skp	2619,66	P	Periplasmic chaperone	unfolded protein binding phosphate-containing compound metabolic process
B7UQN7	B7UQN7_ECO27	Downregulated	ppa	2555,58	C	Inorganic pyrophosphatase	process
B7UK39	RL22_ECO27	Downregulated	rplV	11566,93	R	50S ribosomal protein L22	translation
B7UPE2	RPOB_ECO27	Downregulated	rpoB	1081,41	C	DNA directed RNA polymerase subunit beta	transcription, DNA-templated
B7UMJ7	ATPB_ECO27	Downregulated	atpD	3774,35	MC	ATP synthase subunit beta	ATP synthesis coupled proton transport
B7UPD5	B7UPD5_ECO27	Downregulated	tufB	40671,28	C	Elongation factor Tu	Protein biosynthesis

<b>Accession UniProt</b>	<b>UniProt Expression</b>	<b>Protein Expression</b>	<b>Gene</b>	<b>Score</b>	<b>Cell location</b>	<b>Protein Description</b>	<b>Biological Classes</b>
B7UPA5	RL32_ECO27	Downregulated	rpmF	16321,94	R	50S ribosomal protein L32	translation regulation of transcription, DNA-templated
B7UQC9	B7UQC9_ECO27	Downregulated	hns	8296,66	C	DNA binding protein Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	Glycolysis Glycolysis
B7UIG3	B7UIG3_ECO27	Downregulated	aceF	1382,52	C		Glycolysis
B7UHW8	B7UHW8_ECO27	Downregulated	pgk	17661,34	ME	Phosphoglycerate kinase	Glycolysis
B7UPE0	RL10_ECO27	Downregulated	rplJ	11560,89	C	50S ribosomal protein L10	ribosome biogenesis/translation
B7USJ9	B7USJ9_ECO27	Downregulated	cspC	16100,05	C	Stress protein member of the CspA family	nucleic acid binding
B7UJ05	B7UJ05_ECO27	Downregulated	yqjD	3767,87	-	Uncharacterized protein	ribosome binding
B7UIL5	EFTS_ECO27	Downregulated	Tsf	8290,97	C	Elongation factor Ts	translation elongation factor activity
B7UK51	RS7_ECO27	Downregulated	rpsG	18610,05	C	30S ribosomal protein S7	translation
B7UK38	RS3_ECO27	Downregulated	rpsC	14383,56	C	30S ribosomal protein S3	translation

Comparação da expressão proteica de *Escherichia coli* Enteropatogênica adaptada ao cinamaldeído com relação as proteínas reguladas positiva e negativamente, identificadas por nanoUPLC-MS<sup>E</sup> e sua participação no processo biológico bacteriano. \* A expressão diferencial de proteína foi considerada significativa em uma razão Log (e)  $\geq 0,5$ . A terminação “\_ECO27” foi omitida no número de acesso do UniProt. Localização celular: C, citoplasma; ME, Membrana Externa; R, Ribossomos; MC, Membrana Citoplasmática; P, Periplasma.

Figura 7 - Porcentagem de proteínas diferencialmente expressas, indentificadas em diferentes localizações celulares, expressas por EPEC adaptada ao cinamaldeído.



Conforme mencionado na literatura, células de *E. coli* sintetizam (Pinto et al., 2013) e superexpressam (Weber et al., 2006) certas proteínas para lidar com diferentes condições de estresse, o que foi comprovado neste estudo. Os achados corroboram que as proteínas identificadas estão envolvidas em várias vias metabólicas importantes nos processos celulares. Interessantemente, este estudo indicou que a adaptação de EPEC ao cinamaldeído é exercida pela superexpressão de proteínas responsáveis pela resposta ao estresse oxidativo (ahpC), causado pelo antimicrobiano nas células, evidenciando também neste processo adaptativo, o metabolismo de carboidratos (clpB, pflB, tdcE, gapA), aminoácidos (clpB, cadA), a integridade dos lipídios (lpp) e a glicose 6 fosfato isomerase (pgi).

Em contraste, as células regularam negativamente processos relacionados a biossíntese lipídica (accA, fabG, acpP, kdsA, slp), a transcrição (rpoZ, rpoA, RPOc, rpoB) incluindo a proteína repressora transcricional de ligação ao DNA – cspE, hnS, cspC, ) , a tradução (rplA, rplS, rplD, rpsO, rpsF, rplP, rpsH, prsP, rpsK, rpsD, rplX, rplQ, rplM, rplC, rplF, rplB, rpsU,

rpsJ, rpll, rpsE, frR, rpsB, rpsA, rplO, rpmC, rplR, rpsM, rplL, rplV, rpmF, rplJ, Tsf, rpsG, rpsC), uma proteína específica deligação ao tRNA (Serina tRNA ligase, serS), proteínas específicas de biossíntese proteica (cysK, tufA, tufB), proteína de condensação cromossômica (hupA, hupB), proteína de resposta ao estresse ácido (hdeB, GadA e GadB), proteína indutora da divisão celular (Tig). Esta regulação negativa pode ser sustentada por estudos anteriores, que pressupões que o cinamaldeído se liga à proteína FtsZ, inibindo sua polimerização dependente de GTP e, assim, evitando divisão (Domadia et al., 2007; Hemaiswarya et al., 2011).

