



JÉSSICA MIKAELLY PEREIRA SANTOS

**ADAPTAÇÃO E ADAPTAÇÃO CRUZADA DE *Listeria* spp. A
ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES E AO
ESTRESSE ÁCIDO**

LAVRAS – MG

2018

JÉSSICA MIKAELLY PEREIRA SANTOS

**ADAPTAÇÃO E ADAPTAÇÃO CRUZADA DE *Listeria* spp. A ÓLEOS ESSENCIAIS
DE PLANTAS CONDIMENTARES E AO ESTRESSE ÁCIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Orientadora

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Coorientadora

LAVRAS – MG

2018

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

Santos, Jéssica Mikaelly Pereira.

Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria* spp. a óleos essenciais de plantas condimentares e ao estresse ácido/ Jéssica Mikaelly Pereira Santos. - 2018.

56p.

Orientadora: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Coorientadora: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Listeria* spp.. 2. Adaptação cruzada. 3. Antimicrobiano natural.
I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. III.
Título.

JÉSSICA MIKAELLY PEREIRA SANTOS

**ADAPTAÇÃO E ADAPTAÇÃO CRUZADA DE *Listeria* spp. A ÓLEOS ESSENCIAIS
DE PLANTAS CONDIMENTARES E AO ESTRESSE ÁCIDO**

**ADAPTATION AND CROSS ADAPTATION OF *Listeria* spp. TO ESSENTIAL OILS
OF CONDIMENTARY PLANTS AND TO ACID STRESS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Mediciniais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2018.

Dra. Monique Suela da Silva UFLA

Dra. Aline Pereira Martins

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Orientadora

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Coorientadora

LAVRAS – MG

2018

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria Lúcia Pereira dos Santos, e ao meu esposo, José Luís Patrício da Silva Júnior, por todo amor e carinho a mim concedidos durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me iluminar e dar forças para concluir esta jornada.

Ao meu esposo, por entender minha ausência, me apoiar na realização deste sonho e me fornecer todo o apoio necessário, principalmente nos momentos difíceis.

À minha mãe, por sempre me incetivar e acreditar na minha capacidade, mesmo quando às vezes nem eu mesma acredite.

À minha orientadora, professora Roberta, pela orientação, paciência, disponibilidade e aprendizado. Fico muito feliz por ter o prazer de ser orientada por uma excelente profissional e ótima pessoa.

A minha cunhada, Ana Luísa, pela companhia, amizade e me escutar nas horas em que eu mais precisei.

A minha sogra, Heloísa, e ao meu sogro, José Luís, pela amizade e ótimos conselhos.

Aos membros da banca, pela valiosa colaboração com este trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA (UFLA), pelo agradável convívio durante esse tempo e a todos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e condimentares, pela convivência e conhecimentos compartilhados.

A Michelle, Heloísa, Letícia, Monique, Jorge, Juliana, Wanderley, Angélica e Mariana pela ajuda na condução dos experimentos.

A Michelle por toda ajuda e disponibilidade em toda a condução do experimento.

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

As minhas amiga e companheiras de república Ana Catarina, Leticia, Nathalle, Gleyca, Ana, Isabelly, Mariana e Nayara, pela amizade, companheirismo e apoio sempre que necessário.

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

A minha coorientadora Suzan, pelos ensinamentos e sugestões durante esta jornada.

Ao coordenador do programa José Eduardo, pela oportunidade e esclarecimento de dúvidas sempre que necessário.

A Eliane, pela amizade, ensinamentos e disponibilidade.

A Anette, Dico, Diúlia e Paulo, pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos meus colegas de trabalho, pela compreensão de troca de horário.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação Plantas Medicinais, Aromática e Condimentares (PPGPMAC), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Aos professores do PPGPMAC, 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.

“Sucesso não é o final, fracasso não é fatal: é a coragem para continuar que conta.” (Winston Churchill)

RESUMO

Listeria monocytogenes é uma bactéria veiculada por alimentos que apresenta elevada patogenicidade, causando a listeriose, doença grave que pode levar a óbito. Essa bactéria é considerada persistente em ambientes de processamento, apresentando resistência a vários agentes sanitizantes empregados na indústria de alimentos, em decorrência, principalmente, do uso incorreto desses agentes, como concentrações subinibitórias. Buscando alternativas substâncias naturais têm sido sugeridas destacando-se os óleos essenciais, em razão de seus múltiplos alvos nas células bacterianas. Os óleos essenciais de orégano, tomilho e noz-moscada têm demonstrado atividade antimicrobiana e amplo espectro de ação contra patógenos alimentares. Entretanto, pouco se sabe a respeito das respostas fisiológicas das bactérias quando expostas a concentrações subletais dos óleos essenciais, o que leva à necessidade de se avaliar mais de uma cepa bacteriana. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a capacidade de adaptação e adaptação cruzada de *L. monocytogenes* e *L. innocua* aos óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada e ao estresse ácido. As concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais foram determinadas empregando-se a técnica de microdiluição, as concentrações testadas foram 4; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1 e 0,05%. Para determinar o pH mínimo inibitório e pH mínimo de crescimento utilizou-se ácido láctico ajustando o pH 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0 e 2,5; e incubaram-se os microrganismos a 37 °C/24 horas. Após incubação, alíquotas de 10 µL das culturas foram plaqueadas em TSA+YE (ágar tripton de soja acrescido de 0,5% de extrato de levedura) e incubadas, a 37 °C/24 horas. A capacidade adaptativa das cepas aos óleos essenciais e ao estresse ácido, bem como a adaptação cruzada entre os óleos essenciais e ao pH, foi avaliada por pré-exposição das culturas de *L. monocytogenes* e *L. innocua* por 6 h a concentrações de 1/4 e 1/8 das CMB dos óleos essenciais e ao pH mínimo de crescimento. Após a adaptação, as células recuperadas foram cultivadas em presença dos óleos essenciais (CMB/2; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2CMB) a 37°C/24h. Após a incubação, alíquotas de 10 µL das culturas foram plaqueadas em TSA+YE e incubadas a 37°C/24h. O pH mínimo inibitório e o mínimo de crescimento foram de 4,0 e 4,5, respectivamente, para ambas as cepas utilizadas. As CMB dos óleos essenciais para ambas as cepas foram de 0,1%, para o tomilho e orégano e 0,2% para a noz-moscada. Foi observada a adaptação e adaptação cruzada de *L. monocytogenes* e *L. innocua* aos óleos essenciais estudados e ao estresse ácido. A capacidade da adaptação e adaptação cruzada de ambas as cepas de *Listeria* mostram que os óleos essenciais devem ser usados com cautela, uma vez que, assim como os antimicrobianos já conhecidos e utilizados no mercado também induzem ao aumento da tolerância fisiológica das células a condições de estresse.

Palavras-chave: *L. monocytogenes*. *L. innocua*. Antimicrobianos naturais.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is the species of pathogenic bacteria that causes the infection listeriosis, which can lead to death. This bacteria is considered persistent in processing environments, presenting resistance to several sanitizing agents used in the food industry, mainly due to the use of these agents in sub-inhibitory concentrations. Looking for alternatives, natural substances such as the essential oils have been suggested due to their multiple targets in bacterial cells. Several essential oils have high antimicrobial activity and broad spectrum of action against foodborne pathogens. However, little is known about the physiological responses of bacteria when exposed to sublethal concentrations of essential oils, which leads to the need to evaluate more than one bacterial strain. The objective of this work was to evaluate the adaptive and cross adaptive capacity of *L. monocytogenes* and *L. innocua* to the essential oils of thyme, oregano and nutmeg and to acid stress. The minimum bactericidal concentrations (MBC) of the essential oils were determined using the microdilution technique. The tested concentrations were 4; 2; 1; 0.5; 0.2; 0.1 and 0.05. To determine the minimum inhibitory pH and minimum growth pH, lactic acid was used for adjusting pH to 6.0; 5.5; 5.0; 4.5; 4.0; 3.5; 3.0 and 2.5. The microorganisms were incubated at 37 °C for 24 hours. After incubation, aliquots of the cultures were plated and incubated at 37 °C for 24 hours. The adaptive capacity of the strains to essential oils and the acid stress, as well as their cross-adaptation between the essential oils and acid stress, were evaluated by exposing the cultures of *L. monocytogenes* and *L. innocua* for 6h at concentrations of 1/4 and 1 / 8 of the CMB of the essential oils and minimum growth pH. Cells recovered by discarding the supernatant were cultured in the presence of the essential oils (CMB / 2; CMB; 1.2CMB; 1.4CMB; 1.6CMB; 1.8CMB and 2CMB). The minimum inhibitory pH and minimum growth were 4.0 and 4.5, respectively, for both strains used. The CMBs of the essential oils for both strains were 0.1% for thyme and oregano and 0.2% for nutmeg. The adaptation and cross-adaptation of *L. monocytogenes* and *L. innocua* to the essential oils and acid stress was observed. Although it is a viable alternative to antimicrobials commonly used in industry, essential oils should be used in adequate concentrations.

Keywords: *L. monocytogenes*. *L. innocua*. Natural antimicrobials.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Ciclo de vida intracelular de <i>L. monocytogenes</i>	19
Figura 2 - Fórmula estrutural dos principais componentes dos OEs.	25
Figura 3 - Ciclo biossintético de metabólitos secundários em plantas.	26
Figura 4 - Modos de ação dos óleos essenciais sobre células bacterianas.	29

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Algumas características diferenciais das espécies de <i>Listeria</i>	15
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Composição dos óleos essenciais utilizados.....	40
Tabela 2 - Ensaio da avaliação da resposta de adaptação cruzada de culturas de <i>L. innocua</i> e <i>L. monocytogenes</i>	44
Tabela 3 - Adaptação de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. innocua</i> a óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada.....	46
Tabela 4 - Avaliação de crescimento de <i>L. innocua</i> e <i>L. monocytogenes</i> em diferentes pH, após exposição ao estresse ácido.	47
Tabela 5 - Resposta de adaptação cruzada de <i>Listeria innocua</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> entre os óleos essenciais.	49
Tabela 6 - Crescimento de <i>L. innocua</i> e <i>L. monocytogenes</i> em meio de cultivo com diferentes pH, após adaptação a concentrações subletais (1/8 CMB) de óleos essenciais.	51
Tabela 7 - Avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e óleos essenciais.....	51

