



MICHELLE CARLOTA GONÇALVES

**ADAPTAÇÃO E ADAPTAÇÃO CRUZADA DE *Escherichia coli*
ENTEROTOXIGÊNICA E ENTEROPATOGÊNICA A
COMPONENTES MAJORITÁRIOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS
E AO ESTRESSE ÁCIDO**

**LAVRAS - MG
2017**

MICHELLE CARLOTA GONÇALVES

**ADAPTAÇÃO E ADAPTAÇÃO CRUZADA DE *Escherichia coli*
ENTEROTOXIGÊNICA E ENTEROPATOGÊNICA A COMPONENTES
MAJORITÁRIOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E AO ESTRESSE ÁCIDO**

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

Orientadora
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG
2017**

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

Gonçalves, Michelle Carlota.

Adaptação e adaptação cruzada de *Escherichia coli*
enterotoxigênica e enteropatogênica a componentes majoritários
de óleos essenciais e ao estresse ácido / Michelle Carlota
Gonçalves. - 2017.

61 p.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal
de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. *E coli*. 2. Adaptação cruzada. 3. Antimicrobiano natural.
I. Piccoli, Roberta. . II. Título.

MICHELLE CARLOTA GONÇALVES

**ADAPTAÇÃO E ADAPTAÇÃO CRUZADA DE *Escherichia coli*
ENTEROTOXIGÊNICA E ENTEROPATOGÊNICA A COMPONENTES
MAJORITÁRIOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E AO ESTRESSE ÁCIDO**

**ADAPTATION AND CROSS-ADAPTATION OF ENTEROTOXIGENIC AND
ENTEROPATHOGENIC ESCHERICHIA COLI TO MAJOR COMPOUNDS OF
ESSENTIAL OILS AND TO ACID STRESS**

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

APROVADA em 24 de fevereiro de 2017.

Dr. Nélio Ranieli Ferreira de Paula IFRO

Dra. Angélica Cristina de Souza UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS – MG
2017**

*A Deus, o essencial em minha vida.
Aos meus pais, Edmar e Maria Aparecida;
meus irmãos, Caroline e Guilherme,
e ao meu namorado, Ewerton,
com gratidão pelo amor e incentivo a mim concedidos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força, pelas graças recebidas, as dificuldades superadas, por me fazer acreditar que sou capaz e por mais esta vitória em minha vida.

À minha orientadora, professora Roberta, pela orientação, paciência, pelos conhecimentos transmitidos, por me receber de braços abertos em seu grupo, pela amizade e, principalmente, por ser esta pessoa iluminada que Deus colocou no meu caminho. A você, minha eterna gratidão!

Aos meus pais, Maria Aparecida e Edmar, pelo amor, apoio, orações, por me incentivarem a ir em busca dos meus sonhos, por acreditarem em mim e por serem meu porto seguro.

Aos meus irmãos, Caroline e Guilherme, pelo amor e apoio.

Ao meu namorado, Ewerton, pelo companheirismo, amor, paciência, compreensão e por estar comigo em todos os momentos, compartilhando alegrias e tristezas.

Aos meus amigos irmãos, Lucas, Rafaela, Carol, Camila e Mateus, por estarem sempre presentes em minha vida, pelos momentos de alegria e de tristeza compartilhados, pela força e a amizade incondicional.

Aos príncipes Olavo e Pedro Lucas, que vieram para tornar nossos dias mais felizes.
Aos membros da banca, pela valiosa colaboração com este trabalho.

Às amizades conquistadas no mestrado que, com certeza, levarei por toda a minha vida.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA (UFLA), pelo agradável convívio durante esses anos e a todos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela convivência e conhecimentos compartilhados.

A Tenille, Heloísa, Jorge e Mariana, pela ajuda na condução dos experimentos.

A Tenille, pela valiosa amizade e pelo auxílio prestado até o último momento.

Aos meus estagiários, Mônica, Maica, Sabrina, Anderson e Bárbara, pela amizade e auxílio nos experimentos.

A minha amiga e companheira de república, Rafaela, pela amizade, companheirismo, caronas e apoio sempre que necessário.

A todos meus familiares e amigos, pelo carinho, incentivo e orações.

A Eliane, pela amizade, orações e disponibilidade.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Aos professores do PPGMA, pelos ensinamentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho,

o meu muito obrigada!

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível. (Charles Chaplin)

RESUMO

Escherichia coli enteropatogênica e a enterotoxigênica são bactérias patogênicas que podem causar desde simples diarreia até a morte em crianças e indivíduos imunocomprometidos. Por serem veiculadas por alimentos, principalmente os de origem animal, seu controle nos alimentos é de grande importância. A inibição ou a morte dessas bactérias podem ser causadas pela adição de conservantes ao alimento. Entretanto, essas substâncias, muitas vezes, podem causar impactos negativos na saúde do consumidor. Assim, substâncias naturais têm sido sugeridas como alternativa aos conservantes químicos. Os componentes majoritários de óleos essenciais apresentam elevada atividade antimicrobiana e de amplo espectro contra patógenos alimentares. Entretanto, quando utilizados em concentrações subletais, podem induzir a respostas fisiológicas bacterianas, levando à diminuição de sua suscetibilidade ao componente ou a outros agentes estressantes. Diante do exposto, verificar a capacidade de adaptação e/ou a adaptação cruzada de EPEC e ETEC a componentes majoritários de óleos essenciais torna-se necessário. Foram determinados, inicialmente, o pH mínimo inibitório e mínimo de crescimento e as concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral sobre EPEC e ETEC. Em seguida, a capacidade adaptativa de EPEC e ETEC aos componentes majoritários e ao estresse ácido, bem como sua adaptação cruzada entre os componentes majoritários e estresse ácido, foi avaliada. Tanto para a avaliação de adaptação quanto adaptação cruzada foram realizados cultivos de EPEC e ETEC em presença de componentes majoritários e pH mínimo de crescimento, a 37 °C, por 6 horas. Após essa etapa, as células bacterianas foram recuperadas por centrifugação e ressuspensas em caldo BHI, após padronização da suspensão em 10⁸ UFC/mL. Para a adaptação de EPEC e ETEC a cinamaldeído, eugenol e citral, foi realizado o cultivo das células em caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e de 1/4, 1/8 ou 1/16 das CMB de cinamaldeído, eugenol ou citral. Alíquotas da suspensão padronizada foram inoculadas em caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e os componentes majoritários nas concentrações de 0,5CMB; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2CMB e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, foi realizado o plaqueamento em TSA e incubação, a 37 °C, por 24 horas. Para avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e componentes majoritários, alíquotas das suspensões padronizadas de EPEC e ETEC foram inoculadas em caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e compostos majoritários em concentrações variando de 0,5xCMB a 2xCMB. Após incubação a 37 °C, por 24 horas, alíquotas das culturas foram plaqueadas em TSA e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Para a avaliação da adaptação cruzada entre componentes majoritários e pH, as bactérias, previamente cultivadas em concentrações subletais dos componentes majoritários, foram, após recuperação e padronização da suspensão em 10⁸ UFC/mL, inoculadas em caldo BHI com pH ajustado com ácido láctico em pH 6,0; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5 e 2,0. Após incubação a 37 °C, por 24 horas, alíquotas de 10 µl das culturas foram plaqueadas em TSA e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. O pH mínimo inibitório e o mínimo de crescimento foram de 4,0 e 4,5, respectivamente, para ambas as cepas utilizadas. As CMB para cinamaldeído, eugenol e citral foram de 0,125%, 1,0% e 1,0%, respectivamente, tanto para EPEC quanto para ETEC. Os resultados obtidos demonstraram que a pré-exposição de EPEC e ETEC às concentrações subletais dos componentes majoritários e ao pH mínimo de crescimento promoveu a adaptação e a adaptação cruzada das bactérias. Portanto, cinamaldeído, eugenol e citral são opções promissoras de antimicrobianos e sanitizantes a serem utilizados na indústria de alimentos, desde que em concentrações adequadas.

Palavras-chave: *E.coli*. Adaptação cruzada. Antimicrobiano natural.

ABSTRACT

Pathogenic bacteria such as *Escherichia coli* Enteropathogenic and Enterotoxigenic may cause diarrhea or even death in children and immunoincompetent patients. As a foodborne disease, mostly from animal resources, the microbiological control is from great relevance. Food preservatives usually control these bacteria by inhibition or death. Although, these additives may cause negative impacts on public health. Natural compounds shows up as alternative to common chemical substances. Major compound of essential oils has known and broad-spectrum antimicrobial activity against foodborne pathogens. However, when used in sublethal doses it may induce physiological response in bacteria, which reduce susceptibility to these compounds or even other stressor agents. By these reasons, it becomes necessary to verify EPEC and ETEC adaptive and/or cross-adaptive capacity to major compounds of essential oils. Initially, pH of minimum inhibition and growth were determined and minimum bactericidal concentration (MBC) of cinnamaldehyde, eugenol and citral against EPEC and ETEC. Adaptive capacity of EPEC and ETEC exposed to major compounds and acid stress were tested and cross-adaptation between major compound and acid stress were evaluated as well. EPEC and ETEC cells were grown in major compound or pH of minimum growth exposition during 6 hours at 37°C on adaptation and cross-adaptation tests. After this, 10⁸ CFU/mL standard suspensions of EPEC and ETEC were centrifuged and resuspended in Brain-heart infusion broth (BHI). In adaptation tests, sublethal doses of 1/4, 1/8 and 1/16 MBC of cinnamaldehyde, eugenol or citral and 0.5% of Tween 80 were added on BHI for previous exposition. EPEC and ETEC standard suspension cells were incubated at 37°C for 24 hours under 0.5; 1.0; 1.2; 1.4; 1.6; 1.8 and 2.0 MBC of major compounds. After this period, cells were plated on Tryptic soy agar (TSA) and incubated at 37°C for 24h to evaluate adaptive response. In cross-adaptation tests between acid stress and major compounds, EPEC and ETEC standard cells were grown in BHI with addition of 0.5% Tween 80 and major compounds at 0.5 to 2.0 MBC concentrations for 24h at 37°C. Then, cells were plated on TSA and incubated at 37°C for 24h. ETEC and EPEC previously exposed to major compound and pH were grown in BHI with pH of: 6.0; 5.0; 4.5; 4.0; 3.5; 3.0; 2.5; 2.0 using lactic acid as adjustment, followed by TSA plating and incubation. The pH of minimum inhibition and growth were 4.0 and 4.5, respectively for EPEC and ETEC. Cinnamaldehyde, eugenol and citral MBC were 0.125, 1.0 and 1.0%, respectively, for both pathotypes. Adaptation and cross-adaptation tests demonstrated that EPEC and ETEC pre-exposition to sublethal doses of major compound and pH of minimum growth promoted bacterial resistance. Therefore, cinnamaldehyde, eugenol and citral are potential option to be used as industrial antimicrobial sanitizers while in appropriate concentrations.

Keywords: *E. coli*. Cross-adaptation. Natural antimicrobials.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	<i>Escherichia coli</i>	14
2.2	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica, enterotoxinas e fatores de colonização.....	15
2.3	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica e fatores de colonização.....	17
2.4	Óleos essenciais e componentes majoritários.....	19
2.5	Ação dos óleos essenciais e de seus componentes sobre os microrganismos.....	21
2.6	Componentes majoritários.....	23
2.6.1	Cinamaldeído: componente majoritário do óleo essencial de <i>Cinnamomum cassia</i>	23
2.6.2	Eugenol: componente majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia.....	24
2.6.3	Citral: componente majoritário do óleo essencial de capim limão.....	25
2.7	Adaptação e adaptação cruzada de bactérias a condições subletais.....	26
2.8	Tolerância ao estresse ácido.....	27
2.9	Mecanismos de adaptação de microrganismos submetidos a condições estressantes.....	28
	REFERÊNCIAS	30
	CAPÍTULO 2 Adaptação e adaptação cruzada de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica e enteropatogênica a componentes majoritários de óleos essenciais e ao estresse ácido.....	39
1	INTRODUÇÃO	39
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1	Local de condução do experimento.....	41
2.2	Componentes majoritários.....	41
2.3	Microrganismos, padronização e manutenção dos inóculos.....	41
2.4	Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório de EPEC e ETEC.....	41
2.5	Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral sobre EPEC e ETEC.....	42
2.6	Adaptação de EPEC e ETEC aos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral e ao pH ácido.....	42
2.6.1	Adaptação de EPEC e ETEC aos componentes majoritários.....	42
2.6.2	Adaptação de EPEC e ETEC ao pH ácido.....	43
2.7	Avaliação da adaptação de EPEC e ETEC aos componentes majoritários e resposta à tolerância ácida.....	43
2.7.1	Componentes majoritários.....	43
2.7.2	Resposta de tolerância ácida.....	44
2.8	Adaptação cruzada.....	44
2.8.1	Avaliação da adaptação cruzada entre os componentes majoritários.....	44
2.8.2	Avaliação da adaptação cruzada entre componentes majoritários e estresse ácido.....	45
2.8.3	Avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e componentes majoritários.....	45
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1	Determinação do pH mínimo inibitório e mínimo de crescimento de EPEC e ETEC.....	46

3.2	Concentrações mínimas bactericidas dos componentes majoritários.....	46
3.3	Adaptação de EPEC e ETEC aos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral	48
3.4	Resposta à tolerância ácida	51
3.5	Avaliação da adaptação cruzada entre os componentes majoritários	52
3.6	Avaliação da adaptação cruzada entre componentes majoritários e estresse ácido e avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e componentes majoritários	55
4	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

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* enterro-hemorrágica (EHEC), *E.coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E.coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). Dentre elas, a EPEC e a ETEC destacam-se por causarem elevado número de surtos de diarreia veiculados por alimentos.