A regulação positiva de proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos (clpB e cadA), acrescenta ao corpo de conhecimento existente que cinamaldeído ativa o metabolismo de aminoácidos através da regulação positiva de enzimas com atividade aminoácido descarboxilase. Em microrganismos, a lisina descarboxilase é uma enzima induzida por meio ácido que é codificada por cadA e faz parte de um operon cadBA. Sendo significativamente expressa por alterações no pH externo, excesso de lisina e baixos níveis de oxigênio (Kikuchi et al. 1997). Complementando esta informação, Park e colaboradores (2017), enfatizam que o CadA prefere condições ácidas com um pH ideal de 6,0. Esses achados corroboram com o presente estudo devido a EPEC ter sido adaptada ao cinamaldeído (pH final do meio em torno de 6), opostamente aos achados por Amalaradjou & Venkitanarayanan, (2011), Wendakoon & Morihiko, (1995), que observaram a regulação negativa de enzimas relacionadas a esta via metabólica em *Cronobarter sakazakii* e *Enterobacter aerogenes*, respectivamente.

A glicose 6-fosfato isomerase (pgi), é uma proteína multifuncional e está envolvida na glicólise/gliconeogênese, sendo responsável por catalisar a isomerização reversível de uma aldose, glicose 6-fosfato, em cetose, frutose 6-fosfato (Cordeiro et al. 2004; Han et al. 2014). Como previsto pela variação relativamente pequena da energia livre-padrão, essa reação processa-se facilmente em qualquer das duas direções. Esta isomerização tem um papel crítico na química global da via glicolítica, uma vez que o rearranjo dos grupos carbonila e hidroxila nos C-1 e C-2 é uma condição necessária para os dois passos seguintes da via (Han et al. 2014).

Outra proteína superexpressa neste estudo que também possui atividade catalítica é a gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (gapA). Essa localiza-se na superfície celular e perfaz uma proteína tetramérica composta por quatro subunidades idênticas. É responsável por catalisar uma das reações da glicólise, a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, produzindo 1,3-bifosfoglicerato e NADH (Schmalhausen et al. 2019). Cada uma das quatro subunidades, inclui um local ativo com um resíduo catalítico de cisteína. Como a enzima está envolvida no metabolismo da glicose, sua principal função é fornecer energia para diferentes funções celulares. Além disso, nas bactérias, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase associada à

superfície celular pode servir como um receptor para proteínas reguladoras (Sheokand et al. 2013).

O aumento da expressão das proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos (clpB, pflB, tdcE, gapA), favorece a geração de equivalentes redutores que são necessários na fosforilação oxidativa para a síntese de ATP. A capacidade do cinamaldeído induzir a expressão de proteínas de membrana (deoD, trxA), favorece difusão e o transporte ativo através da membrana celular (**Figura 2**). Essa importante descoberta, condiz que em dose subletal, o cinamaldeído não rompe a membrana citoplasmática e não inibe o transporte ativo através dela conforme mecanismo elucidado anteriormente com células expostas em doses letais do antimicrobiano (Burt, 2004; Helander et al., 1998).

Ainda, a superexpressão de piruvato formato liase I (pflB) e a piruvato formato liase 4, 2 ketobutirato formato liase (tdcE) devem ser evidenciadas. Segundo Zelcbuch e colaboradores (2016), a piruvato formato liase (PFL) é uma enzima que auxilia o aumento do rendimento de ATP durante a fermentação de açúcares, tornando-se responsável pela catálise da reação  $\text{acetil-CoA} + \text{formato} = \text{CoA} + \text{piruvato}$ . Portanto, o formato é um intermediário da via redutora de acetil-CoA (Schuchmann & Muller 2014). A piruvato formato liase quebra a ligação C-C do piruvato para produzir formato e acetil-CoA, fornecendo acetil-CoA às vias metabólicas, incluindo o ciclo do ácido cítrico após a glicólise (Knappe & Sawers 1990; Knappe & Wagner 1995).

Embora uma protease dependente de ATP (hslU) tenha sido observada nas células adaptadas (**Tabela 1**), os níveis de ATP foram regulados negativamente em EPEC após o tratamento com cinamaldeído. Isso foi observado pela down expressão das proteínas atpA, cspE, atpD e cydA, (**Tabela 2**), o que foi consistente com os estudos anteriores (Gill & Holley, 2006; Du et al. 2021) e confirmado pela expressão diminuída de cydA, uma enzima envolvida aerobicamente na cadeia de transporte de elétrons.