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	<i>Listeria</i> spp.....	15
2.2	<i>Listeria monocytogenes</i> e fatores de colonização	17
2.3	Resposta bacteriana ao estresse.....	19
2.4	Tolerância ao estresse ácido	20
2.5	Adaptação e adaptação cruzada de bactérias a condições subletais	22
2.6	Óleo essencial.....	24
2.6.1	Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>).....	26
2.6.2	Noz-moscada (<i>Myristica fragrans</i>)	27
2.6.3	Orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.).....	27
2.7	Óleo essencial e atividade antimicrobiana	28
	REFERÊNCIAS.....	31
	CAPÍTULO 2 ADAPTAÇÃO E ADAPTAÇÃO CRUZADA DE <i>LISTERIA</i> SPP. A ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES E AO ESTRESSE ÁCIDO	38
1	INTRODUÇÃO.....	38
2	MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1	Local de condução do experimento	40
2.2	Óleo essencial.....	40
2.3	Microrganismo e cultura estoque	40
2.4	Preparo e padronização do inóculo	41
2.5	Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais sobre a <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. innocua</i>	41
2.6	Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório sobre <i>Listeria</i> spp.....	41
2.7	Adaptação aos óleos essenciais.....	42
2.8	Adaptação ao estresse ácido	42
2.9	Resposta adaptativa aos óleos essenciais.....	43
2.10	Resposta de tolerância ácida	43
2.11	Avaliação da adaptação cruzada entre os óleos essenciais	43
2.11.1	Avaliação da adaptação cruzada entre os óleos essenciais e o estresse ácido	44
2.11.2	Avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e óleos essenciais.....	44
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1	Concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais.....	45
3.2	Determinação do pH mínimo inibitório e mínimo de crescimento.....	45
3.3	Adaptação de <i>L. innocua</i> e <i>L. monocytogenes</i> aos óleos essenciais de plantas condimentares	46
3.4	Resposta à tolerância ácida	47
3.5	Avaliação da adaptação cruzada entre os óleos essenciais	48
3.6	Avaliação da adaptação cruzada entre os óleos essenciais e estresse ácido e entre estresse ácido e óleos essenciais.....	50
4	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS.....	54

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogênica, associada a vários surtos de toxinfecções alimentares. É capaz de sobreviver e se desenvolver em condições ambientais hostis como temperaturas de refrigeração, pH ácido e altas concentrações de cloreto de sódio. Portanto, tem habilidade de superar as barreiras de segurança e preservação de alimentos, o que o transforma em importante patógeno de origem alimentar. Sendo as maiores incidências encontradas nos produtos lácteos, cárneos, aves e frutos do mar (FARBER; PETERKIN, 1991; JAWETZ et al., 2012; TENENHAUS et al., 2014).

Listeria innocua, por outro lado, apesar de pertencer ao mesmo gênero que *L. monocytogenes* não é patogênica. No entanto, ambas as bactérias são encontradas geralmente nos mesmos alimentos e ambientes. Alguns estudos têm utilizado *L. innocua* em detrimento a *L. monocytogenes*, pois apresentam semelhança ecológica, bioquímica e genética o que proporciona respostas semelhantes aos tratamentos físico-químicos. Apesar disso, *L. innocua* não causa a listeriose, patologia que pode levar a quadros clínicos de septicemia, encefalite, abortos, meningite e pode levar o paciente a óbito (CHEN et al., 2010; CRUZ et al., 2008; MOURA, 2011).

A capacidade de adaptação das células microbianas a condições ambientais inóspitas gera repostas fisiológicas relacionadas diretamente a sua sobrevivência e crescimento. O mecanismo de adaptação ao estresse causado por altas e baixas temperaturas, conservantes, agentes sanitizantes, condições ácidas e altas concentrações de açúcares e sal já foram relatados para vários microrganismos, como *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus subtilis* (FIROUZI et al., 2007; GONÇALVES, 2017).

Em se tratando de *L. monocytogenes*, a capacidade de adaptação a condições estressantes, persistência em ambientes de processamento e resistência a agentes antimicrobianos é cada vez mais preocupante, pois a listeriose, apesar de apresentar baixa taxa de morbidade, apresenta alta de mortalidade, e representa grande risco para indivíduos imunodeprimidos, gestantes, idosos e recém-nascidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2013).

Os óleos essenciais, produtos originários do metabolismo secundários de plantas aromáticas, têm se destacado como importante agente antimicrobiano para uso na indústria de alimentos; tanto como conservante, quanto como agente sanitizante. Tendo estudos utilizando

os óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada demonstrando ação antimicrobiana promissoras. Um grande apelo para a utilização desses óleos vem de trabalhos que mostram que, em razão de sua complexidade, possuem vários alvos de ação sobre as células microbianas (CARVALHO et al., 2015; FIROUZI et al., 2007; GARCÍA-DÍEZ et al., 2017; NAZZARO et al., 2013).

Além disso, bactérias de importância na indústria de alimentos não apresentam mudanças significativas em sua sensibilidade a outros antimicrobianos, processos físicos ou outros fatores estressantes (expostas a concentrações subletais de óleos essenciais ou a seus compostos majoritários) (SOUZA, 2016).

Entretanto, há relatos da capacidade das bactérias em se adaptarem ou desenvolverem adaptação ou adaptação cruzada tanto ao estresse ácido, quanto aos óleos essenciais e seus compostos majoritários (GONÇALVES, 2017; HADDAD FILHO, 2014). Tendo *L. monocytogenes* demonstrado adaptação ao carvacrol e ao eugenol e óleo essencial de gengibre (HADDAD FILHO, 2014; SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015).

Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a capacidade de *L. monocytogenes* e *L. innocua* se adaptarem aos óleos essenciais de tomilho, orégano, noz- moscada e ao estresse ácido, e desenvolver adaptação cruzada entre os óleos essenciais e ao estresse ácido, quando expostos a concentrações subletais dos óleos essenciais e ao estresse ácido.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Listeria* spp.

O gênero *Listeria* é subdividido nas espécies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. rocourtiae*, *L. marthii*, *L. denitrificans*, *L. murrayi*, *L. fleischmannii* e *L. weihenstephanensis*. Duas das espécies são patogênicas, causando listeriose. A primeira é *L. monocytogenes* que está ligada a infecções em humanos, e a segunda *L. ivanovii* que é patogênica para animais e raramente associada a humanos (GERMANO; GERMANO, 2015; JOHNSON et al., 2004).

Microrganismos do gênero *Listeria* são bastonetes Gram-positivo curtos, medem 0,5 a 2,0 µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro; anaeróbico facultativo; psicotróficos; móvel a temperatura ambiente; não formador de esporos; não formador de cápsulas. Essa bactéria pode multiplicar-se em ampla faixa de pH (4.3 – 9.6) e tolera concentrações salinas elevadas ($\geq 10\%$). Além disso, produz ácido utilizando vários tipos de carboidratos (GERMANO; GERMANO, 2015).

Na microbiologia de alimentos, duas espécies se destacam: *L. monocytogenes* e *L. innocua*, sendo essa última usada como modelo para estudos que se remetem a *L. monocytogenes*, pois não apresenta patogenicidade. Na tabela 1, encontram-se algumas diferenças entre *L. innocua* e *L. monocytogenes* (MOURA, 2011).

Tabela 1 - Algumas características diferenciais das espécies de *Listeria*.

Espécies	Xilose	Lactose	Galactose	Ramnose	Manitol	Hidrolise hipurato	Teste CAMP		Beta Hemólise	Mol% G+C	Serotipos
							S.aureus	R.equi			
<i>L.monocytogenes</i>	-	V	V	+	-	+	+	+	+	37-39	*
<i>L.innocua</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	+	36-38	4ab,6a,6b

Nota: v-variável

*1/2a, b, c; 3a, b, c; 4a, ab, b, c, d, e; "7."

Fonte: Moura (2011).

Os sorotipos de *Listeria* são designados com base na imunorreatividade de duas estruturas de superfície celular, os antígenos O e H. São reconhecidos doze sorotipos de *L. monocytogenes* (1 / 2a, 1 / 2b, 1 / 2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e e 7), três dos quais (1/2a,

1/2b e 4b) causam a maior parte (95%) da doença humana, onde o sorotipo 4b é mais comumente associado a surtos de toxinfecções alimentares (CDC, 2016).

Listeria innocua é representada por dois sorotipos (6a/6b) e, é de particular importância pois está estreitamente relacionada com *L. monocytogenes*, ambas as espécies são geralmente encontradas nos mesmos alimentos, em diversos ambientes e em amostras clínicas (MOURA, 2011).

Desde 1926, *L. monocytogenes* é reconhecida como microrganismo patogênico de animais. No entanto, somente em 1980 recebeu maior atenção em saúde pública, quando os alimentos foram considerados importantes na cadeia de transmissão da infecção ao homem. É uma bactéria patogênica oportunista, capaz de sobreviver e multiplicar-se fora do organismo do hospedeiro. No hospedeiro multiplica-se intracelularmente, podendo se proliferar dentro de macrófagos, células epiteliais e hepatócitos; tem capacidade de evitar a resposta do sistema imune humoral, já que o mesmo se multiplica dentro da célula hospedeira, e não passa pela da resposta imune celular, por disseminar-se por meio da passagem célula-células (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Sabe-se também que alterações fisiológicas podem ser induzidas em cepas de *L. monocytogenes*, como resposta a alterações ambientais, e que estas podem resultar de pré-adaptação do microrganismo ao hospedeiro, tornando-o mais capaz de expressar sua virulência e causar infecção (CRUZ et al., 2008).

A listeriose acomete principalmente idosos, gestantes e pessoas imunocomprometidas. As apresentações ou quadros clínicos mais comuns são infecções invasivas, como sepsis, meningite e meningoencefalite. Os infectados também podem apresentar infecções focais, incluindo artrite séptica, osteomielite, infecções por prótese protéica e infecções de locais dentro do tórax e abdômen ou da pele e olho. A listeriose em gestante é doença relativamente leve, podendo apresentar sintomas de gripe. Algumas mulheres grávidas com infecção por *Listeria* não apresentam sintomas. Embora a doença grave na gestante seja rara, a infecção durante a gravidez pode resultar em aborto espontâneo, natimorto, parto prematuro e sepse ou meningite no recém-nascido. Menos comum, mas jovens saudáveis também podem desenvolver listeriose (CDC, 2016).

A relevância da listeriose em saúde pública é decorrente da gravidade da manifestação clínica, resultante do sistema nervoso central e pelo fato de acometer as gestantes, resultando em graves consequências. Essa patologia no Brasil, no entanto, é pouco relatada. Tal fato pode estar ligado ao elevado nível de subnotificação de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) ou dificuldades nos diagnósticos. Contudo, no Rio Grande do Sul em 2003, 34% das

148 amostras provenientes de material originário de abortos continham a bactéria (GERMANO; GERMANO, 2015).