Dados mundiais publicados por Pires et al. (2015) pela International Association for Food Protection apontam que, em 2010, ocorreram, aproximadamente, 1,8 bilhão de casos de doenças diarreicas transmitidas por agentes patogênicos de alimentos e, destes, em torno de 599.000 levaram à morte. Dentre os casos de morte, 121.455 foram causados por EPEC e 73.041 por ETEC. Além disso, cerca de 40% das doenças diarreicas e 43% das mortes associadas a doenças diarreicas ocorreram em crianças menores de cinco anos de idade.

A segurança alimentar relacionada à saúde pública tem sido considerada problema crítico de saúde e esta área tem recebido atenção crescente, nos últimos anos. Infecção alimentar causada por *E.coli*, em especial por EPEC e ETEC, é um problema emergente em indústrias produtoras de alimentos de origem animal, devido ao desenvolvimento progressivo da adaptação microbiana aos sanitizantes e conservantes utilizados. Com isso, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de desenvolver novos métodos de controle que não permitam a adaptação microbiana.

A adição de conservantes aos alimentos pode inibir o crescimento de EPEC e ETEC, porém, deve-se considerar a crescente preocupação dos consumidores em relação à saúde e à segurança alimentar. Alguns agentes antibacterianos de origem natural, tais como os óleos essenciais e seus componentes majoritários, apresentam a atividade antimicrobiana desejada.

Óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são produtos oriundos do metabolismo secundário de plantas, sendo constituídos quimicamente por terpenoides e fenilpropanoides. Estes óleos são misturas naturais complexas constituídas por 20 a 60 componentes presentes em diferentes concentrações e apresentam alguns

componentes principais, denominados majoritários, que determinam suas propriedades biológicas.

Os componentes majoritários são, de modo geral, considerados seguros e com baixa probabilidade de levar ao aparecimento de cepas bacterianas resistentes, devido à sua complexidade química e múltiplas formas de ação sobre os microrganismos, alterando a morfologia celular, interferindo na dupla camada fosfolipídica da parede celular da bactéria, levando ao aumento da permeabilidade e à perda dos constituintes celulares, e alterando uma variedade de sistemas enzimáticos, como os envolvidos na produção de energia celular e na síntese de componentes estruturais.

Entretanto, a utilização de concentrações inadequadas 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. A adaptação cruzada de bactérias é alvo de inúmeros estudos por conferir aos microrganismos resistência a um fator de estresse diferente daquele submetido anteriormente, tornando-se outro fator preocupante, no que diz respeito ao combate desses microrganismos.

Assim, definir as concentrações corretas de uso dos componentes majoritários utilizados como antibacterianos, a fim de que não induzam a tolerância, tanto ao respectivo componente quanto cruzada a outros componentes e pH, se torna importante.

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a capacidade de *E.coli* enteropatogênica (EPEC) e *E.coli* enterotoxigênica (ETEC) se adaptarem aos componentes majoritários de óleos essenciais, cinamaldeído, eugenol e citral, e desenvolver adaptação cruzada a outros componentes majoritários e ao estresse ácido, quando expostos a concentrações subletais dos componentes majoritários e ao estresse ácido.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli apresenta-se na forma de bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, com dimensão de 1,1 a 1,5 x 2,0 a 6 µm. Tem motilidade, com flagelos peritríquios e capacidade de fermentar a glicose com formação de ácido e gás (HOLT, 1994). Desenvolve-se na faixa de pH entre 4,4 e 9,0 (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICSMF, 2000), sendo conhecida pela capacidade de tolerar ambientes ácidos, o que permite sua sobrevivência no trato intestinal (SAINZ et al., 2005). Em condições ótimas de crescimento, pode se multiplicar em atividade de água (A_w) acima de 0,95. Apresenta temperatura ótima de crescimento de 37 °C, porém, é capaz de se desenvolver entre 7 a 48 °C (VARNAM; EVANS, 1991).

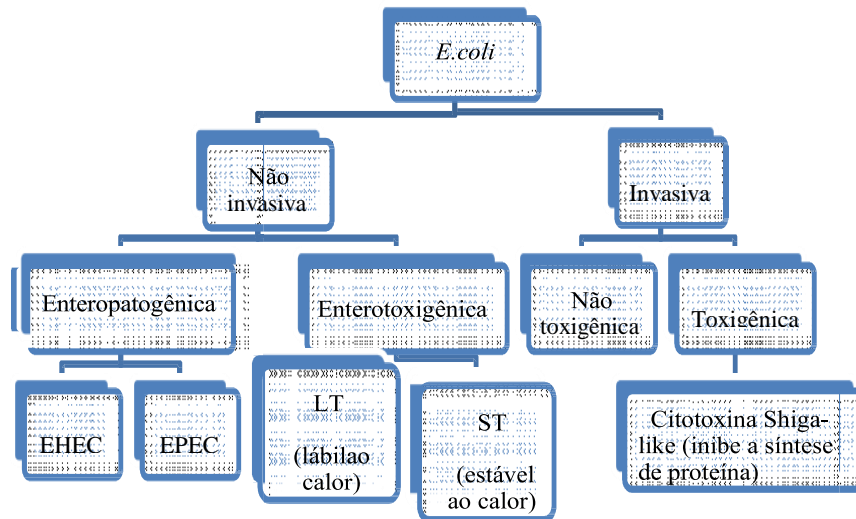
Escherichia coli é habitante comensal do trato entérico de humanos e animais sadios e acredita-se que desempenha papel benéfico ao hospedeiro, sendo capaz de sintetizar vitaminas, impedir o estabelecimento bem como favorecer a eliminação de linhagens patogênicas de *E. coli* (LÓPEZ-BANDA et al., 2013; QADRI et al., 2005; RYU et al., 2012; TANGI et al., 2015). A presença de cepas não patogênicas em alimentos indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, sendo considerado o indicador de possível presença de microrganismos patogênicos. Contagens elevadas de *E. coli* também podem estar relacionadas à falta de higiene e à falha no processamento de alimentos (YUCEL; ULUSOY, 2006).

Existem seis patótipos de *E. coli* capazes de causar infecções intestinais. Os patótipos de *E. coli* diarreio gênica são importantes patógenos de origem alimentar e diferem de *E. coli* comensal por apresentarem elementos genéticos de fatores de virulência (CERNA-CORTES et al., 2013), incluindo *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). Cada patótipo causa a doença diarreica por mecanismos distintos e pode induzir diferentes sintomas no hospedeiro (TURNER et al., 2006).

ETEC produz enterotoxinas, EIEC tem fatores de invasão e destruição de tecidos, causando inflamação semelhante à provocada pela *Shigella*. Já outro grupo de *E. coli*, chamado *E. coli* enteropatogênica (EPEC), está associado a surtos de diarreia em berçários de

recém-nascidos, mas não produz toxinas ou fatores de invasão (Figura 1) (EVANS JUNIOR; EVANS, 1996).

Figura 1- Patotipos de *Escherichia coli*.



Fonte: Adaptado de Evans Junior e Evans (1996). Legenda: EHEC: *E. coli* Enterohemorrágica; EPEC: *E. coli* Enteropatogênica.

2.2 *Escherichia coli* enterotoxigênica, enterotoxinas e fatores de colonização

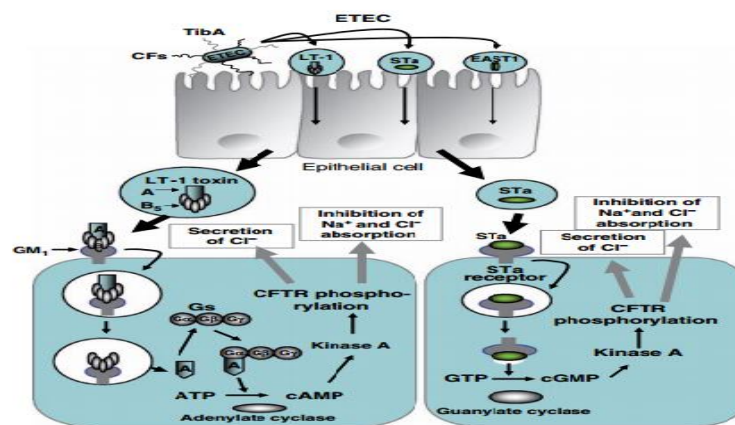
Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) é responsável por cerca de 200 milhões de casos de diarreia e 380 mil mortes por ano, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade (STEFFEN et al., 2005; WENNERAS; ERLING, 2004). Provoca infecções caracterizadas por diarreia aquosa, vômitos, dores de estômago, náuseas e, em alguns casos, febre moderada, sendo estas infecções autolimitadas em indivíduos saudáveis, podendo levar a graves consequências em pessoas imunocomprometidas (EVANS JUNIOR; EVANS, 1996). O distúrbio transmitido pela ETEC é conhecido como “diarreia dos viajantes”, por acometer pessoas que visitam áreas endêmicas (KOTLOFF et al., 2013; NORTHEY et al., 2007).

Os fatores de colonização, proteínas fibrilares ou fimbriais, são capazes de reconhecer receptores específicos na superfície das células epiteliais ou eritrócitos, permitindo a colonização da mucosa do intestino delgado pela bactéria. Mais de 22 fatores de colonização (CF) são conhecidos em *E. coli* enterotoxigênica humana, alguns dos quais estão bem caracterizados (ANANTHA et al., 2004; FLECKENSTEIN et al., 2006; PICHEL; BINSZTEIN; VIBOUD, 2000).

Enterotoxinas são produzidas nos órgãos intestinais, causando, principalmente, dores abdominais, diarreias e vômitos, sendo consideradas uma das causas de toxinfecção alimentar. Duas enterotoxinas são produzidas por ETEC, a toxina termolábil (LT) e a toxina termoestável (ST), podendo ser expressa uma ou ambas as toxinas pela mesma estirpe (QADRI et al., 2005; WOLF, 1997). Seus fatores de colonização permitem a colonização do intestino delgado, causando secreção líquida no lúmen intestinal (NATARO; KAPER, 1998; QADRI et al., 2005; WOLF, 1997).

Ao ser lançada no intestino delgado, a toxina LT se liga reversivelmente a guanilato ciclase, resultando no aumento dos níveis de GMP cíclico (GMPc). Tal como acontece com LT, a secreção de cloreto pelas células das criptas é, então, aumentada e a inibição da absorção de cloreto de sódio neutro ocorre, levando à diarreia (Figura 2) (BHUNIA, 2008; RAO, 1985; SEARS; KAPER, 1996). Deve-se ressaltar que proporções relativas de LT, ST e LT / ST por ETEC produtora de toxina variam de uma área geográfica para outra (WOLF, 1997).

Figura 2 - Mecanismo de ação de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC).



Fonte: Bhunia (2008).

A toxina LT é um peptídeo de baixo peso molecular, consistindo de 18 a 19 aminoácidos compostos por duas subunidades, A e B, que são codificadas por genes encontrados em plasmídeos de alto peso molecular, os quais são transmissíveis por conjugação e, frequentemente, apresentam genes adicionais para o fenótipo de resistência a antimicrobianos e a produção de antígenos de colonização (WOLF, 1997). As subunidades A e B da enterotoxina LT são codificadas pelos genes *etxA* e *etxB*, sobrepostos em quatro nucleotídeos e organizados em um operon, que tem sequência promotora consenso para

ligação da RNA polimerase localizada a montante do gene *etxA* (SJOLING et al., 2007). A toxina termoestável (ST) está presente em 75% das estirpes de ETEC, quer isoladamente ou junto com a toxina termolábil (LT) (WOLF, 1997).

Estudos apontam relatos de surtos veiculados de alimentos contaminados com ETEC. Segundo MacDonald et al. (2015), em 2012 ocorreu o primeiro surto na Noruega, o qual foi confirmado em 40 hóspedes de um hotel, após ingerirem ovos mexidos com cebolinha. As cebolas adicionadas aos ovos mexidos foram a fonte suspeita do surto porque foram importadas de um país endêmico de ETEC. Este surto reforça que a ETEC deve ser considerada em países não endêmicos, quando o quadro clínico é consistente e patógenos gastrintestinais comuns não são encontrados. Cho et al. (2014) relataram o primeiro surto veiculado por ETEC na República da Coreia, também em 2012. O surto ocorreu em escolas, após os alunos consumirem *kimchi* (comida típica coreana), tendo ETEC sido isolada de 230 estudantes.

2.3 *Escherichia coli* enteropatogênica e fatores de colonização

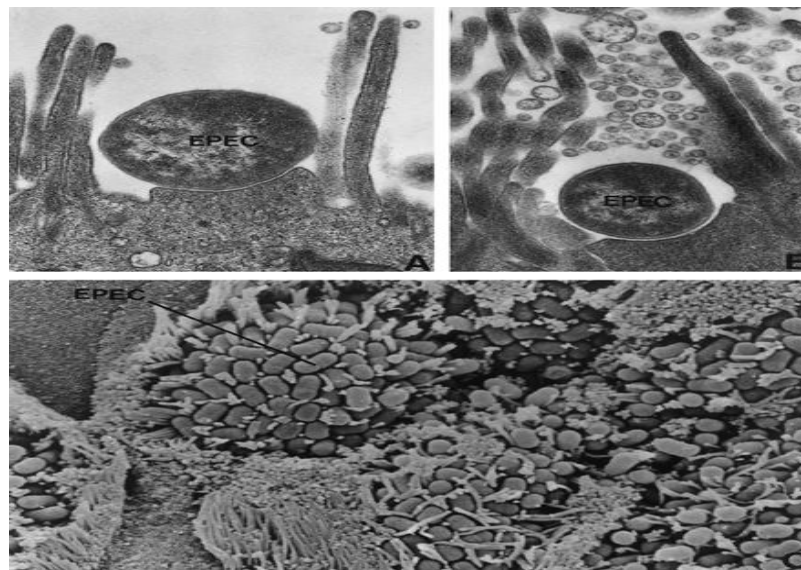
A contaminação dos alimentos por patógenos entéricos tornou-se importante causa de doenças diarreicas nos países em desenvolvimento, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças, além de perdas econômicas significativas. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é uma das causas mais comuns de diarreia infantil nesses países, sendo responsável por surtos esporádicos (ALIZADE; GHANBARPOUR; AFLATOONIAN, 2014). Infecções provocadas por EPEC têm sido referidas como sendo a segunda causa mais comum de morte entre as crianças menores de cinco anos e são responsáveis por cerca de uma em cada cinco mortes de crianças em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2009).