Em concentrações subletais, o cinamaldeído ganha acesso a periplasma e inibe a atividade da ATPase transmembrana. As concentrações subletais de cinamaldeído não afetaram a integridade da membrana externa de *E. coli*, mas inibiu o crescimento e bioluminescência de *Photobacterium leiognathi*, indicando que o cinamaldeído ganha acesso ao periplasma e possivelmente também o citoplasma (Helander et al., 1998). A habilidade de cinamaldeído para acessar o periplasma foi confirmado pela demonstração de diminuição na atividade ATPase de membranas celulares isoladas em concentrações crescentes de cinamaldeído (13,6–1362 µg / mL), (Gill & Holley, 2006 a, b). A inibição da ATPase foi, no entanto, sugerida não ser a principal causa de morte celular porque a concentração necessária para inibir a ATPase também



resultou em ruptura de membrana de células de *E. coli* (681–1362µg /mL), (Gill & Holley, 2006a).

A proteína Chaperonina de 60 kDa (codificada pelo gene *groL*) está envolvida no processo metabólico de proteínas de resposta ao estresse celular e perfaz um sistema multi-chaperona induzido por estresse em cooperação com DnaK, DnaJ e GrpE. As chaperonas auxiliam as cadeias polipeptídicas nascentes a formar suas conformações nativas. Em um ambiente repleto de proteínas, a disponibilidade de chaperonas pode ser limitada, levando à instabilidade e agregação de proteínas (Despa et al., 2005). Assim, a adição de chaperonas, leva ao aumento de sua disponibilidade ajudando a solubilizar as proteínas alvo durante a superexpressão (Roman et al., 2011).

Uma lipoproteína foi caracterizada com sua expressão aumentada (*lpp*) em EPEC adaptada ao cinamaldeído. Essa proteína perfaz a membrana celular externa e funciona como uma âncora de lipídios na ancoragem de peptideoglicano (cadeias de N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico ligadas umas às outras por peptídeos da parede celular) (Gray et al., 2015), consistente com os fortes efeitos antibacterianos do cinamaldeído que perturba a membrana bacteriana (Bozik et al., 2018). Em bactérias Gram-negativas, a ligação ocorre através da formação de uma ligação isopeptídica entre o grupo épsilon-amino de uma lisina e o grupo alfa-carboxil de um ácido peptidoglicano diaminopimérico (Asakura et al., 2008). Em seu estudo, Marani, (2006) identificou cinco novas proteínas de membrana externa de *E.coli* (YftM, YaiO, YfaZ, CsgF e YliI) e enfatizou a descoberta de YfaL como um autotransportador de membrana externa.

A proteína de ligação ao DNA HU-alfa (*hupA*) em EPEC tratada com cinamaldeído é consistente com condições ambientais extremas. A expressão negativa desta proteína favorece a desnaturação do DNA. Mutantes duplos de *E. coli* (*hupA*, *hupB*) que carecem de proteína HU têm graves defeitos celulares na divisão celular, dobramento de DNA e partição de DNA (Dri et al., 1991). Neste estudo, a falha nesses processos é também evidenciada pela expressão negativa da proteína indutora da divisão celular (*Tig*).

As proteínas ribossomais (*rplA*, *rplS*, *rplD*, *rpsO*, *rpsF*, *rplP*, *rpsH*, *prsP*, *rpsK*, *rpsD*, *rplX*, *rplQ*, *rplM*, *rplC*, *rplF*, *rplB*, *rpsU*, *rpsJ*, *rplI*, *rpsE*, *frR*, *rpsB*, *rpsA*, *rplO*, *rpmC*, *rplR*, *rpsM*, *rplL*, *rplV*, *rpmF*, *rplJ*, *Tsf*, *rpsG*, *rpsC*), foram negativamente expressas em EPEC tratada com o cinamaldeído. Essas proteínas são parte das subunidades ribossômicas citosólica e permitem a ligação ao RNA. A proteínas *rplA-L1*, *rplS-L19*, *rplD-L4*, *rplP-L16*, *rplX-L24*, *rplQ-L17*, *rplM-L13*, *rplC-L3*, *rplF-L6*, *rplB-L2*, *rplI-L9*, *rplO-L15*, *rpmC-L29*, *rplR-L18*, *rplL-L7*, *L12*, *rplV-L22*, *rpmF-L32*, *rplJ-L10*, perfazem o complexo ribossomal 50S (Hemm et al.,

2020; Wada & Sako, 1987) . Já, as proteínas rpsO –S15, rpsF-S6, rpsH-S8, rsP-S16, rpsK-S11, rpsD-S4, rpsU-S21, rpsJ-S10, rpsE-S5, rpsB-S2, rpsA-S1, rpsM-S13, rpsG-S7, rpsC-S3, perfazem parte integrante do ribossomo, da subunidade 30S em fase estacionária e, em menor grau, exponencial (Izutsu et al., 2001). Algumas atuam na agregação, arranjo e ligação de RNAs e como proteínas constituintes para formar a grande subunidade ribossômica. Em *E. coli*, os genes rpmD e lolD, rplC e rpoB são essenciais para o crescimento celular (Yamaguchi et al., 2012). Estes achados hipotetizam portanto, o cessamento da replicação de EPEC adaptada ao cinamaldeído.