Estudos realizados no Brasil isolaram *L. monocytogenes* de produtos cárneos, vegetais prontos para consumo, queijo, leite cru e pasteurizado (MOURA; DESTRO; FRANCO, 1993; NERO et al., 2008; RISTORI et al., 2014; SANT'ANA; FRANCO; SCHAFFNER, 2014). Entretanto, a legislação brasileira, apenas se refere a proibição da presença de *L. monocytogenes* em queijos de alta e muita alta umidade (BRASIL, 2001).

2.2 *Listeria monocytogenes* e fatores de colonização

Os alimentos contaminados são as maiores fontes de veiculação de *L. monocytogenes* tanto nos surtos como nos casos esporádicos de listeriose, o trato gastrointestinal (TGI) é a principal porta de entrada do patógeno e foco de colonização. A fim de colonizar o TGI, a bactéria deve sobreviver às condições adversas como a acidez estomacal, a alta osmolaridade e a presença de sais biliares no intestino delgado. Vários fatores influenciam o sucesso da colonização por *L. monocytogenes* no hospedeiro: presença de células natural killers e linfócitos T do sistema imune intestinal, integridade do epitélio intestinal, carga microbiana presente no alimento contaminado e grau de virulência das cepas (CRUZ et al., 2008; GAHAN; HILL, 2014).

Listeria monocytogenes pode causar duas formas clínicas de listeriose: infecção invasiva localizada ou sistêmica e infecção não invasiva limitada ao trato gastrointestinal (CRUZ et al., 2008).

A listeriose não invasiva é frequentemente associada a gastroenterite febril e às vezes com formas cutâneas, como observado em cirurgiões veterinários que entram em contato direto com fetos abortados de gado. A doença geralmente é transmitida verticalmente durante a gravidez ou adquirida pelo consumo de alimentos contaminados, particularmente produtos frescos e prontos para consumo que não são aquecidos antes do consumo (ARIZA-MIGUEL et al., 2015; CRUZ et al., 2008).

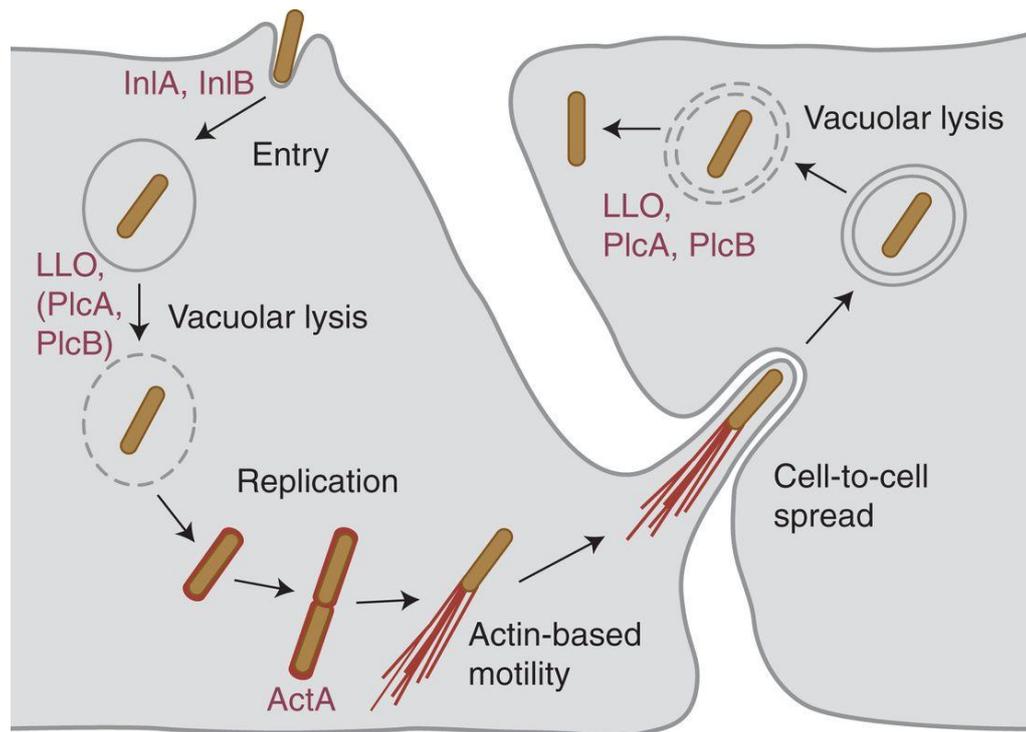
A listeriose pode apresentar três quadros clínicos. Sendo esses quadros: listeriose maternofetal ou neonatal, infecção por meio da corrente sanguínea e meningoencefalite em indivíduos imunodeprimidos. A listeriose também pode apresentar-se como infecção focal, como resultado de propagação hematogênica. Infecções focais envolvem articulações do peritônio, endocárdio ou olhos. A dose infectante na listeriose invasiva não é conhecida, mas pode ser baixa, menos de 1000 células, em indivíduos susceptíveis. O esclarecimento da

epidemiologia da listeriose é de difícil entendimento, em decorrência do período de incubação prolongado da doença que, geralmente, ultrapassam 30 dias (GONÇALVES et al., 2016; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

A listeriose não invasiva está limitada ao intestino e pode levar ao quadro de gastroenterite, cujos sintomas comuns incluem febre, diarreia aquosa, náusea, dor de cabeça e dor articular e muscular. A doença ocorre geralmente 24 horas após a ingestão de grande quantidade de células da bactéria, mais de 100 UFC.g⁻¹ de alimento, e pode durar 2 semanas (CRUZ et al., 2008)

O esquema, na Figura 1, mostra o ciclo intracelular da *L. monocytogenes*, onde esta liga-se a células hospedeiras epiteliais e promove a sua absorção em um processo mediado pelas proteínas de superfície bacteriana InlA e InlB. A toxina formadora de poros secretada LLO (juntamente com as fosfolipases bacterianas PlcA e PlcB, dependendo do tipo de célula) promove a ruptura vacuolar e a fuga bacteriana para o citoplasma, onde *L. monocytogenes* pode replicar de forma eficiente. A expressão superficial da ActA permite que as bactérias intracelulares polimerizem a actina das células hospedeiras e gerem caudas em forma de cometa que propulsionam *L. monocytogenes* pelo citoplasma, por meio propulsões de membrana as células microbianasvão para células vizinhas. Então, as bactérias se localizam em vacúolos de membrana dupla, que podem ser lisadas por LLO, PlcA e PlcB para iniciar um novo ciclo de infecção (PIZARRO-CERDÁ; KÜHBACHER; COSSART, 2012).

Figura 1 - Ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*.



Fonte: Pizarro-Cerdá, Kühbacher e Cossart (2012).

O tratamento de primeira escolha para a listeriose humana é a combinação de ampicilina a um aminoglicosídeo e o de segunda escolha, são cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e rifampicina. Portanto, cepas clínicas resistentes a cloranfenicol, eritromicina, streptomomicina, tetraciclina, vancomicina e trimetoprim já foram descritos por Reis et al. (2011).

2.3 Resposta bacteriana ao estresse

As bactérias podem ser mortas por vários agentes estressores. No entanto, quando expostas a doses subletais desses agentes, são capazes de provocar tolerância (DODD; RICHARDS; ALDSWORTH, 2007; ZHAO; DRLICA, 2014).

Os processos de estresse ambiental e de preservação de alimentos, por exemplo, aquecimento, arrefecimento, acidez e alcalinidade, são conhecidos por induzir respostas adaptativas dentro da célula bacteriana. Os microrganismos que sobrevivem a determinado estresse, muitas vezes, ganham resistência a essa condição ou a outros fatores, por meio de proteção cruzada. O estado fisiológico de uma bactéria é uma consideração fundamental ao estudar sua resposta às técnicas de preservação de alimentos (WESCHE et al., 2009).

Entende-se como tolerância, a capacidade, seja herdada ou não, dos microrganismos sobreviverem à exposição transientes de altas concentrações de um antibiótico sem alteração na CMI (concentração mínima inibitória), o que, muitas vezes, é obtido por meio da desaceleração de um processo bacteriano essencial. Enquanto resistência é usado para descrever a capacidade hereditária dos microrganismos crescerem em altas concentrações de um antibiótico, independentemente da duração de tratamento e é quantificada pela CMI do antibiótico particular (BRAUNER et al., 2016).

A capacidade de detectar e responder às mudanças circundantes é crucial para os agentes patogênicos bacterianos sobreviverem ou crescerem em ambientes em mudança. Para isso, as células desenvolveram mecanismos sofisticados projetados para proteger-se contra estressores ou reparar danos causados por eles. Podem ocorrer desafios durante a produção de alimentos quando submetidos ao processamento e após a ingestão de alimentos quando confrontados com barreiras defensivas do hospedeiro. Algumas bactérias patogênicas mostraram a capacidade de desenvolver resistência estável contra condições extremas dentro de um contexto genômico definido e um número limitado de gerações. Por outro lado, as bactérias também podem responder a condições adversas de forma transitória, por meio das chamadas respostas de tolerância ao estresse. As respostas de tolerância ao estresse bacteriano incluem modificações estruturais e fisiológicas na célula e são mediadas por máquinas reguladoras genéticas complexas. Os principais aspectos da resposta adaptativa são os mecanismos de detecção, a caracterização de sistemas defensivos celulares, como a operação de proteínas reguladoras (por exemplo, RpoS), a indução de sistemas homeostáticos e de reparação, a síntese de proteínas de resposta a choque e as modificações de células membranas, particularmente na sua composição de ácidos graxos e propriedades físicas (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015).

2.4 Tolerância ao estresse ácido

A acidez, muitas vezes, evita a colonização microbiana indesejável tanto em alimentos quanto em condições gástricas. Por isso, a acidificação dos alimentos é utilizada na indústria pois é um fator importante na conservação destes (MONTORO et al., 2018). No entanto, os microrganismos são capazes de se adaptarem ao pH ácido quando expostos, previamente, a condições subletais (POIMENIDOU et al., 2016).

Listeria monocytogenes tem demonstrado tolerância aos ácidos orgânicos usados como conservantes, desinfetantes na indústria de alimentos e também aos ácidos inorgânicos

encontrados no trato gastrointestinal de hospedeiros (SONI; NANNAPANENI; TASARA, 2011).

Os genes que codificam proteínas com importância na resposta ao estresse ácido, virulência, regulação transcricional, metabolismo de carboidratos e transporte, afetam também a motilidade e quimiotaxia no gênero *Listeria* spp. (RAENGPRADUB; WIEDMANN; BOOR, 2008). A indução de desidrogenases, redutases e enzimas respiratórias foram também associadas ao estresse ácido, como mecanismo adaptativo ao estresse que envolve o efluxo de prótons (CACACE et al., 2010).