Inicialmente, todas as cepas de *E. coli* que induzem a diarreia foram nomeadas como *E. coli* enteropatogênica, porém, em estudos posteriores as EPEC foram classificadas em diferentes grupos, de acordo com seus mecanismos de infecção e fatores de virulência produzidos (CHEN; FRANKEL, 2004; NATARO; KAPER, 1998).

A colonização de EPEC acontece no intestino delgado, no qual a bactéria se fixa firmemente às células epiteliais, causando lesões típicas chamadas aderência e eliminação (*attaching and effacing A/E*) (KAPER; NATARO; MOBBLEY, 2004). Esta lesão, ilustrada na Figura 3, 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 3 - Eletromicrografias de varredura e transmissão ilustrando as características chave da lesão histopatológica de aderência e eliminação causada pela *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). (A) Formação de estrutura semelhante a um pedestal. (B) Destruição localizada das microvilosidades. (C) Adesão bacteriana, com perturbação grosseira da arquitetura das microvilosidades.



Fonte: Frankel et al. (1998).

As estirpes de EPEC são divididas em dois grupos: EPEC típicas, que têm o gene *bpfa* (formador de pili) e o gene *eae* (produtor de intimina) e atípicas, que apresentam apenas o gene *eae*, produtor de intimina (OCHOA; CONTRERAS, 2011). De acordo com Nataro e Kaper (1998), em países industrializados, cepas atípicas de EPEC são mais frequentemente isoladas de casos de diarreia. A adesão bacteriana da célula ao hospedeiro é mediada pela proteína intimina e a aderência localizada pela formação de tufo de pili, sendo esta adesão, caracterizada pela habilidade da bactéria em formar microcolônias na superfície das células epiteliais intestinais pela autoaglutinação das células (JAY, 2005; OCHOA; CONTRERAS, 2011).

EPEC é comumente isolada de vários alimentos, dentre eles leite cru (ALTALHI; HASSAN, 2009), produtos lácteos (ARAÚJO et al., 2002), alface (MARTINS et al., 2010) e produtos à base de carne de frango (ALONSO et al., 2012). Altalhi e Hassan (2009) verificaram, entre 33 cepas de *E. coli* isoladas de amostras de leite cru, que 9,1% continham o gene *eaeA*, relacionado à EPEC. Silva et al. (2001) isolaram 208 cepas de *E. coli* de amostras

de leite pasteurizado, entre as quais 46 (22,1%) foram sorogrupadas como EPEC. O sorogrupo mais frequente foi o O55 (15,2%), contudo, diversos outros sorogrupos foram encontrados, como O26, O126, O127, O111 e O114. Araújo et al. (2002), analisando 45 amostras de queijo, isolaram EPEC de 21,1% e verificaram que os sorogrupos mais frequentes foram O127, seguidos por O55 e O26.

2.4 Óleos essenciais e componentes majoritários

As plantas produzem grande variedade de metabólitos secundários, sendo estes responsáveis pela síntese de substâncias cuja produção e acumulação estão limitadas a vegetais, microrganismos e alguns poucos animais. Esses compostos, não necessariamente essenciais ao organismo produtor, têm papel importante na sobrevivência da planta em seu ecossistema, estando envolvidos na resistência contra pragas e doenças, na atração de polinizadores e na interação com microrganismos simbióticos (SANTOS, 2004; VERPOORTE; VANDER HEIJDEN; MEMELINK, 2000). Dentre os metabólitos secundários, os óleos essenciais são de grande interesse para o controle de microrganismos patogênicos em indústria de alimentos.

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).

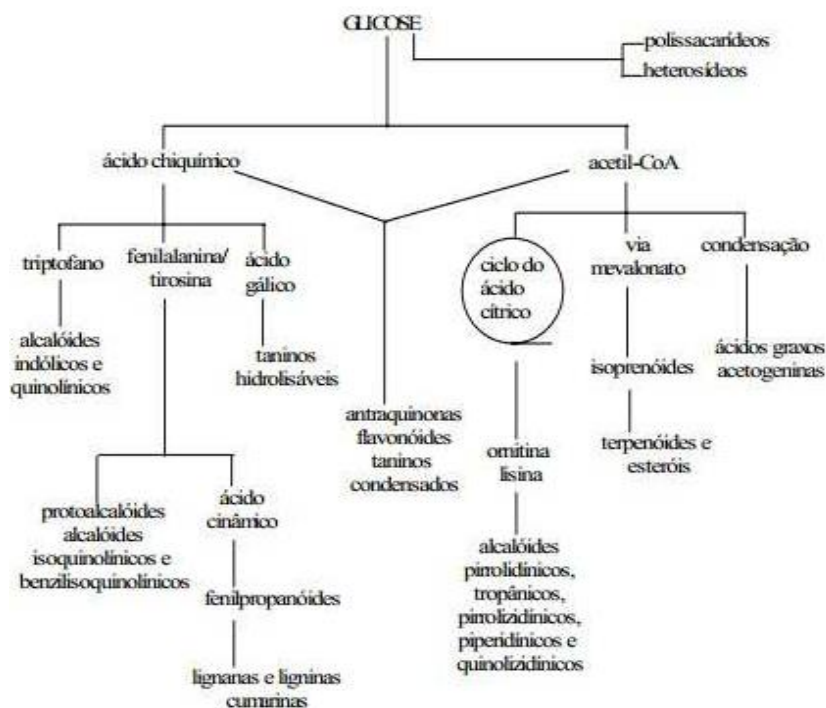
Óleos essenciais são compostos voláteis, naturais, complexos, sintetizados no metabolismo secundário, caracterizados por forte odor e solubilidade em lipídio e em solventes orgânicos. Podem ser encontrados em todas as partes da planta, como botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutas, raízes ou casca, e são armazenados em células secretórias, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BOZIN et al., 2006; BURT, 2004), apresentando composição variável, segundo sua localização, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2006).

Cerca de 3.000 óleos essenciais são sintetizados utilizando pelo menos 2.000 espécies de plantas, dos quais 300 são importantes, do ponto de vista comercial (DJILANI; DICKO, 2012). 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 presentes na célula bacteriana (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 4) (DEWICK, 2009; SANTOS, 2004).

Figura 4 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários em plantas.



Fonte: Simões e Spitzer (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; VERPOORTE; VANDER HEIJDEN; MEMELINK, 2000).

2.4 Ação dos óleos essenciais e de seus componentes sobre os microrganismos

O mecanismo de ação de óleos essenciais e de seus componentes majoritários depende de sua composição química, e a atividade antimicrobiana não é atribuída a somente um mecanismo e, sim, a uma cascata de reações envolvendo toda a célula bacteriana (AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR; DEL-TOROSÁNCHEZ, 2009; BURT, 2004; CALO et al., 2015).

Óleos essenciais são compostos tipicamente lipofílicos e, por isso, são capazes de passar pela parede celular e se acumular na membrana citoplasmática bacteriana, causando aumento de sua permeabilidade por danificar a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos (BAKKALI et al., 2008).

De acordo com Hammer e Carson (2011), a difusão passiva da molécula do óleo essencial, por meio da parede celular de bactérias gram-positivas e fungos ou membrana

externa de bactérias gram-negativas, é a interação inicial entre os componentes dos óleos essenciais e a célula microbiana. La Storia et al. (2011) demonstraram também que pode ocorrer interação de constituintes dos óleos essenciais com a membrana externa de bactérias gram-negativas.

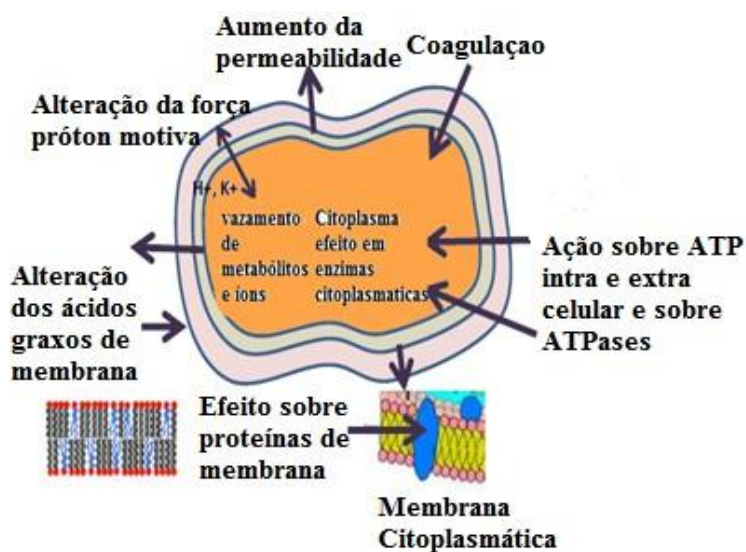
O aumento da fluidez da membrana parece estar entre os primeiros efeitos antimicrobianos causados pelo tratamento dos microrganismos com óleos essenciais. A membrana citoplasmática representa barreira eficaz entre o citoplasma e o ambiente externo. A importação e a exportação dos metabólitos e íons essenciais para todas as atividades que acontecem na célula microbiana ocorrem através da membrana citoplasmática. Turina et al. (2006) enfatizam que o efeito de íons específicos sobre a membrana plasmática tem forte efeito sobre a força próton motriz e atividade global de células microbianas, como transporte de solutos e processo de regulação do metabolismo.

A expansão e o aumento da fluidez da membrana citoplasmática podem levar à quebra da integridade com conseqüente perda de pequenos componentes intracelulares, como hidrogênio, potássio e sódio. A perda destes íons está associada ao decréscimo do potencial de membrana, pH intracelular e *pool* de ATP, causado pelo dano ao gradiente de íons que ocorre entre o interior e o exterior da célula. Concentrações elevadas de óleos essenciais ou longos tempos de exposição podem acarretar danos maiores à membrana citoplasmática, ocasionando perda de macromoléculas, como DNA e proteínas, extritamente relacionada à morte celular (HAMMER; CARSON, 2011).

Além disso, a destruição da parede celular e da membrana citoplasmática, a danificação de proteínas de membrana, a liberação de conteúdo celular, a coagulação do citoplasma, a depleção da força próton motiva, a inativação de enzimas essenciais e a perturbação da funcionalidade do material genético são, também, mecanismos de ação dos óleos essenciais (AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR; DEL-TORO-SÁNCHEZ, 2009; BURT, 2004).

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, 2011; OUSSALAH et al., 2006; PAGNOSSA, 2016; SOUZA et al., 2016; TRAJANO et al., 2009). Dessa forma, estudos vêm sendo realizados sobre o emprego de óleos essenciais no controle de microrganismos em alimentos (CARSON; HAMMER, 2001; DIAS, 2015; MARTINS, 2016; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2013; SIMÕES, 2016; VALERIANO et al., 2012). Os mecanismos de ação de óleos essenciais e de seus componentes são ilustrados na Figura 5.

Figura 5 - Mecanismos de ação dos óleos essenciais sobre células microbianas.



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

Relatos de pesquisas indicam que bactérias gram-positivas são mais vulneráveis aos óleos essenciais e seus componentes que bactérias gram-negativas, isto porque essa menor atuação contra gram-negativas é devido à estrutura de sua parede celular, principalmente pela presença de lipoproteínas e lipopolissacarídeos, que atuam como barreira aos compostos hidrofóbicos (BACHIR; BENALI, 2012; BURT, 2004). No entanto, isso não significa que as bactérias gram-positivas sejam sempre mais suscetíveis (BURT, 2004).

2.6 Componentes majoritários

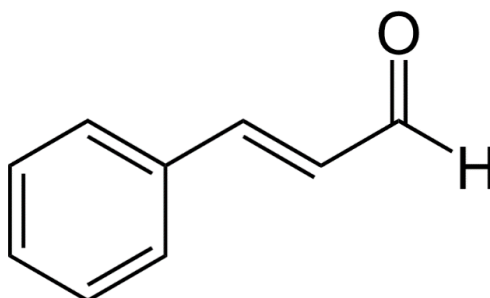
2.6.1 Cinamaldeído: componente majoritário do óleo essencial de *Cinnamomum cassia*

Cinnamomum cassia, também chamada de falsa-canela, é nativa da China, Indonésia, Laos e Vietnã (BISSET; WICHTL, 2001). É comumente utilizada na medicina chinesa para tratamento de dispepsia, gastrite, distúrbios da circulação e doenças inflamatórias. *C. cassia* é uma das especiarias mais antigas do mundo e vem sendo utilizada em indústrias de alimentos, bebidas e cosméticos. A parte da planta utilizada é a casca, da qual é extraído o óleo essencial, que pode ser encontrado em tubos, pequenos pedaços ou em pó (KWON; YU; PARK, 2003).