A proteína purina nucleosídeo fosforilase tipo DeoD (deoD), localizada na membrana citoplasmática e está envolvida no metabolismo da purina e da pirimidina. A proteína catalisa a fosforólise reversível da ligação N-glicosídica dos ribonucleosídeos  $\alpha$ -purina (desoxi) para  $\beta$ - (desoxi) 1-ribose e as correspondentes bases purinas (Mascia et al., 2000).

### **3.4 Estresse oxidativo causado pelo cinamaldeído**

O dano oxidativo aos lipídios pode levar à produção de uma variedade de hidroperóxidos de alquila, que são particularmente prejudiciais devido à sua capacidade de iniciar reações de radicais livres em cadeia. As enzimas envolvidas na degradação dos hidroperóxidos são, portanto, importantes para a proteção contra o estresse oxidativo (Shrivastava et al., 2015).

O cinamaldeído pode induzir estresse oxidativo e gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) para matar as células (Huang et al., 2007). Este fenômeno pode ser elucidado pela produção de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH). NADH é uma coenzima importante que exerce um papel vital nas reações biológicas redox, visto que altos níveis de NADH podem promover a produção de ROS (Vinogradov & Grivennikova, 2016). No presente estudo, relatamos a superexpressão da proteína ahpC de EPEC, como uma proteína antioxidante com atividade de alquil hidroperoxidase. Essa desempenha um papel crucial na redução de peróxido, funcionando como proteína semelhante a Trx (Hillas et al. 2000), proteína também caracterizada neste estudo (trxA). A proteína Tioredoxina (trxA), é uma proteína envolvida na homeostase redox celular, pertence a uma classe de pequenas proteínas ativas redox (E12 kDa) e é essencial para a regeneração da metionina sulfóxido redutase. Estudos demonstraram que a expressão do gene trxA é aprimorada por vários estresses, principalmente os oxidativos (Mostertz et al. 2008). Similariamente a este estudo, (Bozik et al., 2018; Hemm et al., 2010), também observaram a superexpressão de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo de

cinamaldeído em *E.coli*.

Contrariamente ao estresse oxidativo, o estresse ácido não prevaleceu como ação antibacteriana de cinamaldeído em EPEC, visto que GadA e GadB foram subexpressas neste estudo. Em um estudo realizado por Du et al., (2021), os autores relataram que o cinamaldeído causa a morte celular através do estresse ácido provocado pela toxicidade do grupo aldeído. Porém, EPEC adaptada expressou uma enzima de desintoxicação do aldeído (yqhD – álcool desidrogenase, dependente de NAD (P) que atua na catálise de uma reação de oxidação-redução) e observamos também, que outra proteína com a função catalítica do grupo aldeído foi alterada, a grcA. Enzimas do radical glicil (GREs), como a superexpressa (grcA) neste estudo, utilizam um cofator do radical glicil para realizar uma variedade diversa de reações enzimáticas quimicamente desafiadoras em bactérias anaeróbicas (Bowman et al., 2019).

Embora o radical glicil seja um poderoso catalisador, ele também é sensível ao oxigênio, de modo que a exposição ao oxigênio causa a clivagem do GRE no local do radical e essa sensibilidade ao oxigênio representa um desafio para os anaeróbios facultativos que residem em áreas propensas à exposição ao oxigênio (Knappe & Wagner, 1995).

Uma vez que os GREs são irreversivelmente danificados por oxigênio, as células precisam criar novas GREs ou de alguma forma, reparar a danificada. Essas proteínas estão envolvidas na catalisação da conversão do grupo aldeído no grupo carboxila (ácido orgânico) (Du et al., 2021) e indicam que o cinamaldeído perturba diretamente a via envolvida.