Cepas de *L. monocytogenes* expostas a pH subletal (pH 5,5) demonstraram-se tolerantes a baixo pH, sendo capazes de crescerem em pH 3,5. Houve viabilidade em pH de 3,5 apenas naquelas expostas a pH anterior de 5,5, tendo sido induzida, nessas células, a resposta de tolerância ácida (MASTRONICOLIS et al., 2010; NAJJAR; CHIKINDAS; MONTVILLE, 2009).

Quando expostas a estresse ácido, células de *L. monocytogenes* alteraram sua fluidez de membrana e incorporaram mais ácidos graxos de cadeia linear e menos ácidos graxos de cadeia ramificada em sua bicamada lipídica, o oposto acontecendo quando foram submetidas a condições alcalinas. Quando expostas à acidez, tornaram-se, fenotipicamente, ATR (+) e tiveram aumento de sua resistência ao calor relativo às células que não foram previamente expostas à acidez (MASTRONICOLIS et al., 2010; NAJJAR; CHIKINDAS; MONTVILLE, 2009).

O gene *lmo0038* está envolvido no crescimento de *L. monocytogenes* em situações de estresse, como em ambientes com acidez ou calor. Estudo feito por Chen et al. (2009) comprovou que o gene *lmo0038* é específico de *L. monocytogenes* linhagens I e II e *L. ivanovii*, que são patogênicas, sendo ausentes em *L. monocytogenes* linhagem III a qual, raramente, está associada a infecções nos seres humano.

O fator alternativo sigma B é uma proteína que contribui para a transcrição de genes de resposta ao estresse e de virulência em diversas espécies bacterianas Gram-positivas. Em *L. monocytogenes* 168 genes foram regulados positivamente pelo fator Sigma B. Já em *L. innocua* 64 genes foram regulados positivamente por fator alternativo Sigma B. Tendo essa proteína contribuído para a sobrevivência ao estresse ácido em células na fase logarítmica para ambas as espécies, mas para a sobrevivência em células na fase estacionária apenas para *L. monocytogenes*. O fator Sigma B é responsável por controlar genes que codificam proteínas com importância na resposta ao estresse, virulência, regulação transcricional, metabolismo de carboidratos e transporte; afeta a motilidade e quimiotaxia em ambas as cepas. As regulações

de *L. monocytogenes* e *L. innocua* por fator alternativo Sigma B mostram um conjunto comum de pelo menos 49 genes em ambas as espécies (RAENGPRADUB; WIEDMANN; BOOR, 2008).

Komora et al. (2017) mostraram que cepas de *L. monocytogenes* expostas ao estresse ácido apresentaram tolerância aumentada à antibióticos mostrando adaptação à acidez e adaptação cruzada aos antimicrobianos aos quais foram submetidas.

Durante a infecção do hospedeiro, o patógeno transmitido por alimentos *L. monocytogenes* deve sentir e responder a condições ambientais em rápida mudança. Dois reguladores transcricionais, o fator sigma alternativo B e o Fator Regulador Positivo A (PrfA), são contribuintes fundamentais para as respostas transcriptômicas que permitem a sobrevivência bacteriana no trato gastrointestinal do hospedeiro e a invasão de células duodenais hospedeiras. Sendo possível a contaminação dos hospedeiros por meio da ingestão de alimentos contaminados (GULDIMANN et al., 2017).

2.5 Adaptação e adaptação cruzada de bactérias a condições subletais

A utilização inadequada dos agentes antimicrobianos vem se tornando problema de segurança alimentar e saúde pública. Os fatores que contribuíram para a evolução da resistência antimicrobiana incluem adaptação microbiana, por meio de pressões seletivas, o uso inapropriado e excessivo de antimicrobianos, e escassez de novos antimicrobianos. Além disso, estudos realizados com doses subletais de óleos essenciais, antibióticos, ácidos e desinfetantes vêm demonstrando a adaptação dos microrganismos a esses agentes também (HWANG; GUMS, 2016; MACHADO et al., 2010).

Os mecanismos de adaptação tornam as bactérias capazes de suportarem ambientes hostis. 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; GUMS, 2016; SMIGIC et al., 2009). A tolerância ao estresse em *L. monocytogenes* ser explicada parcialmente pela presença da resposta gerada por transcrição de genes para fornecer funções homeostáticas e protetoras para lidar com o estresse (GAHAN; HILL, 2014).

Em trabalho realizado por Gonçalves (2017), as CMB de cinamaldeído, eugenol e citral contra *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) foram de 0,125%, 1,0% e 1,0%, respectivamente, tanto para EPEC quanto para ETEC. No entanto, quanto expostas a doses subletais de CMB 1/8 de cinamaldeino e eugenol a CMB para o

eugenol dobrou e do cinamaldeído foi oito vezes maior, mostrando a capacidade de adaptação das cepas.

Listeria spp. obtidas de ambientes de processamento de alimentos vêm demonstrando adaptação a agentes antimicrobianos. Kovacevic et al. (2016) verificaram a adaptação de *Listeria* spp. a ciprofloxacino. Após adaptação à concentração necessária do antibiótico para combater os isolados adaptados dobrou, passando de 2 µg.mL⁻¹ para 4 µg.mL⁻¹.

Outro estudo demonstrou a capacidade do OE de gengibre combater *L. monocytogenes*, o qual apresentou concentração mínima inibitória (CMI) de 3,12% sobre o crescimento de *L. monocytogenes*. E quando exposta à concentração subletal 0,78% (CMI/4) do óleo essencial de gengibre, houve crescimento de *L. monocytogenes*. Dessa forma, detectando a adaptação da bactéria (HADDAD FILHO, 2014). *L. monocytogenes* também se mostrou capaz de desenvolver adaptação e adaptação cruzada aos componentes majoritários carvacrol e eugenol (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015).

Entretanto, relatos da não adaptação ou adaptação cruzada de bactérias a concentrações subletais de constituintes majoritários de óleos essenciais também já foram registrados. Luz et al. (2012) não observaram adaptação ou adaptação cruzada de *L. monocytogenes* ATCC 7644, após sua exposição a concentrações subletais de óleos essenciais de orégano e carvacrol à elevada temperatura, ácido láctico ou NaCl. O mesmo ocorreu em estudo realizado com *Pseudomonas aeruginosa* que, após ser submetida a estresse subletal ao essencial de *Rosmarinus officinalis* e 1,8 cineol, não apresentou adaptação ou adaptação cruzada aos mesmos estressores estudados por Gomes Neto et al. (2012) e Luz et al. (2012).

Resistência cruzada pode ocorrer quando diferentes agentes antimicrobianos atacam o mesmo alvo na célula, atingem rota comum de acesso aos respectivos alvos ou iniciam via comum para a morte celular, ou seja, o mecanismo de resistência é o mesmo para mais de um agente antibacteriano. Já a corresponsabilidade ocorre quando os genes que especificam fenótipos resistentes estão localizados juntos em plasmídeo ou em outro elemento genético móvel, como *transposon* ou *integron*, sendo assim, mais de um mecanismo de resistência estão envolvidos na determinação da resistência aos antibacterianos (CHAPMAN, 2003).

Essas controvérsias encontradas na literatura, levam ao questionamento da não ocorrência da adaptação e adaptação cruzada das bactérias a concentrações subletais de óleos essenciais ou seus componentes majoritários, necessitando-se assim de mais estudos na área.

2.6 Óleo essencial

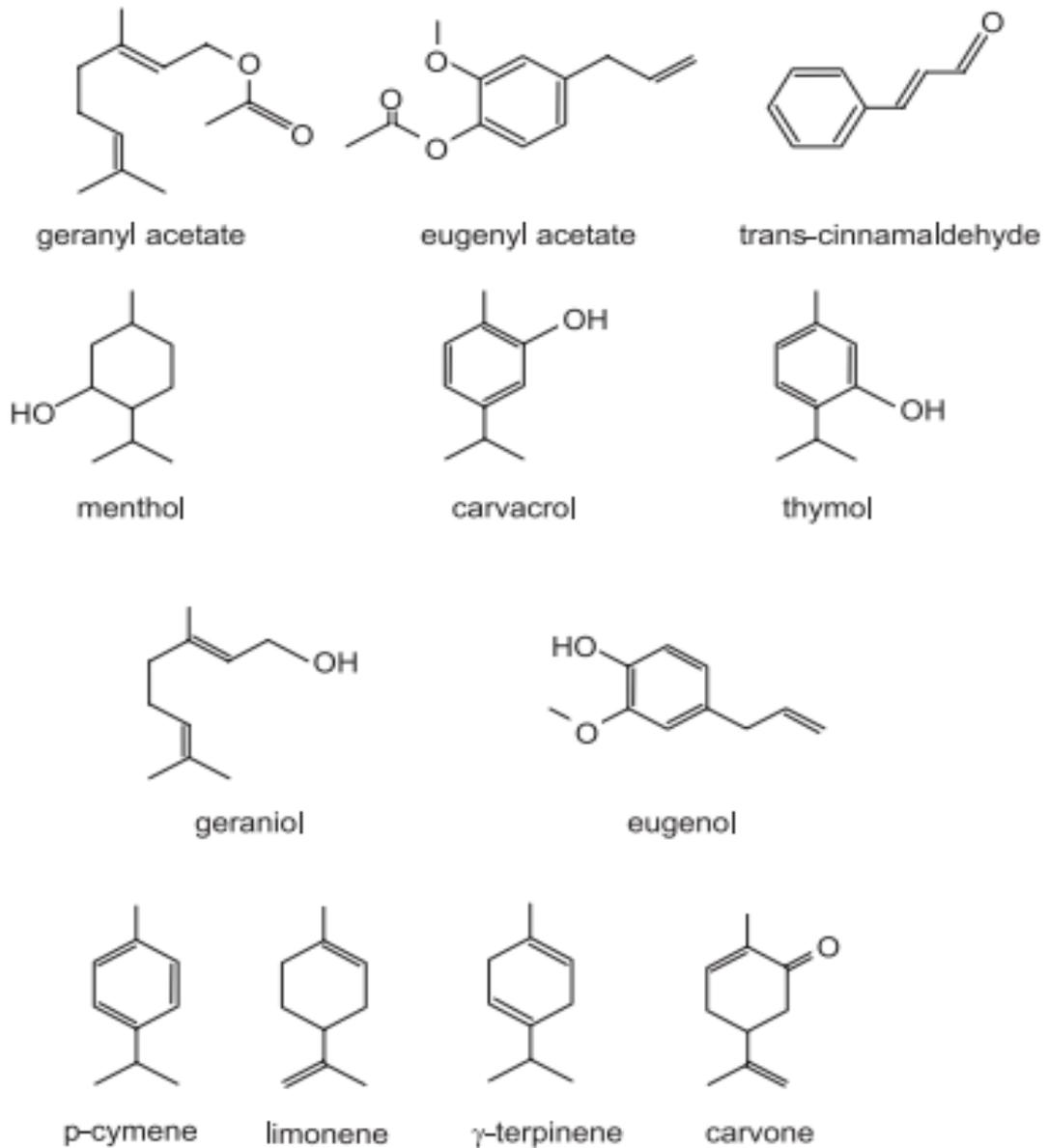
O metabolismo secundário caracteriza-se pela capacidade das plantas produzirem e acumularem grande variedade de substâncias que não estão necessariamente ligadas à manutenção das mesmas. Esse metabolismo possui grande importância, pois proporciona vantagem para a sobrevivência das plantas, pode ser utilizado com finalidade terapêutica e no desenvolvimento de novos produtos (BRASIL, 2007; SIMÕES, 2001).