O cinamaldeído (Figura 6), um fenilpropanoide, é o componente majoritário do óleo essencial da casca de *Cinnamomum cassia*, com teor variando de 62% a 90% (ZHANG et al., 2016). Souza et al. (2016) relatam que o óleo essencial de *C. cassia* extraído por arraste a

vapor de folhas e cascas contém 84,52% de E-cinamaldeído. Beraldo et al. (2013), ao caracterizarem quimicamente o óleo essencial de canela, encontraram, como componente majoritário, o cinamaldeído (67,58%). Andrade et al. (2012) também encontraram E-cinamaldeído como componente majoritário (77,72%) do óleo essencial de canela, quando caracterizado quimicamente.

Figura 6 - Estrutura química do cinamaldeído.

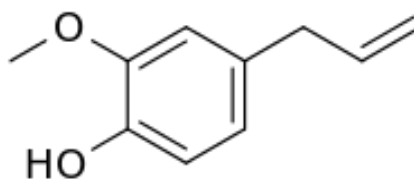


Trabalhos relatam o potencial antibacteriano tanto do óleo essencial quanto do cinamaldeído, sendo sua atividade bactericida sobre *E.coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonelle Typhymurium*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e EPEC comprovada (KWON; YU; PARK, 2003; OLIVEIRA, 2011).

2.6.2 Eugenol: componente majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia

Eugenol (Figura 7) é um composto fenólico volátil, fenilpropanoide, sendo quimicamente designado como 4-alil-2-metoxifenol ou 2-metoxi-4-(2-propenil-fenol), conhecido comumente como essência de cravo. Apresenta baixa solubilidade em água e é completamente solúvel em clorofórmio, álcool etílico, gordura e éter (ESCOBAR, 2002).

Figura 7 - Estrutura química do eugenol.



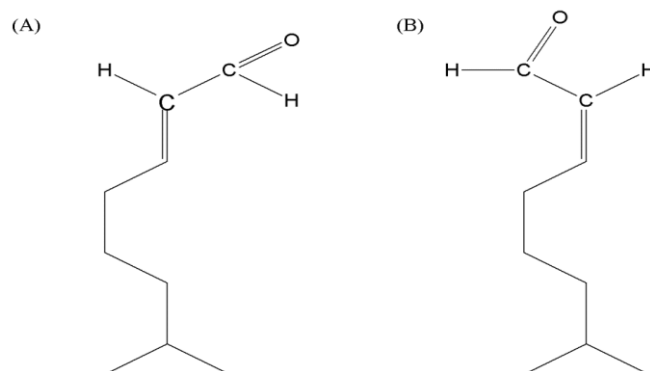
O eugenol é o principal componente do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e tem eficiente ação sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas (APOLÓNIO et al., 2014; CHAIEB et al., 2007; DEVI et al., 2010). Atua inibindo a oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), diminuindo os níveis de ATP nas células bacterianas; age na membrana citoplasmática, afetando o transporte de íons, alterando o perfil de ácidos graxos e atua também sobre diferentes enzimas bacterianas, incluindo ATPase, histidina carboxilase, amilase e protease (USTA et al., 2002; WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995).

2.6.3 Citral: componente majoritário do óleo essencial de capim limão

Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) é o nome dado à mistura isomérica de dois monoterpenos aldeídos acíclicos isoméricos, geranial (trans-citral, citral A) e neral (cis-citral, citral B) e pode ser isolado a partir de folhas e frutos de uma grande variedade de plantas e de citrinos. Normalmente, um isômero não ocorre sem o outro (APOLÓNIO et al., 2014; FISHER; PHILLIPS, 2006). Devido ao seu aroma de limão, o citral tem grande importância nas indústrias de alimentos e de aromas. Ele também é utilizado como matéria-prima em indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de perfumes (LEWINSOHN et al., 1998), sendo considerado interessante por apresentar atividade antimicrobiana (BELLETTI et al., 2007).

O teor de citral nos óleos essenciais de *C. flexuosos* varia de acordo com a cultivar, de 82,87% a 92,04% (KUMAR et al., 2009). Variações, também são encontradas na composição do óleo essencial de *C. flexuosos*. Chao et al. (2008) obtiveram, como principais componentes do óleo essencial de *C. flexuosos*, geranial (39,50%), neral (29,5%), geraniol (4,9%) e geranil acetato (2,5%). Oussalah et al. (2007) citam como principais compostos geranial (46%) e neral (31%). Anaruma et al. (2010) encontraram *trans*-geraniol (27,02%), citronelal (23,30%), nerol (13,47%), geranial (12,60%) e neral (9,64%) como os componentes majoritários do óleo essencial.

Figura 8 - Estruturas químicas dos isômeros neral (A) e geranial (B).



2.7 Adaptação e adaptação cruzada 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 (HWANG et al., 2014; SMIGIC et al., 2009). Entretanto, na maioria dos casos, a adaptação bacteriana a condições estressantes, como exposição a antimicrobianos e condições ácidas, resulta no endurecimento da membrana citoplasmática (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., 2007; LAMBERT et al., 2001).

Resistência cruzada ocorre quando o mecanismo de resistência é o mesmo para diversos agentes bacterianos, ou seja, diferentes agentes antimicrobianos atacam o mesmo alvo na célula, atingindo uma via comum para a morte celular, ou compartilham uma rota comum de acesso aos seus respectivos alvos (CHAPMAN, 2003).

Antimicrobianos e ácidos fracos são utilizados em indústrias alimentícias no intuito de garantir a inocuidade dos produtos produzidos. A adaptação e/ou a adaptação cruzada bacteriana a esses fatores podem causar impacto significativo na saúde humana, bem como drásticas consequências econômicas (APOLÓNIO et al., 2014).

2.8 Tolerância ao estresse ácido

Microrganismos que sobrevivem a tratamentos ácidos são susceptíveis ao estresse e apresentam características de estado fisiológico, crescimento e sistema de efluxo alteradas. A acidificação é considerada uma barreira de controle do crescimento de microrganismos no processamento de alimentos, visto que patógenos de origem alimentar se multiplicam melhor em valores de pH neutro (SMIGIC et al., 2009).

O estresse ácido é um efeito combinado entre baixos pHs e ácidos fracos (orgânicos). Os ácidos fracos, em sua forma não protonada, podem difundir-se para dentro da célula e dissociar-se. Consequentemente, o baixo pH intracelular resulta na inibição de várias enzimas citoplasmáticas essenciais. Como resposta, os microrganismos têm estratégias induzíveis de sobrevivência ao ácido e elas incluem um fator alternativo sigma (σ), uma proteína de choque ácido e proteínas Fur, que regulam de uma forma coordenada uma grande variedade de processos, incluindo o metabolismo do ferro (FORSYTHE, 2002). A permeabilidade da célula a prótons envolve alterações da composição da membrana citoplasmática; a indução de desidrogenases, redutases e enzimas respiratórias foi também associada ao estresse ácido, como mecanismo adaptativo ao estresse que envolve o efluxo de prótons (CACACE et al., 2010; CHOI; BAUMLER; KASPAR, 2000).

A exposição de bactérias ao estresse ácido subletal (pH 5,5 a 4,5) induz a resposta adaptativa de tolerância em muitas bactérias, fornecendo proteção à subsequente exposição ao estresse letal (pH 4,0) por meio do mecanismo denominado resposta de tolerância ao ácido (ATR). O mecanismo ATR tem sido estudado e caracterizado em bactérias gram-negativas e gram-positivas (BOOTH; CASH; O'BYRNE, 2002; SEPUTIENE et al., 2006).

E. coli torna-se capaz de apresentar tolerância aumentada a diferentes condições de estresse encontradas em alimentos, como, por exemplo, concentrações salinas e estresse subletal a ácidos orgânicos (LEENANON; DRAKE, 2001; PENG et al., 2014). A pré-exposição de células de *E. coli* na fase log, em pH 5,5 e, posteriormente, 4,3, promoveu a indução de proteínas do choque ácido e, segundo Paul e Hirshfield (2003), elas, provavelmente, seriam a causa de indução da ATR.

E. coli O157:H7, quando exposta ao estresse ácido, apresentou fase de latência prolongada com subsequente crescimento em meio de cultura sob condições de armazenamento em atmosfera modificada à baixa temperatura. A extensão observada na fase lag foi consequência direta da condição subletal à qual o microrganismo foi exposto anteriormente (SMIGIC et al., 2009).

O ácido láctico, quando utilizado para induzir a resposta de tolerância ácida em bactéria em meio *brain heart infusion* (BHI), reduziu a densidade celular à medida que o pH foi diminuído. O pH de 5,5 foi o menor valor, não havendo crescimento, em $\text{pH} \leq 5$, nas células que não foram submetidas ao estresse ácido, sendo chamadas ATR (-). Houve viabilidade em pH de 3,5, apenas nas bactérias expostas ao pH anterior de 5,5, tendo sido induzida, nessas células, a resposta de tolerância ácida (NAJJAR; CHIKINDAS; MONTVILLE, 2009).

2.9 Mecanismos de adaptação de microrganismos submetidos a condições estressantes

A aplicação de estresses aos microrganismos é claramente significativa para a indústria alimentar, em relação à sobrevivência de agentes patogênicos ou de organismos deteriorados nos alimentos (BEALES, 2004).

A adição de conservantes ácidos fracos induz um padrão específico de expressão de genes que, provavelmente, é necessário para uma adaptação ótima de bactérias a conservantes ácido fracos e baixo pH. O modo primário da ação antimicrobiana de baixo pH é reduzir o pH da célula interna (pH_i) abaixo do intervalo fisiológico normal tolerado pela célula, conduzindo à inibição do crescimento. Os mecanismos de sobrevivência envolvem a manutenção da homeostase do pH e isso é conseguido por uma combinação de mecanismos passivos e ativos (BEALES, 2004; SEPUTIENE et al., 2006).

Seputiene et al. (2006) relatam que o fenômeno de resistência ao ácido (AR) de *E. coli* é baseado em três sistemas celulares complexos. O sistema AR oxidativo, também referido como o sistema repressor de glicose, é induzido em células de fase estacionária e sua expressão requer o fator sigma alternativo *RpoS* e a proteína receptora de AMP cíclico CRP. O segundo mecanismo é o efeito da enzima glutamato descarboxilase diante do estresse ácido e também na tolerância ácida em várias bactérias, como *Escherichia coli*, facilitando a homeostase do pH intracelular por consumir prótons em reação de descarboxilação, com produção de GABA (ácido gama amino-butírico) a partir do glutamato. Tanto o GABA quanto o glutamato são dois dos principais solutos compatíveis presentes em bactérias e estão

envolvidos na manutenção do metabolismo intracelular diante de múltiplos agentes estressores. O terceiro sistema é semelhante ao dependente de glutamato e protege as células se arginina extracelular está presente. Ele é composto pela arginina descarboxilase AdiA, que é induzida por condições ácidas. Considera-se que os sistemas dependentes de glutamato e de arginina protegem a célula do estresse ácido ao consumirem prótons intracelulares durante a reação de descarboxilação. Geralmente, as bactérias gram-negativas são mais resistentes aos conservantes ácidos fracos do que as gram-positivas (RUSSELL, 1991). Uma razão para isso é encontrada na composição estrutural e química diferente das camadas exteriores das células (NIKAIDO; VARRA, 1985).

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, 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, 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, Apr. 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, Jan. 2014.
- ALIZADE, H.; GHANBARPOUR, R.; AFLATOONIAN, M. R. Molecular study on diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from under 5 years old children in southeast of Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Haikou, v. 4, n. 2, p. 813-817, Sept. 2014.
- ALONSO, M. Z. et al. Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia Coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. **Food Control**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 351-355, Feb. 2012.
- ALTALHI, A. D.; HASSAN, S. A. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. **Food Control**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 913-917, Oct. 2009.
- ANANTHA, R. P. et al. Evolutionary and functional relationships of colonization factor antigen I and other class 5 adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 72, p. 7190-7201, 2004.
- ANARUMA, N. D. et al. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 66-73, Jan./Mar. 2010.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.
- APOLÓNIO, J. et al. No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdam, v. 354, n. 2, p. 92-101, May 2014.
- ARAÚJO, V. S. et al. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 92, n. 6, p. 1172-1177, May 2002.

AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; DEL-TORO-SÁNCHEZ, L. Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. **Journal of Food Science**, Malden, v. 74, n. 7, p. R84-R91, Sept. 2009.

BACHIR, R. G.; BENALI, M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 2, n. 9, p. 739-742, Sept. 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 3, p. 1-20, 2004.

BELLETTI, N. et al. Antimicrobial activity of aroma compounds against *Saccharomyces cerevisiae* and improvement of microbiological stability of soft drinks as 58 assessed by logistic regression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 5580-5586, 2007.

BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo da Índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, p. 436-440, dez. 2013.

BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. New York: Springer Science Business, 2008. 276 p. (Food Science Text Series).

BISSET, N. M.; WICHTL, M. **Herbal drugs and phytopharmaceuticals**. 2nd ed. Boca Raton: CRC; Stuttgart: Medpharm, 2001. 566 p.

BOOTH, I. R.; CASH, P.; O'BYRNE, C. Sensing and adapting to acid stress. **Antonie van Leeuwenhoek**, Delft, v. 81, p. 33-42, 2002.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 1822-1828, 2006.

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>. Acesso em: 21 ago.2016.

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

BURT, S. A. et al. Carvacrol induces heat shock protein and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 4484-4490, 2007.

CACACE, G. et al. Proteomics for the elucidation of cold adaptation mechanisms in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Proteomics**, New York, v. 73, n. 10, p. 2021-2030, Sept. 2010.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems: a review. **Food Control**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 111-119, Aug. 2015.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and bioactivity of essential oils. In: THORMAR, H. (Ed.). **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. West Sussex: J. Wiley, 2001. p. 203-238.