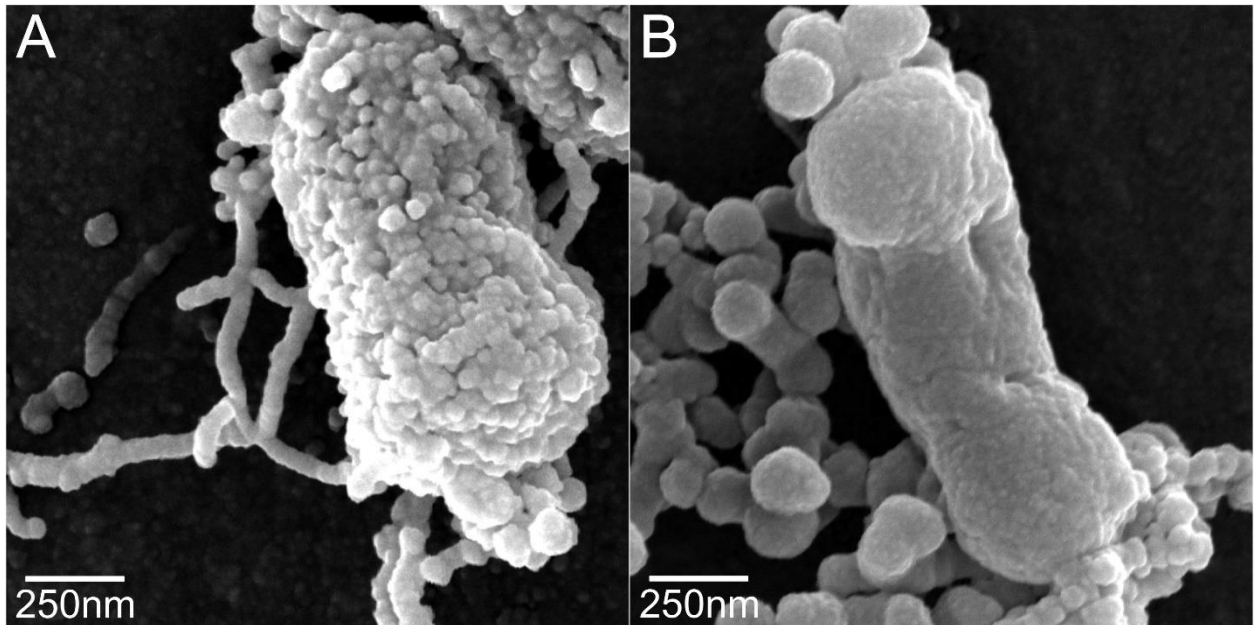
### 3.5 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Observamos as células de EPEC controle e adaptada ao cinamaldeído através da análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (**Figura 8 A, B**), utilizando o equipamento modelo FEG Tescan Clara Sem/Stem UHR (Ultra High Resolution). Inicialmente, as células de EPEC foram cultivadas nas mesmas condições de cultivo para análise proteômica (ver seção 2.6.1), na dose subletal de cinamaldeído (0,156 mg/mL), durante 6 horas de exposição. Simultaneamente, células de EPEC foram cultivadas isentas do antimicrobiano. Posteriormente, foi realizada a preparação das amostras de EPEC obtidas em ambas as condições de cultivo (ver seção 2.7).

A capacidade de cinamaldeído alterar a morfologia de EPEC foi claramente mostrada por microscopia eletrônica através de mudanças morfológicas significativas (**Figura 8 B**), em comparação com as células intactas (**Figura 8 A**). As células bacterianas não tratadas tinham um formato de bastonete com superfícies intactas (**Figura 8 A**), enquanto as células bacterianas

tratadas com cinamaldeído mostraram diferentes graus de deformação, além de agregação (Figura 8 B).

**Figura 8** - Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura.



(A) Células de EPEC em condição normal de crescimento (controle). (B) Células de EPEC adaptadas ao cinamaldeído.

Uma modificação na estrutura das células, além da formação de uma protuberância nas extremidades foram observadas. Moghimi et al., (2016), também verificaram modificações nas membranas celulares de *E.coli*, porém utilizando nanoemulsão de óleo essencial. Os autores hipotetizaram que pequenas partículas de lipídios dentro da nanoemulsão foram capazes de trazer o óleo essencial para a superfície da membrana celular. Esses achados condizem que a bactéria altera, além de seu perfil proteico, sua morfologia para sobreviver ao estresse causado pelo cinamaldeído.

A análise de MEV confirma a hipótese de que a ruptura da membrana citoplasmática de EPEC não foi o mecanismo alvo de ação antibacteriana pelo cinamaldeído em dose subletal, indicando também sua ação intracelular. O cinamaldeído, um fenilpropanóide pode cruzar a membrana bacteriana sem interferência ou dano devido a sua lipofilicidade e atuar internamente para causar a morte celular.

Alterações intracitoplasmáticas bacterianas decorrentes da ação de cinamaldeído já foram relatadas na literatura. Ao avaliar as alterações morfológicas causadas pelo cinamaldeído em *E.coli*, Amalaradjou & Venkitanarayanan (2011), Du et al., (2021), relataram ausência de

motilidade nas células tratadas com trans-cinamaldeído, isso é sustentado neste estudo, onde, na análise de microscopia foi possível observar alterações nos flagelos de células adaptadas ao antimicrobiano (Figura 8, B). Porém, análises de motilidade se fazem necessárias para essa conclusão. Complementariamente, Amalaradjou & Venkitanarayanan, (2011), observaram que o cinamaldeído compromete a motilidade, fixação e capacidade de invasão e as defesas celulares de *C. sakazakii* contra o estresse oxidativo, atenuando assim sua virulência.

Portanto, indentificamos 107 proteínas em *Escherichia coli* adaptada ao cinamaldeído, onde 13 se apresentaram com expressão aumentada e 97 com expressão diminuída. Os dados proteômicos revelaram que a *Escherichia coli* Enteropatogênica adaptada ao cinamaldeído, torna-se mais tolerante a doses aumentadas do antimicrobiano, doses estas, antes consideradas letais. Nossos resultados não apenas apoiam teorias anteriores sobre o impacto de cinamaldeído nas membranas bacterianas e na parede celular (Bakkali et al., 2008; Nazzaro et al., 2013), mas também fornecem evidências de diferentes mecanismos de ação que levam a diversas respostas bacterianas, evidenciando aqui, a adaptação.