O óleo essencial (OE), parte do metabolismo secundário, pode ser encontrado em todos os órgãos da planta, possui maior teor em determinados órgãos. No entanto, o OE não é onipresente no reino vegetal (JEZLER et al., 2013).

De acordo com a Organização Internacional de Normalização de Óleos essenciais (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO, 2013), óleo essencial é o produto obtido por meio de matéria - prima vegetal, por destilação com vapor de água, destilação seca, hidrodestilação e processos mecânicos (expressão). Essa definição exclui outros produtos aromáticos/voláteis obtidos por técnicas extrativas que utilizem solventes, fluido supercrítico e micro-ondas.

Os principais constituintes dos óleos essenciais são moléculas voláteis, como terpenos e terpenoides, componentes aromáticos derivados de fenol e componentes alifáticos; conforme demonstrado na Figura 2. Têm sido amplamente utilizados com aplicações bactericidas, fungicidas, antiparasitários, inseticidas, medicinais e cosméticas, indústrias farmacêuticas, sanitárias, agrícolas e alimentares (BAKKALI et al., 2008).

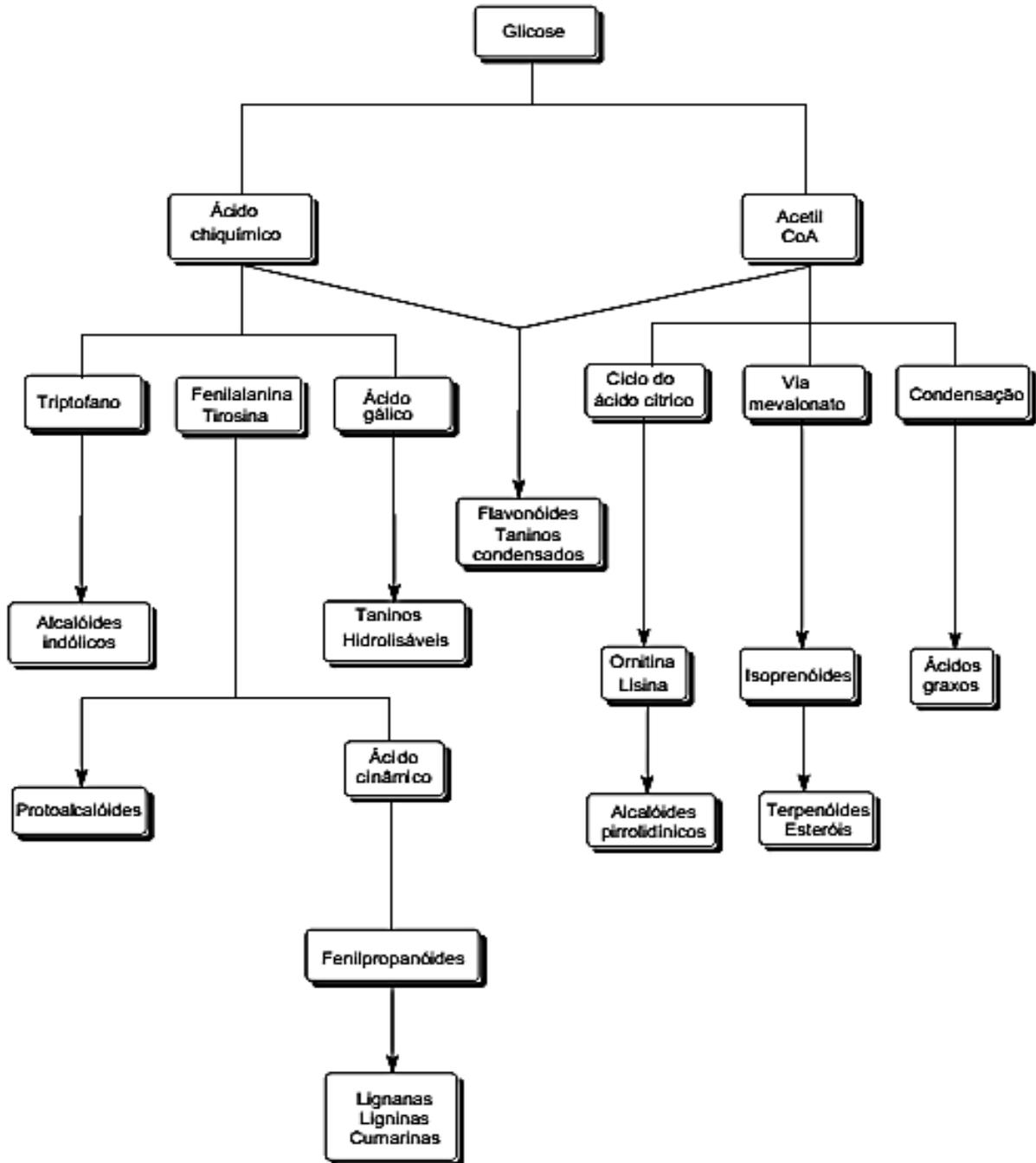
Figura 2 - Fórmula estrutural dos principais componentes dos OEs.



Fonte: Burt (2004).

Toda a diversidade química do óleo essencial é derivada de três vias metabólicas principais: a via da acetilcoenzima A (monoterpenos (C10) e diterpenos (C20)), via do mevalonato (C15) e via do chicamato (fenilproenos (C6-C3)), conforme esquematizado na Figura 3 (YUNES; CECHINEL FILHO, 2016).

Figura 3 - Ciclo biossintético de metabólitos secundários em plantas.



Fonte: Santos (1999).

2.6.1 Tomilho (*Thymus vulgaris*)

O tomilho é uma planta aromática pertencente à família Lamiaceae, amplamente utilizada no Brasil na alimentação (SOUZA; LORENZI, 2012).

O óleo essencial, extraído das folhas, é composto majoritariamente por timol e p-cinemo; estruturas demonstradas da Figura 2 (SOUZA, 2016).

Estudos utilizando o óleo essencial de tomilho demonstraram atividade antimicrobiana contra *Salmonella choleraesuis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (SILVA et al., 2013).

Além disso, outras atividades antifúngicas e antioxidantes são atribuídas ao gênero. Sendo essas propriedades relacionadas à composição do óleo essencial. Óleo de tomilho é listado em farmacopeias da Europa, Alemanha e Reino Unido e utilizado como conservante natural na indústria de alimentos. Os componentes voláteis importantes na determinação da atividade biológica das espécies (NEZHADALI et al., 2010).

2.6.2 Noz-moscada (*Myristica fragrans*)

Noz-moscada é a semente do fruto de *Myristica*, árvore perene, nativa das Molucas, Indonésia. Sendo essas sementes muito utilizadas na culinária, em decorrência do sabor refinado que confere aos pratos. O óleo essencial é obtido por destilação a vapor da noz moscada e é muito usado nas indústrias farmacêuticas e de perfumaria (CALLISTE et al., 2010).

Os principais componentes químicos do óleo de noz-moscada são α -pineno, sabineno, β -pineno, silvestreno, terpinen-4-ol e miristicina (SOUZA, 2016). O óleo essencial da noz-moscada possui muitas atividades biológicas, sendo utilizado na medicina alternativa para combater doenças do sistema nervoso e digestivo. Além disso, também foi atribuído ao óleo essencial de noz-moscada atividade contra *Yersinia enterocolitica* e *L. monocytogenes* (CALLISTE et al., 2010; FIROUZI et al., 2007).

2.6.3 Orégano (*Origanum vulgare* L.)

O orégano, assim como o tomilho, pertence à família Lamiaceae, é uma planta herbácea, de folhas verdes, pequenas e aromáticas, sendo um condimento amplamente utilizado na culinária brasileira. Sua utilização ocorre em maior quantidade nas indústrias de alimentos, o orégano também é utilizado em indústrias farmacêuticas em razão de suas propriedades terapêuticas (BETTONI et al., 2014; SOUZA; LORENZI, 2012).

Os componentes químicos majoritários do óleo essencial do orégano são os compostos fenólicos, sendo o carvavrol o principal composto; estando este relacionado à atividade antimicrobiana atribuída ao óleo (SOUZA, 2016).