CERNA-CORTES, J. F. et al. Presence of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes on mung bean sprouts from public markets in Pachuca, Mexico. **Food Control**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 280-283, June 2013.

CHAIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. **Phytotherapy Research**, Tunisie, v. 21, p. 501-506, 2007.

CHAO, S. et al. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Malden, v. 23, n. 6, p. 444-449, Nov./Dec. 2008.

CHAPMAN, J. S. Desinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 51, p. 271-276, 2003.

CHEN, D. H.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 83-98, 2004.

CHO, S. H. et al. Outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* O169 enteritis in schoolchildren associated with consumption of kimchi, Republic of Korea. **Epidemiology & Infection**, London, v. 142, n. 3, p. 616-623, Mar. 2014.

CHOI, S. H.; BAUMLER, D. J., KASPAR, C. W. Contribution of dps to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3911-3916, 2000.

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.

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.

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.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, Pretoria, v. 130, n. 1, p. 107-115, July 2010.

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

DIAS, N. A. A. et al. Antimicrobial activity of essential oils on *Clostridium perfringens* type a inoculated in mortadella. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 35, p. 466-472, Nov. 2015.

DJILANI, A.; DICKO, A. The therapeutic benefits of essential oils. In: BOUAYED, J.; BOHN, T. (Ed.). **Nutrition, well-being and health**. London: InTech, 2012. p. 155-178.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas: ventajas y esventajas de su uso. **Revista Cubana Estomatol**, Havana, v. 39, n. 2, p. 139-156, 2002.

EVANS JUNIOR, D. J.; EVANS, D. G. *Escherichia Coli* in diarrheal disease. In: BARON, S. (Ed.). **Medical microbiology**. 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. chap. 25, p. 1-15.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, p. 1232-1240, 2006.

FLECKENSTEIN, J. M. et al. Identification of a two-partner secretion locus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunology**, Oxford, v. 74, p. 2245-2258, 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANKEL, G. et al. Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, Washington, v. 30, p. 911-921, 1998.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: THORMAR, H. (Ed.). **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. West Sussex: J. Wiley, 2011. p. 255-306.

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

HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HWANG, C. et al. The influence of acid stress on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on cooked ham. **Food Control**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 245-250, Mar. 2014.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos: I.**, su significado e metodos de enumeracion. Zaragoza: Acribia, 2000. v. 1, 439 p.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, London, v. 2, p. 123-140, 2004.

KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, London, v. 382, n. 9888, p. 209-222, July 2013.

KUMAR, S. et al. Differential citral content of 15 lemongrass genotypes and their anti microbial property. **The Internet Journal of Microbiology**, Georgetown, v. 6, n. 1, 2009. Disponível em: <<http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-microbiology/volume-6-number-1/differential-citral-content-of-15-lemongrass-genotypes-and-their-antimicrobial-property.html>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

KWON, J. A.; YU, C. B.; PARK, H. D. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 37, n. 1, p. 61-65, June 2003.

LA STORIA, A. et al. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, Paris, v. 162, n. 2, p. 164-172, Feb./Mar. 2011.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 453-462, 2001.

LEENANON, B.; DRAKE, M. A. Acid stress, starvation and cold stress affect post stress behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and nonpathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, p. 970- 974, 2001.

LEWINSOHN, E. et al. Histochemical Localization of Citral Accumulation in Lemongrass Leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals of Botany**, London, v. 81, p. 35-39, 1998.

LÓPEZ-BANDA, D. A. et al. Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. **Biomed Research International**, New York, v. 2013, p. 1-10, May 2013.

MACDONALD, E. et al. An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection in Norway, 2012: a reminder to consider uncommon pathogens in outbreaks involving imported products. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v. 143, n. 3, p. 486-493, Feb. 2015.

MARTINS, A. G. L. A. et al. 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.

MARTINS, H. H. de A. **Sinergismo antimicrobiano de óleos essenciais e nitrito sobre *Clostridium sporogenes* inoculado em fiambre de peito de frango**. 2016. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

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.

NAJJAR, M. Z. B.; CHIKINDAS, M. L.; MONTVILLE, T. J. The acid tolerance response alters membrane fluidity and induces nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. **Probiotics e Antimicrobial Proteins**, New York, v. 1, p. 130-135, Nov. 2009.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, p. 142-201, 1998.

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

NIKAIDO, H.; VARRA, T. Molecular basis of bacteria outer membrane permeability. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 49, p. 1-32, 1985.

NORTHEY, G. et al. Sentinel surveillance for travellers' diarrhoea in primary care. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 7, p. 126, 2007.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 24, n. 5, p. 478-483, Oct. 2011.

OLIVEIRA, M. M. M. de. **Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica**. 2011. 138 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

OLIVEIRA, M. M. M. de; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Essential oils of thyme and Rosemary in the control of *Listeria monocytogenes* in raw beef. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 4, p. 1181-1188, Mar. 2013.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, p. 414-20, 2007.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 69, p. 1046-1055, 2006.

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.

PAUL, B.; HIRSHFIELD, I. The effect of acid treatment on survival and protein expression of a laboratory K-12 strain *Escherichia coli*. **Research Microbiology**, Paris, v. 154, p. 115-121, 2003.

PENG, S. et al. Evaluation of three reference genes of *Escherichia coli* for mRNA expression level normalization in view of salt and organic acid stress exposure in food. **FEMS Microbiol Letters**, Amsterdam, v. 355, n. 1, p. 78-82, June 2014.

PICHEL, M.; BINSZTEIN, N.; VIBOUD, G. CS22, a novel human enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin, is related to CS15. **Infection of Immunity**, Oxford, v. 68, p. 3280-3285, 2000.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, New York, v. 311, 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: 12 ago. 2015.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, p. 465-483, July 2005.

RAO, M. C. Toxins which activate guanylate cyclase: heat-stable enterotoxins. **Ciba Foundation Symp**, Amsterdam, v. 112, p. 74-93, 1985.

RUSSELL A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 71, p. 191-201, 1991.

RYU, S. H. et al. Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 159, n. 3, p. 263-266, Oct. 2012.

SAINZ, T. et al. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, p. 357-367, Dec. 2005.

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.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 60, p. 167-215, 1996.

SEPUTIENE, V. et al. Acid response of exponentially growing *Escherichia coli* K-12. **Microbiological Research**, Brussels, v. 161, p. 65-74, 2006.

- 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**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 1243-1251, 2005.
- SILVA, Z. N. de et al. 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, ago. 2001.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMOES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2004. p. 467-495.
- SIMÕES, L. A. **Misturas de óleos essenciais e seus compostos majoritários na conservação de apresentados inoculados com *Clostridium sporogenes***. 2016. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- SJOLING, Å. et al. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 3295-3301, 2007.
- 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, p. 629-637, 2009.
- SOUZA, A. A. et al. Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* Enterotoxigênica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 105-112, 2016.
- STEFFEN, R. et al. Vaccination against enterotoxigenic *Escherichia coli*, a cause of travelers' diarrhea. **Journal of Travel Medicine**, Hamilton, v. 12, p. 102-107, 2005.
- TANGI, S. C. et al. Prevalence of pathogenicity island markers genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Singapore, v. 5, n. 8, p. 662-666, Aug. 2015.
- TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, jul./set. 2009.
- TURINA, A. V. et al. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, Chichester, v. 122, p. 101-113, 2006.
- TURNER, S. M. et al. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 263, p. 10-20, 2006.

USTA, M. et al. Prevalence of transfusion transmitted virus infection and its effect on renal graft survival in renal transplant recipients. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, Uppsala, v. 36, n. 6, p. 473-477, Dec. 2002.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Food borne pathogens**. London: Wolfe, 1991. 557 p.

VERPOORTE, R.; VANDER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, London, v. 9, p. 323-343, 2000.

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**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 104-109, Sept. 2014.

WENDAKOON, C. N.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, p. 280-283, 1995.

WENNERAS, C.; ERLING, V. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. **Journal of Health, Population and Nutrition**, Bangladesh, v. 22, p. 370-382, 2004.

WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, p. 569-584, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The United Nations Children's Fund. **Diarrhoea: why children are still dying and what can be done**. Geneva, 2009. Disponível em: <http://www.unicef.org/health/index_51412.html>. Acesso em: 15 ago. 2015.

YOON, Y. et al. Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses. **Food Research International**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 25-36, 2015.

YUCEL, N.; ULUSOY, H. A Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples. **Food Control**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 383-388, May 2006.

ZHANG, Y. et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, Oxford, v. 59, p. 282-289, 2016.

CAPÍTULO 2

Adaptação e adaptação cruzada de *Escherichia coli* enterotoxigênica e enteropatogênica a componentes majoritários de óleos essenciais e ao estresse ácido

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma bactéria comumente encontrada em alimentos devido a falhas no processamento e manipulação. É habitante comensal do trato entérico de seres humanos e animais, desempenhando papel benéfico ao hospedeiro, sendo capaz de sintetizar vitaminas, impedir e, ou favorecer a eliminação de linhagens patogênicas de *E.coli* (QADRI et al., 2005; TANGI et al., 2015).

Conhecem-se seis patotipos de *E.coli* que são a enteropatogênica (EPEC), a enterotoxigênica (ETEC), a enteroinvasiva (EIEC), a entero-hemorrágica (EHEC), a enteroagregativa (EA_ggEC) e a difusamente aderente (DAEC) (TURNER et al., 2006). Os patotipos EPEC e ETEC estão associados, respectivamente, a 11,1% e a 6,0% das mortes causadas por diarreia em crianças até 59 meses de idade, em 2011 (LANATA et al., 2013).

Diante do quadro frequente do surgimento de bactérias com tolerância ao estresse ácido, aos agentes sanificantes como hipoclorito de sódio e quaternário de amônio, dentre outros e a conservantes empregados na indústria de alimentos, trabalhos buscando antimicrobianos que não promovam aumento de tolerância (adaptação) ou adaptação cruzada dos microrganismos às condições da indústria têm grande significância, sendo os óleos essenciais e seus componentes majoritários os antimicrobianos mais sugeridos para serem utilizados.

O grande estímulo para o uso de óleos essenciais como conservantes em alimentos advém do fato de que, por serem constituídos por vários componentes, agem em múltiplos alvos bacterianos não ocorrendo, portanto, a possibilidade da adaptação fisiológica das células a essas substâncias (SOUZA et al., 2016).

Relatos da ausência da adaptação ou adaptação cruzada de bactérias a concentrações subletais de constituintes majoritários de óleos essenciais também já foram realizados. Luz et al. (2012) não observaram adaptação ou adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, após sua exposição a concentrações subletais de óleos essenciais de orégano ou carvacrol à elevada temperatura, ácido lático ou NaCl. Resultados semelhantes foram descritos para *Pseudomonas aeruginosa* que, após ser submetida a estresse subletal do óleo

essencial de *Rosmarinus officinalis* e/ou 1,8 cineol, não apresentou adaptação ou adaptação cruzada aos mesmos estressores estudados por Gomes Neto et al. (2012) e Luz et al. (2012).

Entretanto, relato da adaptação das bactérias *S. Typhimurium*, *S. enteritidis*, *E.coli*, *S.aureus* e *Enterococcus faecalis* ao óleo essencial de *tea tree* e tomilho e de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *E.coli* ao óleo essencial de orégano (MELO et al., 2015), *Listeria monocytogenes* também se mostrou capaz de desenvolver adaptação e adaptação cruzada aos componentes majoritários carvacrol e eugenol (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015). Isto leva ao questionamento da não ocorrência da adaptação cruzada das bactérias a concentrações subletais de óleos essenciais ou seus componentes majoritários.

Citral, eugenol e cinamaldeído são componentes majoritários que apresentam elevada atividade antimicrobiana, sendo seu uso de grande interesse como conservante e ou sanificante, na indústria de alimentos. Entretanto, pouco se sabe sobre a capacidade de EPEC e ETEC possuírem mecanismos fisiológicos que as levem à adaptação e à adaptação cruzada a esses componentes.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a capacidade adaptativa, bem como a capacidade de EPEC e ETEC desenvolverem adaptação cruzada aos antimicrobianos citral, eugenol, cinamaldeído e ao pH ácido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de condução do experimento

O estudo foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

2.2 Componentes majoritários

Foram utilizados os componentes citral (95%), eugenol (100%) e cinamaldeído (93%), adquiridos da Sigma-Aldrich®.

2.3 Microrganismos, padronização e manutenção dos inóculos

Para a realização do experimento foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) INCQS 00181 (CDC O55), cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) ATCC 35401, cedida pelo Laboratório de Enterobactérias, LABNET, Rio de Janeiro, RJ. As culturas estoque foram armazenadas 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). Os inóculos foram reativados inoculando-se alíquotas de 100 µL das culturas estoque em tubos contendo 10 mL de caldo infusão cérebro de coração (BHI) e incubados, a 37 °C, por 24 horas. A padronização dos inóculos foi realizada mediante curva de crescimento. Após a reativação das culturas, alíquotas de 50 µL dos inóculos foram transferidas para 300 mL de caldo BHI e incubadas a 37 °C, sendo realizadas leituras periódicas da absorbância (600nm) em espectrofotômetro (BEL SP-2000) e plaqueamento em ágar triptona de soja (TSA) com incubação a 37 °C, por 24 horas. As culturas foram padronizadas em, aproximadamente, 10^8 UFC mL⁻¹.