#### 4. CONCLUSÃO

Após a exposição á concentração subletal do cinamaldeído, foi induzida a adaptação causando mudanças quantitativas e qualitativas no proteoma de EPEC, resultando em um aumento de proteínas relacionadas a processos metabólicos celulares, com ênfase na resposta ao estresse oxidativo sofrido por EPEC, e uma diminuição na concentração de proteínas relacionadas a tradução, processos biossintéticos e divisão celular, o que foi confirmado através da análise proteômica em nanoUPLC –MS<sup>E</sup>. A exposição bacteriana a doses subletais de antimicrobianos perfaz um risco á saúde pública pela capacidade adaptativa em doses antes consideradas letais ao crescimento. Portanto, o uso correto de cinamaldeído deve ser respeitado.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Universidade Católica de Brasília, em especial aos professores Octávio Luiz Franco e Marcelo Henrique Soller Ramada pela parceria. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudos, ao Laboratório de Espectrometria de Massas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte na análise por Espectrometria de Massas, ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras e a FINEP, FAPEMIG e CNPQ pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo Microscopia Eletrônica e suporte financeiro. Os autores não têm conflito de interesse a declarar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aabed, K., Mohammed, A. E., Benabdelkamel, H., Masood, A., Alfadda, A. A., Alanazi, I. O., & Alnehmi, E. A. (2020). Antimicrobial Mechanism and Identification of the Proteins Mediated by Extracts from *Asphaltum punjabianum* and *Myrtus communis*. *ACS Omega*, 5(48), 31019–31035. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04047>
- Almeida, E. T. da C., de Souza, G. T., de Sousa Guedes, J. P., Barbosa, I. M., de Sousa, C. P., Castellano, L. R. C., Magnani, M., & de Souza, E. L. (2019). *Mentha piperita* L. essential oil inactivates spoilage yeasts in fruit juices through the perturbation of different physiological functions in yeast cells. *Food Microbiology*, 82(January), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.023>
- Amalaradjou, M. A. R., & Venkitanarayanan, K. (2011). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of trans-cinnamaldehyde against *Cronobacter sakazakii* 415. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(10), 1095–1102. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0841>
- Asakura, H., Kawamoto, K., Haishima, Y., Igimi, S., Yamamoto, S., & Makino, S. ichi. (2008). Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Research in Microbiology*, 159(9–10), 709–717. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.08.005>
- 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>
- Bombaywala, S., Dafale, N. A., Jha, V., Bajaj, A., & Purohit, H. J. (2021). Study of indiscriminate distribution of restrained antimicrobial resistome of different environmental niches. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(9), 10780–10790. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11318-6>
- Božik, M., Cejnar, P., Šašková, M., Nový, P., Maršík, P., & Klouček, P. (2018a). Stress response of *Escherichia coli* to essential oil components – insights on low-molecular-weight proteins from MALDI-TOF. *Scientific Reports*, 8(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31255-2>
- 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>
- Canizalez-roman, A., Gonzalez-Nuñez, E., Vidal, J.E., Flores-Villaseñor, H., León-Sicairos, N. (2013). Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *Int J Food Microbiol.* 164(1):36-45.



- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.
- Chubukov, V., Gerosa, L., Kochanowski, K., & Sauer, U. (2014). Coordination of microbial metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 12(5), 327–340. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3238>
- Despa, F., Orgill, D. P., & Lee, R. C. (2005). Effects of crowding on the thermal stability of heterogeneous protein solutions. *Annals of Biomedical Engineering*, 33(8), 1125–1131. <https://doi.org/10.1007/s10439-005-5780-8>
- Dias, M. T., Bricio, S. S. L., Almeida, D. O., Oliveira, L. a. t. *et al.* (2012). Molecular characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of enteropathogenic E-coli (EPEC) isolated from minas soft cheese. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*, 32, n. 4, p. 747-753.
- Dri, A. M., Rouviere-Yaniv, J., & Moreau, P. L. (1991). Inhibition of cell division in hupA hupB mutant bacteria lacking HU protein. *Journal of Bacteriology*, 173(9), 2852–2863. <https://doi.org/10.1128/jb.173.9.2852-2863.1991>
- Du, Gao-Fei., Yin, Xing-Feng., Yang, Dong-Hong., He, Qing-Yu., Sun, Xuesong. (2021). Proteomic Investigation of the Antibacterial Mechanism of *trans*-Cinnamaldehyde against *Escherichia coli*. *J Proteome Res.* 7;20(5):2319-2328.
- Ekiert, D. C., Bhabha, G., Isom, G. L., Greenan, G., Ovchinnikov, S., Henderson, I. R., Cox, J. S., & Vale, R. D. (2017). Architectures of Lipid Transport Systems for the Bacterial Outer Membrane. *Cell*, 169(2), 273-285.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.019>
- Escalante, A., Cervantes, A. S., Gosset, G., & Bolívar, F. (2012). Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system: Peculiarities of regulation and impact on growth and product formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(6), 1483–1494. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4101-5>
- Ferro, T. A. F., Araújo, J. M. M., Pinto, B. L. do S., dos Santos, J. S., Souza, E. B., da Silva, B. L. R., Colares, V. L. P., Novais, T. M. G., Filho, C. M. B., Struve, C., Calixto, J. B., Monteiro-Neto, V., da Silva, L. C. N., & Fernandes, E. S. (2016). Cinnamaldehyde inhibits staphylococcus aureus virulence factors and protects against infection in a galleria mellonella model. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02052>
- Gasperotti, A., Göing, S., Fajardo-Ruiz, E., Forné, I., & Jung, K. (2020). Function and regulation of the Pyruvate transporter CstA in *escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21239068>
- Geromanos, S.J., Vissers, J.P., Silva, J.C., Dorschel, C.A., Li, G.Z. Gorenstein, M.V., Bateman,