2.7 Óleo essencial e atividade antimicrobiana

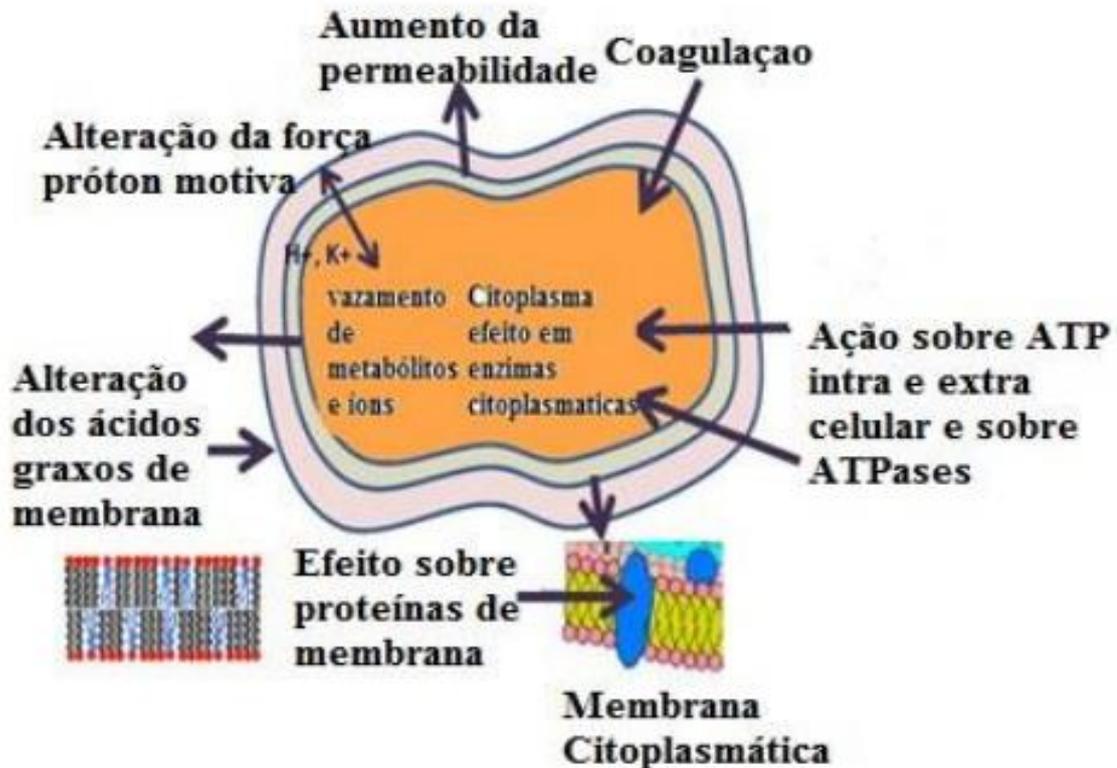
A utilização dos óleos essenciais contra microrganismos patogênicos é verificada em vários estudos como alternativa para novos agentes antimicrobianos (BARBOSA et al., 2016; BRUGNERA, 2014; FIROUZI et al., 2007; GARCÍA-DÍEZ et al., 2017; MITH et al., 2014; SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017; TRINH et al., 2015). Embora o mecanismo antimicrobiano dos óleos essenciais não esteja elucidado completamente, essa ação está relacionada as propriedades lipofílicas, atribuídas à sua capacidade de permear a membrana das bactérias. Os mecanismos de ação podem se relacionar com a capacidade dos compostos fenólicos, presentes nos OE's, alterarem a permeabilidade das células microbianas, danificar as membranas citoplasmáticas, alteração dos ácidos graxos de membrana, coagular o citoplasma, alterar as proteínas de membrana, interferir com o sistema de geração de energia (trifosfato de adenosina (ATP)) e perturba a homeostase da célula, resultando em morte celular, Figura 4 (NAZZARO et al., 2013; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Estudo realizado com *L. innocua* e *E. coli* expostas a óleos essenciais para determinar a CMB's, foi monitorada respectivamente, a fluidez da membrana e a integridade. Destas cepas, após 280 minutos ou 24 horas de exposição aos óleos essenciais de *Laurus nobilis* ou *Satureja calamintha*. Observou-se, pela aferição da anisotropia de fluorescência dos dois óleos essenciais que estes enrijeceram a superfície da membrana, e aumentaram a fluidez do seu núcleo. Tais fatores contribuintes para a morte das células (CHERRAT et al., 2016).

O potencial antimicrobiano dos óleos essenciais provavelmente se dá, em razão das altas porcentagens de compostos fenólicos como carvacrol, eugenol e timol (GONÇALVES et al., 2016; SILVA et al., 2013; SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015). Os compostos fenólicos, provavelmente, interagem com a membrana celular, causando vazamento de componentes celulares, provocando a mudança em ácidos graxos e fosfolipídios, diminuindo o metabolismo energético e influenciando na síntese de material genético (NAZZARO et al., 2013; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Estudo realizado com o óleo essencial de *Baccharis psidioides* e *Cymbopogon citratus* contra *L. monocytogenes* mostrou potencial atividade antimicrobiana. As respostas dos microrganismos a esses óleos essenciais incluíram a regulação positiva dos genes de estresse, como *actA*, *sprfAacpP*, *hly* e *inlJ*, indicando uma diminuição da virulência e na capacidade do microrganismo para causar infecção (HADJILOUKA et al., 2017; PIETA et al., 2017).

Figura 4 - Modos de ação dos óleos essenciais sobre células bacterianas.



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

Calo et al. (2015) mostram a ação de 27 OE's e 12 compostos majoritários de OE's contra *C. jejuni*, *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* e *Salmonella enterica*. A atividade dos OE's do louro, cravo, orégano, canela, pimenta jamaica e tomilho foram os que demonstraram atividades mais pronunciadas contra *L. monocytogenes*. Já entre os componentes majoritários testados o cinnamaldeído, carvacrol, benzaldeído, citral, timol e eugenol apresentaram atividade contra todos os microrganismos.

Experimento realizado para determinar a eficácia do óleo essencial de limão, rico nos compostos limoneno e beta-pineno, para inibir o crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 19117, em carne moída bovina armazenada à 4 °C, mostrou que, durante o período de armazenamento, o número de *L. monocytogenes* foi maior nas amostras não tratadas. Enquanto amostras tratadas com 0,06 e 0,312 mg.g⁻¹ de óleo essencial mostraram eficiência na inibição no microrganismo (HSOUNA et al., 2017).

O efeito bactericida também foi detectado nos compostos majoritários dos óleos essenciais de orégano (carvacrol), tomilho (timol) e cravo-da-índia (eugenol) e suas misturas. Onde mostraram-se eficaz na inativação de *L. innocua*. Sendo as CMB's encontradas para o

carvacrol, timol e eugenol foram 150, 250 e 50 mg.kg⁻¹, respectivamente. No entanto, a mistura ternária de carvacrol-timol-eugenol foi mais eficaz contra *L. innocua* nas concentrações de 75, 31,25 e 56,25 mg.kg⁻¹, respectivamente (GARCÍA et al., 2010).

Muitos estudos vêm utilizando OE's e compostos majoritários no combate de *Listeria* spp. (GARCÍA et al., 2010; HADDAD FILHO, 2014; HSOUNA et al., 2017; MITH et al., 2014; PESAVENTO et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2013). Os OE's de orégano, tomilho e noz-moscada demonstrado atividade antilisterial promissora. São eficazes em pequenas concentrações, como demonstrado por García-Díez et al. (2017); onde o OE de orégano inibiu *L. monocytogenes* na concentração de 0,005%. Ou maiores concentrações, como registrado para o OE de tomilho, que necessitou do OE na concentração de 4% para inibir *S. aureus* e *L. monocytogenes* inoculadas em queijo (CARVALHO et al., 2015).

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: implications for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 213, p. 99-109, 2015.
- ARIZA-MIGUEL, J. et al. Molecular epidemiology of invasive listeriosis due to *Listeria monocytogenes* in a Spanish hospital over a nine-year study period, 2006–2014. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. 1-10, 2015.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, I. M. et al. Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in leafy vegetables. **Food Control**, Guildford, v. 59, p. 468-477, 2016.
- BETTONI, M. B. et al. Growth of oregano (*Origanum vulgare* L.) seedlings in different levels and frequencies of foliar application of the l-glutamic acid in the organic system. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 1, p. 83-88, 2014.
- BRASIL. Resolução nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes, que consta como anexo da presente Resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 15 jun. 2017.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 12**, de 2 de janeiro de 2001. Dispõe sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, DF, 2001. Disponível em: <<http://www.vigilanciasanitaria.gov.br/anvisa.html>>. Acesso em: 14 jun. 2017.
- BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 14, n. 5, p. 320-330, Apr. 2016.
- BRUGNERA, D. F. **Efeito antilisterial de compostos majoritários de óleos essenciais contra células planctônicas e sésseis**. 2014. 108 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- 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, 2010.
- CALLISTE, C. et al. A new antioxidant from wild nutmeg. **Food Chemistry**, London, v. 118, n. 2, p. 489-496, 2010.

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

CARVALHO, R. J. et al. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, London, v. 52, p. 59-65, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Listeria (Listeriosis)**. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/technical.html>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Vital signs: *Listeria* illnesses, deaths, and outbreaks--United States, 2009-2011. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 62, n. 22, p. 448-452, 2013.

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

CHEN, J. et al. *Imo0038* is involved in acid and heat stress responses and specific for *Listeria monocytogenes* lineages I and II, e *Listeria ivanovii*. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 6, n. 3, p. 365-376, 2009.

CHEN, J. et al. Internalin profiling and multilocus sequence typing suggest four *Listeria innocua* subgroups with different evolutionary distances from *Listeria monocytogenes*. **BMC Microbiology**, London, v. 10, n. 10, p. 471-2180, 2010.

CHERRAT, L. et al. Effect of essential oils on cell viability, membrane integrity and membrane fluidity of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Dehradun, v. 19, n. 1, p. 155-166, 2016.

CRUZ, C. R. et al. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimento e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 2, p. 195-206, abr./jun. 2008.

DODD, C. E. R.; RICHARDS, P. J.; ALDSWORTH, T. G. Suicide through stress: a bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 120, n. 1/2, p. 46-50, 2007.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FIROUZI, R. et al. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 11, p. 2626-2630, 2007.

GAHAN, C. G. M.; HILL, C. *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 4, n. 9, p. 1-9, 2014.

GARCÍA, R. et al. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 76, n. 2, p. 95-100, Mar. 2010.

GARCÍA-DÍEZ, J. et al. Influence of food characteristics and food additives on the antimicrobial effect of garlic and oregano essential oils. **Foods**, Basel, v. 6, n. 6, p. 44, 2017.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. 5. ed., rev. e atual. Barueri: Manole, 2015.

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, 2012.

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

GONÇALVES, R. C. et al. Micro-organismos emergentes de importância em alimentos: uma revisão da literatura. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 11, n. 2, p. 71-83, 2016.

GULDIMANN, C. et al. Stochastic and differential activation of σ B and PrfA in *Listeria monocytogenes* at the single cell level under different environmental stress conditions. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 348, Mar. 2017.

HADDAD FILHO, H. **Efeito do óleo essencial de gengibre e do pH sobre crescimento e indução de tolerância em *Listeria monocytogenes***. 2014. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

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

HSOUNA, A. B. et al. Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. **Lipids in Health and Disease**, London, v. 16, n. 1, p. 146, 2017.

HWANG, A. Y.; GUMS, J. G. The emergence and evolution of antimicrobial resistance: impact on a global scale. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 24, n. 24, p. 6440-6445, 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 9235: aromatic natural raw materials: vocabulary**, item 2.11. Genebra, 2013. Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:en>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

JAWETZ, M. et al. **Microbiologia médica**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

JEZLER, C. N. et al. Histochemistry, content and chemical composition of essential oil in different organs of *Alpinia zerumbet*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1811-1816, 2013.

JOHNSON, J. et al. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 7, p. 4256-4266, 2004.

KOMORA, N. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 245, p. 79-87, 2017.

KOVACEVIC, J. et al. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizers is mediated by a novel efflux pump encoded by *emrE*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 82, n. 3, p. 939-953, 2016.

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**, Barking, v. 48, n. 2, p. 667-672, 2012.

MACHADO, T. R. M. et al. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 475-481, 2010.