2.4 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório de EPEC e ETEC

A influência do pH no crescimento de EPEC e ETEC foi avaliada em microplacas de poliestireno de 96 cavidades. Em cada cavidade foram dispensados 150 µL de caldo BHI, com pH previamente ajustado com ácido lático (98%) e inoculados 10 µL das culturas padronizadas. Foram avaliados os pH de 6,0; 5,0; 4,5; 4,0 e 3,5; 3,0; 2,5 e 2,0. As microplacas

foram incubadas a 37 °C, por 24 horas, com posterior plaqueamento em TSA, empregando-se a técnica de microgota. O pH mínimo inibitório foi definido por meio de avaliação visual, como o menor valor capaz de inibir, completamente, o crescimento bacteriano e o pH mínimo de crescimento, aquele imediatamente acima ao pH mínimo inibitório.

2.5 Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral sobre EPEC e ETEC

A concentração mínima bactericida dos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2003), com adaptações. Os componentes majoritários foram solubilizados em caldo BHI, acrescido de Tween 80 (0,5%). Foram avaliadas as seguintes concentrações (%): 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,03 e 0,015 (v / v). Alíquotas de 150 µL das soluções foram adicionadas nas cavidades e inoculados 10 µL das culturas padronizadas a, aproximadamente, 10⁸ UFC mL⁻¹. As microplacas foram vedadas e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA e incubadas, a 37 °C, 24 horas.

Foram utilizados dois controles para cada composto testado, o controle negativo, contendo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e componente majoritário e o controle positivo, contendo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e 10 µl de inóculo padronizado. Foi considerada a concentração mínima bactericida (CMB) dos componentes em que, após a incubação, não houve crescimento bacteriano em placas. O experimento foi realizado em triplicata e três repetições.

2.6 Adaptação de EPEC e ETEC aos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral e ao pH ácido

2.6.1 Adaptação de EPEC e ETEC aos componentes majoritários

As células de EPEC e ETEC foram expostas a concentrações subletais de citral, eugenol e cinamaldeído. As doses subletais foram determinadas com base nas CMB e foram equivalentes a CMB/4, CMB/8 e CMB/16 (LUNDÉN et al., 2003), com adaptações. Em tubos tipo Falcon contendo 18 mL de caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 foram adicionados

os componentes nas concentrações subletais. Após homogeneização, alíquotas de 2 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 a 5.000 xg/5 min e as células adaptadas, lavadas três vezes com solução salina, ressuspensas em caldo BHI e padronizadas em torno de 10^8 UFC mL⁻¹, para posterior utilização.

2.6.2 Adaptação de EPEC e ETEC ao pH ácido

As células de EPEC e ETEC foram expostas ao pH mínimo de crescimento de cada bactéria. Em tubos tipo Falcon contendo 18 mL de caldo BHI com pH mínimo de crescimento de cada cultura, ajustado com ácido láctico, foram inoculados 2 mL de inóculo padronizado e incubados, a 37 °C, por 6 horas. Após esse período, as culturas foram centrifugadas (5.000 g/5 min) e as células adaptadas, lavadas três vezes com solução salina, ressuspensas em caldo BHI e padronizadas em torno de 10^8 UFC mL⁻¹, para posterior utilização.

2.7 Avaliação da adaptação de EPEC e ETEC aos componentes majoritários e resposta à tolerância ácida

2.7.1 Componentes majoritários

As células expostas às concentrações subletais dos antimicrobianos foram ressuspensas em caldo BHI e a cultura padronizada a 10^8 UFC mL⁻¹ para posterior exposição às diferentes concentrações do mesmo composto (CMB/2; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2CMB) ao qual a cultura foi previamente exposta. Utilizaram-se microplacas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003), com adaptações. Os componentes majoritários foram solubilizados em caldo BHI, adicionados de Tween 80 (0,5%). Alíquotas de 150 µL das soluções foram adicionadas nas cavidades e inoculados 10 µL das culturas padronizadas. As microplacas foram incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, retiraram-se alíquotas de 10 µL, sendo realizado o plaqueamento em TSA pela técnica de microgotas e incubação a 37 °C, por 24 horas.

As células de EPEC e ETEC foram classificadas como capazes de se adaptarem quando foi detectado crescimento em placas após cultivo em presença do componente em concentrações maiores que a CMB. Paralelamente, realizou-se o mesmo procedimento com

células de EPEC e ETEC não expostas a doses subletais, possibilitando a comparação entre células expostas e não expostas, quanto à susceptibilidade aos componentes.

2.7.2 Resposta de tolerância ácida

As células adaptadas ao pH mínimo de crescimento foram ressuspensas em caldo BHI e a cultura padronizada em 10^8 UFC mL⁻¹. Alíquotas de 10 µL da cultura foram dispensadas nos poços das microplacas previamente acrescidos de caldo BHI com diferentes pH ajustados com ácido láctico (98%). Avaliaram-se os pHs de 6,0; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5 e 2,0. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas. Após incubação, foi realizado o plaqueamento em TSA, empregando-se a técnica de microgotas e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Considerou-se a capacidade das células de EPEC e ETEC em desenvolver tolerância ácida quando houve crescimento em pH inferior ao pH mínimo de crescimento. Células não adaptadas foram utilizadas como controle.

2.8 Adaptação cruzada

2.8.1 Avaliação da adaptação cruzada entre os componentes majoritários

As células de EPEC e ETEC previamente expostas à concentração subletal (1/16 CMB) de eugenol, citral e cinamaldeído, equivalente a 0,062%, 0,062% e 0,007%, respectivamente e padronizadas em 10^8 UFC mL⁻¹ foram cultivadas em presença dos componentes majoritários aos quais não foram previamente expostas (Tabela 1) nas concentrações de CMB/2, CMB, 1,2CMB, 1,4CMB, 1,6CMB, 1,8CMB e 2CMB.

Tabela 1 – Ensaio da avaliação da resposta de adaptação cruzada de culturas de EPEC e ETEC.

Estresse subletal	Concentração (1/16 CMB)	Resposta adaptativa
Eugenol	0,062%	Cinamaldeído/citral
Cinamaldeído	0,007%	Eugenol/citral
Citral	0,062%	Cinamaldeído/eugenol

2.8.2 Avaliação da adaptação cruzada entre componentes majoritários e estresse ácido

Após serem expostas à concentração subletal (1/16) de eugenol, citral e cinamaldeído, alíquotas de 10 µL das culturas de EPEC e ETEC padronizadas foram inoculadas nos poços das microplacas contendo 150 µL de caldo BHI com pH previamente ajustado para 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 6, com ácido láctico (98%) e incubadas, a 37 °C, 24 horas. Após esse período, realizou-se o plaqueamento em TSA. Considerou-se a capacidade de EPEC e ETEC desenvolverem adaptação cruzada pelo crescimento em placa após exposição ao pH abaixo do pH mínimo de crescimento.

2.8.3 Avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e componentes majoritários

Após serem expostas ao pH ácido, alíquotas de 10 µL das culturas de EPEC e ETEC padronizadas foram inoculadas nos poços das microplacas contendo 150 µL de caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e dos componentes majoritários eugenol, citral e cinamaldeído nas concentrações de CMB/2, CMB, 1,2CMB, 1,4CMB, 1,6CMB, 1,8CMB e 2CMB (v/v) e incubadas, a 37 °C, 24 horas. Após esse período, o crescimento da cultura foi avaliado pelo plaqueamento em TSA, com incubação a 37 °C, por 24 horas. Considerou-se a capacidade de as células de EPEC e ETEC desenvolverem adaptação cruzada por meio do crescimento em concentrações acima da subletal.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do pH mínimo inibitório e mínimo de crescimento de EPEC e ETEC

O pH mínimo inibitório e o mínimo de crescimento foram de 4,0 e 4,5, respectivamente, para ambas, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Escherichia coli* enterotoxigênica. Estes resultados corroboram dados da literatura para *Escherichia coli* (SEPUTIENE et al., 2006). Resultado semelhante foi encontrado por Lin et al. (1995), ao avaliarem o pH mínimo de crescimento de vários membros da família enterobacteriaceae, como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Shigella flexneri*, encontraram os valores de pH mínimo de crescimento de 4,0, 4,4 e 4,8, respectivamente.

A inibição do crescimento bacteriano por ácidos orgânicos, tais como o ácido láctico, é de extrema importância na produção de alimentos. Os ácidos orgânicos diminuem o pH intracelular pela produção de íons de hidrogênio. Entretanto, ao contrário dos ácidos fortes, eles não se dissociam completamente. A forma não dissociada dos ácidos fracos é considerada o motivo de sua maior inibição, em comparação com a dos ácidos fortes, que podem agir apenas no exterior da célula (ITA; HUTKINS, 1991).

O ácido láctico tem a constante de dissociação ácida (pKa) de 3,86, estando este valor próximo ao valor obtido para pH mínimo de crescimento da bactéria. De acordo com Hsiao e Siebert (1999), em valor de pKa próximo ao pH do meio prevalece a forma não dissociada do ácido, o estado no qual os ácidos orgânicos atravessam a membrana plasmática.

3.2 Concentrações mínimas bactericidas dos componentes majoritários

As CMB de cinamaldeído, eugenol e citral sobre ambas as cepas foram de 0,125%, 1,0% e 1,0%, respectivamente. O cinamaldeído apresentou maior atividade bactericida sobre EPEC e ETEC, quando comparado com eugenol e citral, sendo este oito vezes mais eficiente. Sabe-se que o óleo essencial de *Cinnamomum cassia*, cujo componente majoritário é o cinamaldeído, tem atividade bactericida superior à dos óleos essenciais que têm como componentes majoritários o eugenol e o citral (OLIVEIRA et al., 2012; VALERIANO et al., 2012), sugerindo sua elevada atividade antibacteriana, quando comparado com outros componentes, como o eugenol e citral.

Esta ação diferenciada também foi relatada por Pei et al. (2009) que, ao compararem as CMB dos componentes majoritários eugenol e cinamaldeído obtidas para *E.coli*, observaram valores de 1.600 e 800 mg/L para CMB (1,6% e 0,8%, respectivamente),

corroborando os resultados obtidos neste trabalho. Rezende et al. (2017) demonstraram que o óleo essencial de *C. citratus* inibiu bactérias resistentes a antibióticos na concentração de 0,06%, sendo efetivo contra *E.coli* na concentração de 31,25 mg.L⁻¹ (equivalente a 0,03%) .

Óleos ricos em compostos fenólicos têm atividade antimicrobiana sobre bactérias da família Enterobacteriaceae (PEÑALVER et al., 2005). Duarte et al. (2007), que avaliaram 29 óleos essenciais contra diferentes sorotipos de *E. coli*, observaram que os óleos de *M. piperita*, *O. basiculum*, *O. vulgare* e *Thymus vulgaris* apresentaram concentrações mínimas inibitórias acima de 1.000 µg/mL, valores considerados elevados pelos autores.

Em trabalho realizado com ETEC ATCC 35401, a mesma cepa utilizada neste trabalho, Souza et al. (2016) verificaram que o óleo essencial de *C. cassia* com 84,52% de *E*-cinamaldeído apresentou uma CMB de 0,12%, o óleo essencial de *C.citratus* com 43,77% de geranial e 31,66% de neral apresentou CMB de 1,0% e o óleo essencial de *S.aromaticum*, contendo 80,67% de eugenol, CMB de 0,5%. A atividade antibacteriana encontrada por Souza et al. (2016) foi devido, principalmente, aos componentes majoritários, como no presente trabalho.

Huang et al. (2014) determinaram a CMB do óleo de *Cinnamomum cassia* contendo 68,52% de cinamaldeído sobre *E. coli* e encontraram 10 mg/mL (correspondente a 1%), sugerindo que o componente cinamaldeído foi o responsável pelo efeito bactericida. Os mesmos autores sugerem que a perda da permeabilidade e da integridade da membrana celular, com conseqüente extravasamento de conteúdo intracelular, pode ser o principal efeito dos mecanismos de ação de óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia*) sobre *S. aureus* e *E. coli*, que contém o composto transcinamaldeído como majoritário.

Devi et al. (2010) relatam que o mecanismo primário de ação do eugenol, em concentração bactericida, promoveu a ruptura da membrana citoplasmática bacteriana, aumentando a sua permeabilidade não específica. Esta hiperpermeabilidade promoveu o extravasamento de íons e a perda excessiva de outros componentes celulares, incluindo as proteínas intracelulares, resultando, finalmente, em morte celular. Craveiro et al. (1981) complementam que o eugenol provoca inibição na produção de amilase e proteases pela célula, bem como sua deterioração e lise.

Greay e Hammer (2015) citam alguns dos mecanismos por meio dos quais os monoterpenos atuam sobre células bacterianas. Os autores relatam que monoterpenos interferem na integridade e no funcionamento da membrana celular, por meio da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória.

3.3 Adaptação de EPEC e ETEC aos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral

A adaptação de EPEC e ETEC foi realizada pela adição de 1/4, 1/8 e 1/16 da concentração obtida nos testes de CMB dos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral das bactérias. A concentração de 1/4 da CMB dos componentes corresponde a 0,0312% de cinamaldeído, 0,25% de eugenol e 0,25% de citral. A concentração equivalente a 1/8 da CMB dos componentes corresponde a 0,0156% de cinamaldeído, 0,125% de eugenol e 0,125% de citral. Já, a concentração de 1/16 da CMB dos componentes equivalem a 0,0078% de cinamaldeído, 0,0625% de eugenol e 0,0625% de citral para EPEC e ETEC. De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3, houve maior adaptação das bactérias frente ao componente cinamaldeído, sendo observada a adaptação de EPEC até duas vezes mais (0,25%), quando exposta a 1/8 do componente. Já para o eugenol, a tolerância das células alcançou apenas até 1%. ETEC apresentou resposta adaptativa por crescer em concentrações de até 0,25%, quando exposta a 1/4 e 1/8 de cinamaldeído. Assim, optou-se por diminuir a concentração subletal de exposição das bactérias para 1/16, para a verificação da capacidade adaptativa, quando submetidas a uma concentração menor dos componentes. Feito isso, observou-se que EPEC tornou-se capaz de adaptar-se ao cinamaldeído, assim como às concentrações duas vezes maiores para os componentes eugenol (2%) e citral (2%), o que não havia acontecido antes da exposição à concentração subletal de 1/16 de eugenol e citral (Tabela 2).