- R.H., Langridge, J.I. (2009). The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics*.v. 9, p.1683-1695.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.046>
- Gómez-Aldapa, C.A., Torres-Vitela, M.R., Acevedo- Sandoval, O.A., Rangel-Vargas, E., Villarruel-López, A., Castro-Rosas, A. (2013). Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteroinvasive *E. coli*, enteropathogenic *E. coli*, and enterotoxigenic *E. coli* on tomatoes from public markets in Mexico. *J Food Prot.*76(9):1621-5.
- Grabowicz, M., & Silhavy, T. J. (2017). Redefining the essential trafficking pathway for outer membrane lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(18), 4769–4774. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702248114>
- Gray, A. N., Egan, A. J. F., van't Veer, I. L., Verheul, J., Colavin, A., Koumoutsis, A., Biboy, J., Altelaar, M. A. F., Damen, M. J., Huang, K. C., Simorre, J. P., Breukink, E., den Blaauwen, T., Typas, A., Gross, C. A., & Vollmer, W. (2015). Coordination of peptidoglycan synthesis and outer membrane constriction during *Escherichia coli* cell division. *ELife*, 4(MAY), 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.07118>
- Hemm, M. R., Paul, B. J., Miranda-Ríos, J., Zhang, A., Soltanzad, N., & Storz, G. (2010). Small stress response proteins in *Escherichia coli*: Proteins missed by classical proteomic studies. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 46–58. <https://doi.org/10.1128/JB.00872-09>
- Hemm, M. R., Weaver, J., & Storz, G. (2020). *Escherichia coli* Small Proteome . *EcoSal Plus*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0031-2019>
- Huang, T. C., Fu, H. Y., Ho, C. T., Tan, D., Huang, Y. T., & Pan, M. H. (2007). Induction of apoptosis by cinnamaldehyde from indigenous cinnamon *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh through reactive oxygen species production, glutathione depletion, and caspase activation in human leukemia K562 cells. *Food Chemistry*, 103(2), 434–443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.018>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Izutsu, K., Wada, C., Komine, Y., Sako, T., Ueguchi, C., Nakura, S., & Wada, A. (2001). *Escherichia coli* ribosome-associated protein SRA, whose copy number increases during stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 183(9), 2765–2773. <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2765-2773.2001>
- Jang, M. H., Piao, X. L., Kim, J. M., Kwon, S. W., & Park, J. H. (2008). Inhibition of

cholinesterase and amyloid- $\beta$ ; aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. *Phytotherapy Research*, 22(4), 544–549. <https://doi.org/10.1002/ptr>

- Levine M. M., Bergquist E. J., Nalin, D. R., Waterman, D. H., Hornick, R. B., Young, C. R., Sotman, S., Rowe, B. (1978). *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet*. Volume 311, Issue 8074, Pages 1119-1122.
- Li, G.Z; Vissers, J.P; Silva, J.C; Golick, D., Gorenstein, M. V., Geromanos, S. J. (2009). Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*. v. 9, p.1696-1719.
- Lundén, J. M. et al. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 265-272.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clarck, D.P. (2010). *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Martins, A. G. L. A. et al. (2010). Antibacterial activity of essential basil oil against serogroups of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from lettuce. *Ciencia Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 8, p. 1791-1796, ago. 2010.
- Marani, P. (2006). New *Escherichia coli* outer membrane proteins identified through prediction and experimental verification. *Protein Science*, 15(4), 884–889. <https://doi.org/10.1110/ps.051889506>
- Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., & McClements, D. J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry*, 194, 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.139>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2019). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (29th ed.). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Oliveira, T. L. C. de, Haddad, G. de B. S., Ramos, A. de L. S., Ramos, E. M., Piccoli, R. H., & Cristianini, M. (2019). Optimization of high pressure processing to reduce the safety risk of low-salt ready-to-eat sliced turkey breast supplemented with carvacrol. *British Food Journal*, 121(11), 2592–2606. <https://doi.org/10.1108/BFJ-10-2018-0646>
- Oliveira, M. M. et al. (2012). Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed in stainless steel surfaces. *European Food Research & Technology*, Berlin, v. 234, n. 5, p. 821-832.
- Otero, V., Rodríguez-Calleja, J.M., Otero, A., García-López, M.L., Santos, JA. (2013). Genetic

characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from ewes' milk, sheep farm environments, and humans by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 79(19):5864-9.