MASTRONICOLIS, S. K. et al. Alteration of the phospho- or neutral lipid content and fatty acid composition in *Listeria monocytogenes* due to acid adaptation mechanisms for hydrochloric, acetic and lactic acids at pH 5.5 or benzoic acid at neutral pH. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 307-316, 2010.

MITH, H. et al. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Science & Nutrition**, London, v. 2, n. 4, p. 403-416, 2014.

MONTORO, B. P. et al. Proteomic analysis of *Lactobacillus pentosus* for the identification of potential markers involved in acid resistance and their influence on other probiotic features. **Food Microbiology**, London, v. 72, p. 31-38, 2018.

MOURA, S. I. B. **Aplicação de conservantes alimentares para controlo da contaminação por *Listeria* spp. e bolores em queijos**. 2011. 74 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2011.

MOURA, S. M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 229-237, 1993.

NAJJAR, B. M. Z.; CHIKINDAS, M. L.; MONTVILLE, T. J. The acid tolerance response alters membrane fluidity and induces nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, New York, v. 1, n. 2, p. 130-135, 2009.

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

NERO, L. A. et al. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v. 55, n. 6, p. 299-305, 2008.

NEZHADALI, A. et al. Comparison of volatile organic compounds of *Thymus vulgaris* using hydrodistillation and headspace solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry. **Journal of the Chinese Chemical Society**, Beijing, v. 57, p. 40-43, 2010.

PESAVENTO, G. et al. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, Guildford, v. 54, p. 188-199, 2015.

PIETA, L. et al. Comparative transcriptomic analysis of *Listeria monocytogenes* reveals upregulation of stress genes and downregulation of virulence genes in response to essential oil extracted from *Baccharis psiadioides*. **Annals of Microbiology**, Berlin, v. 67, n. 7, p. 479-490, 2017.

PIZARRO-CERDÁ, J.; KÜHBACHER, A.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, New York, v. 2, n. 11, p. a010009, 2012.

POIMENIDOU, S. V. et al. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat, salinity and low pH, after habituation on cherry tomatoes and lettuce leaves. **PloS One**, San Francisco, v. 11, n. 10, p. e0165746, 2016.

RAENGPRADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Comparative analysis of the σ B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 1, p. 158-171, 2008.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, London, v. 62, p. 250-264, 2014.

REIS, C. M. F. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, p. 173-176, 2011.

RISTORI, C. A. et al. Prevalence and populations of *Listeria monocytogenes* in meat products retailed in Sao Paulo, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 11, n. 12, p. 969-973, 2014.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial activity of Basil, oregano, and thyme essential oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 27, n. 3, p. 429-438, Mar. 2017.

SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SCHAFFNER, D. W. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. **Food Control**, Guildford, v. 42, p. 1-8, 2014.

- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: _____. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2004. p. 403-434.
- SILVA, N. et al. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several food borne and spoilage bacteria. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, La Rioja, v. 19, n. 6, p. 503-510, 2013.
- SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. UFSC, 2001.
- SMIGIC, N. et al. Treatment of Escherichia coli O157: H7 with lactic acid, neutralized electrolyzed oxidizing water and chlorine dioxide followed by growth under sub-optimal conditions of temperature, pH and modified atmosphere. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 6, p. 629-637, 2009.
- SONI, K. A.; NANNAPANENI, R.; TASARA, T. The contribution of transcriptomic and proteomic analysis in elucidating stress adaptation responses of *Listeria monocytogenes*. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 8, n. 8, p. 843-852, 2011.
- 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.
- SOUZA, L. E. The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 56, n. 1, p. 1-12, 2016.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.
- SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.
- TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, London, v. 43, p. 587-595, 2013.
- TENENHAUS, A. F. et al. Risk based approach for microbiological food safety management in the dairy industry: the case of *Listeria monocytogenes* in soft cheese made from pasteurized milk. **Risk Analysis**, New York, v. 34, n. 1, p. 56-74, 2014.
- TRINH, N. et al. Effect of emulsification and spray-drying microencapsulation on the antilisterial activity of trans cinnamaldehyde. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 32, n. 7, p. 719-723, 2015.
- VAZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 584-640, July 2001.

WESCHE, A. M. et al. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial food borne pathogens. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 5, p. 1121-1138, 2009.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5. ed. Itajaí: Ed. UNIVALI, 2016.

ZHAO, X.; DRLICA, K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 21, p. 1-6, 2014.

CAPÍTULO 2 ADAPTAÇÃO E ADAPTAÇÃO CRUZADA DE *Listeria* spp. A ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES E AO ESTRESSE ÁCIDO

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é a espécie do gênero *Listeria* mais associada a patologias tanto em seres humanos quanto em animais. Essa bactéria Gram-positiva possui grande capacidade de crescimento em ambientes hostis tornando-se assim um grande problema para as indústrias de alimentos e saúde pública. Em relação à indústria de alimentos, é um microrganismo capaz de resistir a medidas usuais de controle microbiológico, por meio de mecanismos de adaptação e aquisição de tolerância que as deixaram com maior capacidade de sobrevivência. No que tange à saúde, surtos de listeriose têm acontecido no mundo e a resistência a antibióticos já foi relatada.

Listeria monocytogenes está associada a vários surtos de toxinfecções alimentares, sendo responsável pelo quadro clínico de listeriose que pode causar septicemia, encefalite, abortos, meningite e pode levar o paciente a óbito (DALTON et al., 1997; PÉREZ et al., 2014).

No Brasil, apesar de ocorrer relatos de *L. monocytogenes* em alimentos, há falta de dados consistentes sobre casos de listeriose diretamente associados com o consumo destes (CAMARGO et al., 2017).

Em razão da patogenicidade da *L. monocytogenes* alguns estudos têm utilizado *L. innocua* em seu lugar, pois apresentam semelhança ecológica, bioquímica; e genética o que proporciona respostas semelhantes aos tratamentos físico-químicos. No entanto, *L. innocua* não é patogênica (CHEN et al., 2010; CRUZ et al., 2008; MOURA, 2011).

As bactérias vêm mostrando 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 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 (GONÇALVES, 2017).

Listeria monocytogenes apresenta capacidade de adaptação a condições estressantes, persistência em ambientes de processamento e resistência a agentes antimicrobianos é cada vez mais preocupante, em decorrência dos prejuízos que podem causar na indústria de alimentos e na saúde pública (CRUZ et al., 2008).

Os óleos essenciais, produtos originários do metabolismo secundários de plantas aromáticas, têm se destacado como importante agente antimicrobiano para uso na indústria de alimentos, tanto como conservante quanto como agente sanificante. Estudos utilizando os óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada têm demonstrado ação antimicrobiana promissoras. Grande apelo para a utilização desses óleos vêm de trabalhos que mostram que, em razão da sua complexidade, possuem vários alvos de ação sobre as células microbianas (CARVALHO et al., 2015; FIROUZI et al., 2007; GARCÍA-DÍEZ et al., 2017; NAZZARO et al., 2013). Além disso, as bactérias de importância na indústria de alimentos não apresentam mudanças significativas em sua sensibilidade a outros antimicrobianos, processos físicos ou outros fatores estressantes (SOUZA et al., 2016).

Entretanto, há relatos da capacidade das bactérias em se adaptarem ou desenvolverem adaptação ou adaptação cruzada tanto ao estresse ácido quanto aos óleos essenciais e seus compostos majoritários (GONÇALVES, 2017; HADDAD FILHO, 2014). *L. monocytogenes* tem demonstrado adaptação ao carvacol, eugenol e ao óleo essencial de gengibre (HADDAD FILHO, 2014; SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015).

Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a capacidade de *L. monocytogenes* e *L. innocua* de se adaptarem aos óleos essenciais de tomilho, orégano, noz-moscada e ao estresse ácido, e desenvolver adaptação cruzada entre os óleos essenciais e ao estresse ácido, quando expostos a concentrações subletais dos óleos essenciais e ao estresse ácido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de condução do experimento

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

2.2 Óleo essencial

Os óleos essenciais de noz-moscada, orégano e tomilho foram adquiridos na empresa FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda, e a composição dos mesmos estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos óleos essenciais utilizados.

Óleos essenciais	Principais componentes	Teor
Orégano	Carvacrol	70%
	Timol	3%
Tomilho	Timol	Não especificado
	Alfa-pineno	20%
Noz-moscada	Beta-pineno	14%
	Sabineno	17%
	Terpineno-4-ol	6%

Fonte: Da autora (2017).

2.3 Microrganismo e cultura estoque

As cepas utilizadas foram *L. monocytogenes* ATCC19117 sorotipo 4d e *Listeria innocua* ATCC 33090 pertencentes ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos/DCA – UFLA, adquiridas da Seção de Coleção de Culturas da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-SP).

As culturas estoque foram mantidas congeladas em caldo de congelamento (glicerol 15%, peptona bacteriológica 0,5%, extrato de levedura 0,5% e água destilada), até a sua utilização.

2.4 Preparo e padronização do inóculo

A reativação da cepa foi realizada inoculando-se alíquota de 1 mL da cultura estoque em tubo de ensaio, contendo 10 mL de caldo de triptona de soja acrescido de extrato de levedura 0,5% (TSB- YE), e incubado a 37 °C por 24 horas.

Após esse período, alíquota de 100 µL da cultura foi transferida para 100 mL de TSB-YE e incubada a 37 °C até a obtenção de cerca de 10^8 UFC.mL⁻¹.

A padronização do inóculo foi realizada por meio da elaboração de curva de crescimento. O crescimento do microrganismo foi monitorado por espectrometria, por meio da densidade ótica a 620 nm e contagem em placas contendo ágar triptona de soja acrescido de 0,5% de extrato de levedura (TSA-YE). A absorbância encontrada foi 0,305 e 0,085 para *L. monocytogenes* e *L. innocua*, respectivamente, à concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹.

2.5 Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais sobre a *L. monocytogenes* e *L. innocua*

A concentração mínima bactericida dos óleos essenciais foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição, 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 óleos essenciais foram solubilizados em TSB-YE, acrescido de Tween 80 (0,5%). Foram avaliadas as seguintes concentrações (%): 4; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1 e 0,05 (v / v). Alíquotas de 100 µL das soluções foram adicionadas nas cavidades e inoculados 10 µL das culturas padronizadas. 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-YE e incubadas a 37 °C 24 horas.

Foi realizado um controle negativo, contendo TSB-YE acrescido de 0,5% de Tween 80 e o óleo essencial. 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 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório sobre *Listeria* spp.