Tabela 2 - Adaptação de EPEC aos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral.

Estresse		subletal						
1/4 CMB		CMB/2	CMB	1,2xCMB	1,4xCMB	1,6xCMB	1,8xCMB	2xCMB
0,0312%	CIN	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	EU	+	-	-	-	-	-	-
0,25%	CIT	-	-	-	-	-	-	-
1/8 CMB		CMB/2	CMB	1,2xCMB	1,4xCMB	1,6xCMB	1,8xCMB	2xCMB
0,0156%	CIN	+	+	+	+	+	+	+
0,125%	EU	+	+	-	-	-	-	-
0,125%	CIT	-	-	-	-	-	-	-
1/16 CMB		CMB/2	CMB	1,2xCMB	1,4xCMB	1,6xCMB	1,8xCMB	2xCMB
0,0078%	CIN	+	+	+	+	+	+	+
0,0625%	EU	+	+	+	+	+	+	+
0,0625%	CIT	+	+	+	+	+	+	+

(+) Houve crescimento. (-) Não houve crescimento. (CIN) cinamaldeído. (EU) eugenol. (CIT) citral. Os resultados do crescimento ou ausência do crescimento foram obtidos por meio de plaqueamento.

Conforme os resultados expostos na Tabela 3, ETEC, quando submetida à concentração subletal (1/16) dos antimicrobianos, tornou-se capaz de adaptar em concentração de até duas vezes mais de cinamaldeído (0,25%) e CMB de eugenol (1%), não apresentando capacidade adaptativa ao citral.

Tabela 3 - Adaptação de ETEC aos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral.

Estresse subletal								
1/4 CMB		CMB/2	CMB	1,2xCMB	1,4xCMB	1,6xCMB	1,8xCMB	2xCMB
0,0312%	CIN	+	+	+	+	+	+	+
0,25%	EUG	+	-	-	-	-	-	-
0,25%	CIT	-	-	-	-	-	-	-
1/8 CMB		CMB/2	CMB	1,2xCMB	1,4xCMB	1,6xCMB	1,8xCMB	2xCMB
0,0156%	CIN	+	+	+	+	+	+	+
0,125%	EUG	+	-	-	-	-	-	-
0,125%	CIT	-	-	-	-	-	-	-
1/16 CMB		CMB/2	CMB	1,2xCMB	1,4xCMB	1,6xCMB	1,8xCMB	2xCMB
0,0078%	CIN	+	+	+	+	+	+	+
0,0625%	EUG	+	+	-	-	-	-	-
0,0625%	CIT	+	-	-	-	-	-	-

(+) Houve crescimento. (-) Não houve crescimento. (CIN) cinamaldeído. (EUG) eugenol. (CIT) citral. Os resultados do crescimento ou ausência do crescimento foram obtidos por meio de plaqueamento.

De acordo com Alvarez-Ordóñez et al. (2008), a exposição a condições subletais de substâncias antimicrobianas pode resultar no desenvolvimento de aumento da tolerância aos mesmos (homólogos), ou a agente de estresse de tolerância cruzada (heterólogos). Neste estudo, a exposição das bactérias a concentrações subletais fez com que estas se tornassem mais resistentes quando expostas posteriormente aos agentes antibacterianos. Isto é confirmado por Souza, Tebaldi e Piccoli (2015), que avaliaram a capacidade de adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol, e encontraram CMI de 24% e, após a exposição da bactéria à dose subletal de 0,06% dos antimicrobianos, a CMI aumentou para 12,5%, levando-os a concluir que a pré-exposição da bactéria à concentração subletal dos antimicrobianos aumentou sua resistência.

Ter conhecimento da resposta adaptativa das bactérias à lesão subletal é um aspecto importante da microbiologia de alimentos, já que muitos processos aos quais as bactérias são submetidas durante o processamento não são letais, representando riscos quanto à inocuidade dos produtos produzidos. A presença de agentes antimicrobianos causou inibição do

crescimento de estirpes não adaptadas, confirmando que os agentes avaliados são agentes antibacterianos eficazes.

Dodd, Sharman e Bloomfield (1997) sugerem que as células bacterianas, quando expostas a níveis subletais de antimicrobianos, podem desenvolver um desequilíbrio entre anabolismo e catabolismo causado por concentrações de agentes antimicrobianos que são suficientes para interromper o crescimento sem afetar a taxa metabólica, resultando na autodestruição de células bacterianas por meio da produção de radicais livres, devido a uma falha nos mecanismos de reparação celular. Os mesmos autores acrescentam que a letalidade de um agente antimicrobiano contra células em rápido crescimento é aumentada pela autodestruição, em vez de ser uma medida absoluta da eficácia do agente.

A atividade antimicrobiana exercida pelos óleos essenciais e seus componentes majoritários tem sido descrita para uma ampla variedade de microrganismos, tanto gram-positivos quanto gram-negativos, os quais respondem de forma distinta (BOULANOUAR et al., 2013).

Conforme Gutierrez et al. (2008), 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. No que se refere à potência do grupo funcional, o cinamaldeído é um aldeído aromático, já bem conhecido como agente antimicrobiano natural de patógenos contaminantes de alimentos. Seu mecanismo de ação tem sido associado à formação de base de Schiff com proteínas de membrana pela reação com seu grupo carbonílico livre, o que provoca danos na membrana celular (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2011; WEI et al., 2011). Wendakoon e Sakaguchi (1993) levantaram a hipótese de que o grupo hidroxilo no eugenol poderia se combinar com proteínas, impedindo a ação da enzima, enquanto o grupo carbonilo no cinamaldeído poderia aderir a proteínas para evitar a ação de aminoácidos descarboxilases.

Oussalah, Caillet e Lacroix (2006) relatam que o citral, um terpeno, tem a capacidade de perturbar e penetrar na estrutura lipídica da parede celular bacteriana, levando à desnaturação de proteínas, à destruição da membrana celular, à fuga de citoplasma e lise e, eventualmente, à morte. A diminuição do pH devido à ruptura da membrana celular causada por terpenos em bactérias significa que se perde o controle de processos celulares, tais como transcrição de DNA, síntese de proteínas e atividade enzimática.

3.4 Resposta à tolerância ácida

Observou-se que a pré-exposição das células ao pH mínimo de crescimento induziu a tolerância ácida nas bactérias estudadas. EPEC e ETEC desenvolveram tolerância ácida por crescerem em pH 4,0 (Tabela 4), abaixo do pH mínimo de crescimento, os quais haviam inibido, completamente, o crescimento das células anteriormente.

Tabela 4 – Avaliação de crescimento de EPEC e ETEC em diferentes pH, quando submetidas ao estresse ácido.

	pH							
	6,0	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0
EPEC	+	+	+	+	-	-	-	-
CONTROLE	+	+	+	-	-	-	-	-
ETEC	+	+	+	+	-	-	-	-
CONTROLE	+	+	+	-	-	-	-	-

(+) Houve crescimento. (-) Não houve crescimento. Controle: Células de EPEC e ETEC não adaptadas. Os resultados do crescimento ou ausência do crescimento foram obtidos por meio de plaqueamento.

Um pH adverso afeta pelo menos dois aspectos de uma célula microbiana viva: o funcionamento de suas enzimas e o transporte de nutrientes para o interior da célula. Em relação ao transporte de nutrientes, a célula bacteriana tende a possuir uma carga residual negativa. Desse modo, compostos não ionizados conseguem entrar na célula, enquanto compostos ionizados não conseguem. Em pH neutro ou alcalino, os ácidos orgânicos não entram, ao passo que, em valores de pH ácidos, esses compostos estão não ionizados e conseguem entrar nas células carregados negativamente (JAY, 2005).

Portanto, os conservantes ácidos fracos afetam a capacidade das células de manter a homeostase do pH, interrompendo o transporte do substrato e inibindo as vias metabólicas (BEALES, 2004).

Seputiene et al. (2006) avaliaram a capacidade de *E.coli* K-12 MG1655 desenvolver tolerância ácida. Inicialmente, as células foram cultivadas meio LB a pH 7,0 e foram adaptadas com ácido em meio LB a pH variando entre 3,8-5,8 (durante 15 min e 60 min). Células não adaptadas foram utilizadas como controle. As células submetidas a pH 4,5-4,9 apresentaram melhor resposta adaptativa quando comparadas com as células adaptadas a pH 5,3-5,8, após serem submetidas a pH 2,5. Os autores verificaram que as células pré-expostas a pH 4,5 por 60 minutos obtiveram resposta adaptativa ao serem submetidas a pH 2,5, antes considerado letal ao crescimento da bactéria. Este estudo assemelha-se ao resultado

encontrado por Seputiene et al. (2006), visto que EPEC e ETEC desenvolveram tolerância ácida, adaptando-se ao pH 4,0, após serem expostas ao pH 4,5.

Manipuladores de alimentos devem ter conhecimento a respeito do emprego dos ácidos utilizados nas indústrias alimentícias, a fim de se precaverem contra tolerância ácida de microrganismos em indústrias de alimentos. Conhecer a fisiologia dos possíveis microrganismos contaminantes, assim como o pH mínimo de crescimento dos mesmos e a utilização de métodos que impeçam a adaptação, torna-se importante. Cebria'n et al. (2010) relatam que a adição de inibidores de síntese protéica, tais como a rifampicina e o cloranfenicol, a diferentes níveis nos meios de cultura, impede completamente o desenvolvimento de resistência ao pH ácido em bactérias, sugerindo que a síntese proteica é necessária para o desenvolvimento das respostas de resistência.

3.5 Avaliação da adaptação cruzada entre os componentes majoritários

Para verificar a capacidade de EPEC e ETEC desenvolverem adaptação cruzada, inicialmente, as células foram adaptadas à concentração de 1/16 CMB dos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral, sendo esta equivalente a 0,0078%, 0,0625% e 0,0625%, respectivamente. Após adaptação, as células foram expostas a diferentes concentrações dos componentes aos quais estas não foram previamente adaptadas (Tabela 5).

Tabela 5 – Resposta de adaptação cruzada de EPEC e ETEC entre os componentes majoritários.

Estresse subletal	Concentração (1/16CMB)	Avaliação da adaptação	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica						
			0,5CMB	CMB	1,2CMB	1,4CMB	1,6CMB	1,8CMB	2CMB
EUG	0,0625%	CIN	-	-	-	-	-	-	-
EUG	0,0625%	CIT	+	+	+	+	-	-	-
CIN	0,0078%	EUG	-	-	-	-	-	-	-
CIN	0,0078%	CIT	-	-	-	-	-	-	-
CIT	0,0625%	EUG	-	-	-	-	-	-	-
CIT	0,0625%	CIN	+	+	+	+	+	+	+

Estresse subletal	Concentração (1/16CMB)	Avaliação da adaptação	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica						
			0,5CMB	CMB	1,2CMB	1,4CMB	1,6CMB	1,8CMB	2CMB
EUG	0,0625%	CIN	+	+	+	+	+	+	+
EUG	0,0625%	CIT	-	-	-	-	-	-	-
CIN	0,0078%	EUG	-	-	-	-	-	-	-
CIN	0,0078%	CIT	+	+	+	+	+	+	+
CIT	0,0625%	EUG	-	-	-	-	-	-	-
CIT	0,0625%	CIN	-	-	-	-	-	-	-

(EUG) Eugenol. (CIN) Cinamaldeído. (CIT) Citral. Os valores apresentados de (+) Houve crescimento e (-) Não houve crescimento foram obtidos através de plaqueamento. (EUG/CIN) exposta à concentração subletal de eugenol, por 6 horas, a 37 °C e cultivada, por 24 horas, a 37 °C, no CIN. Para todas as siglas seguem essa ordem.

Os resultados de adaptação cruzada entre os componentes majoritários apresentados na Tabela 5 evidenciam que EPEC apresentou capacidade de adaptação cruzada em até 1/4 a mais de citral (1,4%), após adaptação ao eugenol e de até duas vezes mais de cinamaldeído (0,25%), após exposição ao citral. Já ETEC apresentou capacidade de adaptação de até duas vezes mais de cinamaldeído (0,25%) após adaptação ao eugenol e de até duas vezes mais de citral (2%) após exposição ao cinamaldeído.

Conforme apresentado, observa-se que ambas as bactérias desenvolveram adaptação cruzada ao terpenoide citral, após serem submetidas aos fenilpropanoides eugenol e cinamaldeído. Esta adaptação a diferentes componentes pode estar relacionada com a estrutura química da molécula. Deve-se considerar também que houve adaptação cruzada das bactérias entre fenilpropanoides. De acordo com Dorman et al. (2000), as estruturas químicas dos componentes majoritários de óleos essenciais afetam seu modo de ação e a atividade antibacteriana.

Kalemba e Kunicka (2003) verificaram que a atividade antibacteriana de óleos essenciais ocorre da seguinte forma: os fenólicos são os mais ativos, seguido de aldeídos, cetonas, álcoois e, finalmente, éteres. Estudos de Velluti et al. (2003) indicam que a atividade antimicrobiana dos compostos hidroxilados dos óleos pode estar relacionada com as ligações de hidrogênio que, possivelmente, interagem com sítios ativos das enzimas bacterianas. Entretanto, o mecanismo de ação dos terpenos não é completamente esclarecido; sabe-se que está relacionado com a ruptura da membrana plasmática, devido ao caráter lipofílico (COWAN, 1999).