- Pei, R. S. et al. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method authors. *Journal of Food Science*, Champaign, v. 74, p. M379-M383.
- Pinelli, J. J., Helena de Abreu Martins, H., Guimarães, A. S., Isidoro, S. R., Gonçalves, M. C., Junqueira de Moraes, T. S., Ramos, E. M., & Piccoli, R. H. (2021). Essential oil nanoemulsions for the control of *Clostridium sporogenes* in cooked meat product: An alternative? *Lwt*, 143(February). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111123>
- Roman, S. G., Chebotareva, N. A., Eronina, T. B., Kleymenov, S. Y., Makeeva, V. F., Poliansky, N. B., Muranov, K. O., & Kurganov, B. I. (2011). Does the crowded cell-like environment reduce the chaperone-like activity of  $\alpha$ -crystallin? *Biochemistry*, 50(49), 10607–10623. <https://doi.org/10.1021/bi201030y>
- Sakkejha, H., Byrne, L., Lawson, A.J., Jenkins, C. (2013). An update on the microbiology and epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* in England 2010-2012. *J Med Microbiol.* 62(10):1531-4.
- Santos, J.M., Gonçalves, M. C., Martins, H. H. A., Pinelli, J.J., Isidoro, S.R., Piccoli, R. H. (2018). Homologous and Heterologous Adaptation of *Listeria* spp. to Essential Oils of Condiment Plants. *Advances in Microbiology*, 8(08), 639.
- Serapio-Palacios, A., & Finlay, B. B. (2020). Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Current Opinion in Microbiology*, 54, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.12.001>
- Shen, S., Zhang, T., Yuan, Y., Lin, S., Xu, J., & Ye, H. (2015). Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. *Food Control*, 47, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.003>
- Shetty, V.A., Kumar, S.H., Shetty, A.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2012). Prevalence and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adults and children in Mangalore, India. *J Lab Physicians.* 4(1):24-9.
- Shrivastava, A. K., Singh, S., Singh, P. K., Pandey, S., & Rai, L. C. (2015). A novel alkyl hydroperoxidase (AhpD) of *Anabaena* PCC7120 confers abiotic stress tolerance in *Escherichia coli*. *Functional and Integrative Genomics*, 15(1), 77–92. <https://doi.org/10.1007/s10142-014-0407-y>
- Silva, J.C., Gorenstein, M.V., Li, G.Z., Vissers, J.P., Geromanos, S.J. (2005). Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics.* v.5, p.144-156.
- Silva, Z. N. de et al. (2001). Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 375-379.

- Soon, J.M., Brazier, A.K.M., Wallace, C. A. (2020). Determining common contributory factors in food safety incidents – A review of global outbreaks and recalls 2008–2018. *Trends in Food Science and Technology*, v. 97, p. 76-87.
- Spano, L.C., Sadovsky, A.D., Segui, P.N., Saick K.W., Kitaga, S.M., Pereira, F.E, et al. (2008). Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea. *J Med Microbiol.* 57(Pt 3):359-63.
- Sulaiman, J. E., Lam, H. (2020). Proteomic Study of the Survival and Resuscitation Mechanisms of Filamentous Persisters in an Evolved *Escherichia coli* Population from Cyclic Ampicillin Treatment. *mSystems*, v. 5, n. 4, p. 1–21.
- USFDA, 2015. U.S. Food and Drug Administration (USFDA). *Title 21 – Food and Drugs. Part 182 – Substances Generally Recognized as Safe. Essential Oils, Oleoresins (Solvent-free), and Natural Extractives (Including Distillates); Final Rule, Federal Register.* (2015). Published 1 April 2015. Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.20>, Accessed 22nd Mar 2020.
- Vilchez, S., Reyes, D., Paniagua, M., Bucardo, F., Möllby, R., Weintraub, A. (2009). Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. *J Med Microbiol.* 58(5):630-7.
- Vinogradov, A. D., & Grivennikova, V. G. (2016). Oxidation of NADH and ROS production by respiratory complex i. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(7), 863–871. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.004>
- Wada, A., & Sako, T. (1987). Primary structures of and genes for new ribosomal proteins a and b in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry*, 101(3), 817–820. <https://doi.org/10.1093/jb/101.3.817>
- Wagner, A. F. V., Frey, M., Neugebauer, F. A., Schafer, W., & Knappe, J. (1992). The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(3), 996–1000. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.3.996>
- Wendakoon, C. N., & Morihiko, S. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of enterobacter aerogenes by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58(3), 280–283. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.3.280>
- WHO. *WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases.* 2015. Disponível em: [https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/ferg\\_infographics/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/) en/. Acesso em: 01 de jul. 2021.
- Yamaguchi, Y., Nariya, H., Park, J. H., & Inouye, M. (2012). Inhibition of specific gene expressions by protein-mediated mRNA interference. *Nature Communications*, 3, 606–607. <https://doi.org/10.1038/ncomms1621>

Yuan, W., Seng, Z. J., Kohli, G. S., Yang, L., & Yuk, H. G. (2018). Stress resistance development and genome-wide transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 adapted to sublethal thymol, carvacrol, and trans-cinnamaldehyde. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(22), 1–44. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-18>