Os resultados no presente estudo mostram a capacidade de EPEC e ETEC crescerem em meios de cultura na presença de concentrações subletais de componentes majoritários de óleos essenciais utilizados como antimicrobianos. Esses resultados estão de acordo com os obtidos em pesquisas anteriores, em que a adaptação de *E. coli* a tensões subletais já foi demonstrada (BRAOUDAKI; HILTON, 2004; CHUNG; BANG; DRAKE, 2006; DI PASQUA et al., 2006, 2010).

Alonso-Caleja et al. (2015) verificaram a capacidade de *E.coli* ATCC 12806 em desenvolver adaptação e adaptação cruzada a três biocidas comumente utilizados em instalações de processamento de alimentos, sendo estes fosfato trissódico, nitrito de sódio ou hipoclorito de sódio e concluíram que a exposição prévia a concentrações subletais de biocidas contribuiu para o desenvolvimento de tolerância adaptativa e adaptação cruzada em *E. coli* frente ao nitrito e ao hipoclorito de sódio. Os autores complementam que bombas de

efluxo e alterações na hidrofobicidade da superfície celular parecem estar associadas ao mecanismo de adaptação da bactéria.

O fato de EPEC e ETEC tornarem-se tolerantes a antimicrobianos é uma preocupação particular porque estes são antimicrobianos que podem utilizados em concentrações subletais. Concentrações subletais de antimicrobianos podem ocorrer como consequência do uso inadequado (concentração errada ou distribuição inadequada), armazenamento inadequado das formulações ou o uso de tratamentos de preservação em baixas intensidades (CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2013). Parece possível que as instalações de processamento de alimentos possam proporcionar um ambiente seletivo para a tolerância adaptativa aos agentes antimicrobianos, o que pode, eventualmente, levar a uma situação indesejável em que existem estirpes residentes resistentes a estes agentes.

Estudos relatam que, ao serem expostas a concentrações subletais de antimicrobianos, ocorrem modificações no proteoma bacteriano. Conforme demonstrado por Siroli et al. (2015), ao serem expostas a diferentes concentrações subletais de óleos essenciais de tomilho e orégano, bem como carvacrol, timol, trans-2-hexenal e citral, as bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis* modificaram o perfil de proteínas relacionadas à biossíntese de ácidos graxos, por ter ocorrido aumento de ácidos graxos insaturados. Os mesmos autores complementam que essa mudança no perfil de ácidos graxos pode contribuir para a compreensão dos mecanismos de resposta ao estresse utilizados por diferentes microrganismos patogênicos frequentemente envolvidos em doenças transmitidas por alimentos em relação à exposição a concentrações subletais de antimicrobianos naturais.

Di Pasqua et al. (2006) também verificaram que, ao serem expostos a concentrações subletais de antimicrobianos, os microrganismos alteram o perfil proteico relacionado à composição de ácidos graxos de membrana, aumentando a concentração de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, como um mecanismo adaptativo das células na presença de uma concentração subletal de composto antimicrobiano em resposta a uma condição de estresse. Os autores adicionaram soluções metanólicas de timol, carvacrol, limoneno, cinamaldeído e eugenol ao meio de crescimento de *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Brochothrix thermosphacta* e *Staphylococcus aureus* e verificaram que a concentração de ácidos graxos insaturados aumentou mais quando as células cresceram na presença de limoneno e cinamaldeído. Em ambos os casos, o aumento líquido resultou em uma diminuição da concentração de ácido palmítico (C16) e um aumento na proporção linoleídica (C18), docosanóico (C22), e concentrações de ácido eicosapentaenoico (C20). Além disso, cinamaldeído também resultou no aumento da concentração de ácido

palmitoleico (C16). É importante destacar o aumento do ácido oleico (C18) no extrato lipídico de células de *E. coli* cultivadas na presença de concentrações subletais de eugenol.

Di Pasqua et al. (2010) verificaram alterações significativas no proteoma de *Salmonella enterica* serovar Thompson MCV, ao ser exposta a concentrações subletais de timol. Como exemplo, foi observada maior expressão das proteínas GroEL e DnaK, as quais são chaves no mecanismo de proteção ao estresse térmico.

3.6 Avaliação da adaptação cruzada entre componentes majoritários e estresse ácido e avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e componentes majoritários

Conforme apresentado na Tabela 6, EPEC e ETEC apresentaram capacidade de adaptação cruzada por crescer em pH inferior ao mínimo de crescimento (4,5). EPEC tornou-se capaz de crescer em pH 3,5 após exposta ao eugenol e pH 4,0 após exposta ao cinamaldeído e citral. Já ETEC apresentou a capacidade de crescimento a pH 2,5, após ser exposta ao eugenol; pH 3,0, após ser exposta ao cinamaldeído e pH 4,0, após exposição ao citral. Portanto, observa-se que o eugenol foi o componente majoritário ao qual as bactérias, após serem expostas, tornaram-se mais resistentes.

Tabela 6 - Avaliação do crescimento de EPEC e ETEC em diferentes pHs, após serem submetidas ao estresse subletal de componentes majoritários.

<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica								
Estresse subletal	Resistência ao fator letal (pH)							
1/16 CMB	6,0	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0
EUG (0,0625%)	+	+	+	+	+	-	-	-
CIN (0,0078%)	+	+	+	+	-	-	-	-
CIT (0,0625%)	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica								
Estresse subletal	Resistência ao fator letal (pH)							
1/16 CMB	6,0	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0
EUG (0,0625%)	+	+	+	+	+	+	+	-
CIN (0,0078%)	+	+	+	+	+	+	-	-
CIT (0,0625%)	+	+	+	+	-	-	-	-

(EUG) Eugenol. (CIN) Cinamaldeído. (CIT) Citral. Os valores apresentados de (+) houve crescimento e (-) não houve crescimento foram obtidos por meio de plaqueamento.

Resultados apresentados na Tabela 7 demonstram que EPEC apresentou adaptação cruzada apenas ao cinamaldeído, crescendo em concentrações de até duas vezes maiores (0,25%), quando exposta ao componente cinamaldeído. O mesmo ocorreu com ETEC, porém, a bactéria adaptou-se apenas até a CMB (0,125%) do componente cinamaldeído.

Tabela 7 - Avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e componentes majoritários.

<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica								
Estresse subletal	Fator letal	Resistência ao fator letal						
		0,5CMB	CMB	1,2CMB	1,4CMB	1,6CMB	1,8CMB	2CMB
pH _(MC)								
4,5	EUG	-	-	-	-	-	-	-
4,5	CIN	+	+	+	+	+	+	+
4,5	CIT	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica								
Estresse subletal	Fator letal	Resistência ao fator letal						
		0,5CMB	CMB	1,2CMB	1,4CMB	1,6CMB	1,8CMB	2CMB
pH _(MC)								
4,5	EUG	-	-	-	-	-	-	-
4,5	CIN	+	+	-	-	-	-	-
4,5	CIT	-	-	-	-	-	-	-

(EUG) Eugenol. (CIN) Cinamaldeído. (CIT) Citral. Os valores apresentados de (+) houve crescimento e (-) não houve crescimento foram obtidos por meio de plaqueamento.

Juven et al. (1994) relatam que as propriedades antibacterianas de alguns componentes de óleos essenciais são melhoradas após exposição a pH baixo. Este fato pode ter contribuído para o que ocorreu neste estudo ao considerar que houve adaptação cruzada apenas ao cinamaldeído após as bactérias serem expostas ao pH 4,5 evidenciando que o baixo pH potencializou o efeito antimicrobiano dos componentes, visto que as bactérias apresentaram maior capacidade adaptativa quando expostas inicialmente aos componentes e, depois, submetidas a diferentes valores de pH. Com base no conceito de adaptação cruzada, segundo o qual o microrganismo torna-se resistente a determinado fator de estresse após ter sido exposto a outro agente estressor, observa-se a ocorrência da indução de tolerância cruzada em *Escherichia coli* enteropatogênica e *Escherichia coli* enterotoxigênica.

Devido aos resultados de adaptação e/ou adaptação cruzada encontrados neste trabalho, serão realizadas análises proteômicas das bactérias após expostas a concentrações subletais dos componentes majoritários, no intuito de verificar as mudanças ocorridas no perfil proteico bacteriano, uma vez que a proteômica propõe um estudo mais avançado para visualizar o padrão e o nível de expressão de proteínas sob condições adversas.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho comprova-se o potencial dos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral contra EPEC e ETEC, sendo, portanto, úteis na indústria de alimentos, desde que utilizados em concentrações corretas.

EPEC apresentou capacidade adaptativa quando exposta às concentrações subletais de cinamaldeído, eugenol e citral. Já a ETEC apresentou capacidade adaptativa quando exposta às concentrações subletais de cinamaldeído e eugenol.

EPEC e ETEC foram capazes de desenvolverem tolerância ácida.

EPEC e ETEC desenvolveram adaptação cruzada entre componentes majoritários, entre componentes majoritários e estresse ácido e entre estresse ácido e o componente majoritário cinamaldeído.

Etapas futuras serão realizadas, no intuito de verificar mudanças ocorridas no perfil proteico dessas bactérias, quando expostas a condições estressantes utilizadas em indústrias de alimentos, como, por exemplo, estresse ácido e agentes antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-CALLEJA, C. et al. Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. **Food Control**, Oxford, v. 56, p. 86-94, Oct. 2015.
- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, n. 3, p. 212-219, Apr. 2008.
- BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 3, p. 1-20, 2004.
- BOULANOUAR, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 85-96, Apr. 2013.
- BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 31-37, Jan. 2005.
- CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 51, n. 1, p. 11-48, Jan. 2013.
- CEBRIAN, G. et al. Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 26-33, May 2010.
- CHUNG, H. J.; BANG, W.; DRAKE, M. A. Stress response of *Escherichia coli*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 5, p. 52-64, 2006.
- COWAN, M. M. Plant products and antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-581, Oct. 1999.
- CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: Ed. UFC, 1981. 210 p.
- DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 130, n. 1, p. 107-115, July 2010.
- 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 Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 2745-2749, 2006.
- DI PASQUA, R. et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, Bloxham, v. 10, n. 5, p. 1040-1049, Mar. 2010.

DODD, C. E. R.; SHARMAN, R. L.; BLOOMFIELD, S. F. Inimical processes: bacterial self-destruction and sub-lethal injury. **Trends in Food Science Technology**, Cambridge, v. 8, p. 238-241, 1997.

DORMAN, D. H. J. et al. In vitro evaluation of antioxidante activity of essential oils and their componentes. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 15, n. 1, p. 12-16, Mar. 2000.

DUARTE, M. C. T. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 111, p. 197-201, 2007.

GOMES NETO, N. J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and 1,8-cineole acquire no direct and cross protection in a meat-based broth. **Food Research International**, Campinas, v. 49, p. 143-146, Nov. 2012.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. et al. Natural antimicrobial compounds to preserve quality and assure safety of fresh horticultural produce. In: RAI, M.; CHIKINDAS, M. (Ed.). **Natural antimicrobials in food safety and quality**. Wallingford: M. Rai, 2011. chap. 18, p. 277-282.

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 14, n. 1, p. 1-6, Feb. 2015.

GUTIERREZ, J. et al. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, p. 91-97, 2008.

HSIAO, C. P.; SIEBERT, K. J. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 15, p. 189-201, Mar. 1999.

HUANG, D. F. et al. Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. **Microbiology**, Linfen, v. 83, n. 4, p. 357-365, July 2014.

ITA, P. S.; HUTKINS, R. W. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric, and hydrochloric acids. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 54, p. 15-19, 1991.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JUVEN, B. J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, p. 626-631, 1994.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial e antifungal properties of oil essentials. **Currenty Medicinal Chemistry**, Shipol, v. 10, p. 813-829, May 2003.

LANATA, C. F. et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, Sept. 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0072788&type=printable>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

LIN, J. et al. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 14, p. 4097-4104, July 1995.

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

LUZ, I. S. et al. Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. **Food Research International**, Campinas, v. 48, n. 2, p. 667-672, Oct. 2012.

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6th ed. Wayne, 2003. 88 p. (NCCLS Document, M7-A6).

OLIVEIRA, M. M. et al. *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, 2012.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 69, p. 1046-1055, 2006.

PEI, R. S. et al. 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, Sept. 2009.

PEÑALVER, P. et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 113, p. 1-6, 2005.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, p. 465-483, July 2005.

REZENDE, D. A. C. S. et al. Characterization of the biological potential of the essential oils from five species of medicinal plants. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 8, n. 2, p. 154-170, Jan. 2017.

SEPUTIENE, V. et al. Acid response of exponentially growing *Escherichia coli* K-12. **Microbiological Research**, Brussels, v. 161, p. 65-74, 2006.

SIROLI, L. et al. Effects of sub-lethal concentrations of *thyme* and oregano essential oils, carvacrol, *thymol*, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. **Food Chemistry**, London, v. 182, n. 1, p. 185-192, Sept. 2015.

SOUZA, A. A. et al. Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* Enterotoxigênica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 105-112, 2016.

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

TANGI, S. C. et al. Prevalence of pathogenicity island markers genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Singapore, v. 5, n. 8, p. 662-666, Aug. 2015.

TURNER, S. M. et al. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 263, p. 10-20, 2006.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VELLUTI, A. et al. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of food Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p. 145-154, Dec. 2003.

WEI, Y. et al. Mechanism of *Vibrio cholerae* autoinducer-1 biosynthesis. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 6, p. 356-365, 2011.

WENDAKOON, C. N.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, p. 280-283, 1995.