A influência do pH no crescimento de *L. innocua* e *L. monocytogenes* foi avaliada em microplacas de poliestireno de 96 cavidades. Em cada cavidade, foram dispensados 100 µL de

caldo TSB-YE, com pH previamente ajustado com ácido láctico (98%) e inoculados 10 μ L das culturas padronizadas. Foram avaliados os pH 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0 e 2,5. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, com posterior plaqueamento em TSA-YE 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. O experimento foi realizado em triplicata e três repetições.

2.7 Adaptação aos óleos essenciais

As células de *L. monocytogenes* e *L. innocua* foram expostas a concentrações subletais dos óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada. As doses subletais foram determinadas com base nas CMB e foram equivalentes a CMB/4 e CMB/8 (LUNDÉN et al., 2003). Em tubos tipo Falcon contendo 36 mL de caldo TSB-YE acrescido de 0,5% de Tween 80 foi adicionado o óleo essencial na concentração subletal. Após homogeneização, alíquotas de 4 mL de inóculo padronizado foram adicionadas ao meio e os tubos foram incubados a 37 °C por 6 horas. Após esse período, descartou-se o sobrenadante e as células adaptadas foram lavadas, três vezes, com solução salina (0,85% m/v), ressuspensas em caldo TSB-YE e padronizadas em torno de 10^8 UFC.mL⁻¹ para utilização.

2.8 Adaptação ao estresse ácido

As células de *L. innocua* e *L. monocytogenes* foram expostas ao pH mínimo de crescimento. Em tubos tipo Falcon contendo 36 mL de caldo TSB-YE com pH mínimo de crescimento de cada cultura ajustado com ácido láctico, foram inoculados 4 mL de cultura padronizada e incubados a 37 °C por 6 horas. Após esse período, descartou-se o sobrenadante e as células adaptadas foram lavadas, três vezes, com solução salina e ressuspensas em caldo TSB-YE. As suspensões foram padronizadas em torno de 10^8 UFC.mL⁻¹ para utilização.

O experimento foi realizado em triplicata e com três repetições.

2.9 Resposta adaptativa aos óleos essenciais

As células adaptadas e padronizadas foram incubadas em presença de diferentes concentrações do mesmo óleo essencial utilizado para sua adaptação nas concentrações de CMB/2; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2CMB. Utilizou-se microplacas de poliestireno de 96 cavidades. Os óleos essenciais foram solubilizados em caldo TSB-YE, adicionados de Tween 80 (0,5%). Alíquotas de 100 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-YE empregando-se a técnica de microgotas e incubação a 37 °C por 24 horas.

As células de *L. monocytogenes* e *L. innocua* foram classificadas como capazes de se adaptarem quando foi detectado crescimento em placas, após cultivo em presença dos óleos em concentrações iguais ou maiores que a CMB.

2.10 Resposta de tolerância ácida

As células adaptadas ao pH mínimo de crescimento foram ressuspensas em caldo TSB-YE 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 TSB-YE com diferentes pH ajustados com ácido láctico (98%). Avaliaram-se os pHs de 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0 e 3,5; 3,0 e 2,5. 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 *L. innocua* e *L. monocytogenes* em desenvolver tolerância ácida quando houve crescimento em pH inferior ao pH mínimo de crescimento. Células não adaptadas foram utilizadas como controle.

2.11 Avaliação da adaptação cruzada entre os óleos essenciais

As células de *L. innocua* e *L. monocytogenes* previamente expostas à concentração subletal (1/8 CMB) de óleo essencial de tomilho, orégano e noz-moscada, equivalente a 0,0125%, 0,0125% e 0,025%, respectivamente e padronizadas em 10^8 UFC.mL⁻¹ aproximadamente, foram cultivadas em presença dos óleos essenciais aos quais não foram

previamente expostas (TABELA 2) nas concentrações de CMB/2, CMB, 1,2CMB, 1,4CMB, 1,6CMB, 1,8CMB e 2CMB.

Tabela 2 - Ensaio da avaliação da resposta de adaptação cruzada de culturas de *L. innocua* e *L. monocytogene*.

Estresse subletal	Concetração (1/8 CMB)	Resposta adaptativa
Tomilho	0,0125%	Orégano/ Noz-moscada
Orégano	0,0125%	Tomilho/ Noz-moscada
Noz-moscada	0,025%	Tomilho/ Orégano

Fonte: Da autora (2017).

2.11.1 Avaliação da adaptação cruzada entre os óleos essenciais e o estresse ácido

Após serem expostas à concentração subletal (1/8 CMB) dos óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada, alíquotas de 10 µL das culturas de *L. innocua* e *L. monocytogenes* padronizadas foram inoculadas nos poços das microplacas contendo 100 µL de caldo TSB-YE com pH previamente ajustado para 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0 e 3,5; 3,0 e 2,5, com ácido láctico (98%) e incubadas, a 37 °C por 24 horas. Após esse período, realizou-se o plaqueamento em TSA-YE. Considerou-se a capacidade de *L. innocua* e *L. monocytogenes* desenvolverem adaptação cruzada pelo crescimento em placa após exposição ao pH abaixo do pH mínimo de crescimento.

2.11.2 Avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e óleos essenciais

Após serem expostas ao pH ácido, alíquotas de 10 µL das culturas de *L. innocua* e *L. monocytogenes* padronizadas foram inoculadas nos poços das microplacas contendo 100 µL de caldo TSB-YE acrescido de 0,5% de Tween 80 e dos óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada 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-YE com incubação a 37 °C por 24 horas. Considerou-se a capacidade de as células de *L. innocua* e *L. monocytogenes* desenvolverem adaptação cruzada por meio do crescimento em concentrações acima da subletal.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais

As CMB dos óleos essenciais para ambas as cepas foram de 0,1%, para o tomilho e orégano e 0,2 % para a noz-moscada. Tal fato pode estar relacionado com a presença dos componentes majoritários desses óleos essenciais, pois estes têm notável efeito antibacteriano associado à presença de seus componentes fenólicos, carvacrol, timol e alfa-pineno (SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017; TRINH et al., 2015).

A CMB para a noz-moscada foi o dobro da CMB do tomilho e orégano. Sendo esse resultado similar ao encontrado em estudo realizado por Firouzi et al. (2007), onde utilizou-se o óleo essencial de orégano e noz-moscada contra *L. monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* mostrando o potencial uso dos óleos essenciais como conservantes naturais em alimentos.

Além disso, outros estudos realizados com condições semelhantes a este com o óleo essencial de orégano e/ou com seus componentes majoritários a CMB obtida para a *L. monocytogenes* variou de 0,005% a 0,6%; enquanto a CMB para o tomilho foi de 0,2% (BARBOSA et al., 2016; BRUGNERA, 2014; GARCÍA-DÍEZ et al., 2017; MITH et al., 2014).

3.2 Determinação do pH mínimo inibitório e mínimo de crescimento

O pH mínimo inibitório e o mínimo de crescimento foram de 4,0 e 4,5, respectivamente, para ambas, *L. innocua* e *L. monocytogenes*. Esses dados são compatíveis com os encontrados na literatura para *L. monocytogenes* (MASTRONICOLIS et al., 2010).

A inibição do crescimento bacteriano por ácidos orgânicos, tais como o ácido lático, é de extrema importância na produção de alimentos. O mecanismo envolvido para ação antimicrobiana pelos ácidos orgânicos ocorre por meio da redução do pH intracelular, pela produção de íons de hidrogênio. Porém, ao contrário dos ácidos fortes, os ácidos orgânicos não se dissociam completamente. A forma não dissociada dos ácidos fracos é motivo de sua maior inibição, em comparação com ácidos fortes, que podem agir apenas no exterior da célula (ITA; HUTKINS, 1991).

3.3 Adaptação de *L. innocua* e *L. monocytogenes* aos óleos essenciais de plantas condimentares

Ao submeter as células de ambas as cepas, as concentrações subletais de 1/8 das CMB dos óleos essenciais, estas se mostraram capazes de desenvolver maior tolerância aos óleos essenciais quando comparada à tolerância desenvolvida pelas células expostas a 1/4 das CMB, sendo observado o crescimento das cepas em presença de até 0,18% (1,8CMB) de óleo essencial de orégano e tomilho e 0,4% (2CMB) de óleo essencial de noz moscada (TABELA 3).

Tabela 3 - Adaptação de *L. monocytogenes* e *L. innocua* a óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada.

Óleo essencial	Estresse Subletal	Óleo essencial (x CMB)					
		1/4 CMB	1	1,2	1,4	1,6	1,8
Tomilho	0,025%	+	+	+	-	-	-
Orégano	0,025%	+	+	+	-	-	-
Noz-moscada	0,05%	+	+	+	+	+	-
1/8 CMB							
Tomilho	0,0125%	+	+	+	+	+	-
Orégano	0,0125%	+	+	+	+	+	-
Noz-moscada	0,025%	+	+	+	+	+	+

Fonte: Da autora (2017).

CMB: concentração mínima bactericida; (+) Houve crescimento. (-) Não houve crescimento. Os resultados do crescimento ou ausência do crescimento foram obtidos por meio de plaqueamento.

A adaptação de bactérias aos composto majoritários timol, presente no tomilho e no orégano, foi verificada em estudo conduzido com *Salmonella enterica* Thompson após seu cultivo em concentração subletal. Neste estudo, foi demonstrado dano no metabolismo celular e síntese de proteínas associadas ao estresse (DI PASQUA et al., 2010).

A adaptação de *L. innocua* e *L. monocytogenes* aos óleos essenciais pode ter ocorrido por diversos fatores. Um deles poderia ser como o ocorrido em *Bacillus cereus*, onde seu cultivo em presença de concentrações subletais de carvacrol promoveu a redução da fluidez da membrana citoplasmática, em decorrência das alterações na constituição dos ácidos graxos (ULTEE et al., 2000). Entretanto, análises transcriptômicas mostram que a resposta de *L. monocytogenes* a exposição a baixas concentrações de óleos essenciais é bem complexa

(HADJILOUKA et al., 2017; PIETA et al., 2017). A análise transcriptômica comparativa de *L. monocytogenes* sorotipo 4b adaptada a concentrações subletais de óleo essencial de *Baccharis psiadioides* mostrou que este induz a várias mudanças na regulação de genes associada a resposta ao estresse e diminuição da expressão de genes associados a fatores de virulência (PIETA et al., 2017). Já a exposição de diferentes isolados de *L. monocytogenes*, obtidos de morangos, a concentrações subletais de óleo essencial de capim-limão mostraram diferentes respostas transcriptômicas. Os resultados mostraram que a expressão dos genes associados a biossíntese de ácidos graxos peptidoglicano bem como genes-chave de fatores de virulência foram dose-dependentes (HADJILOUKA et al., 2017).

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. *L. innocua* e *L. monocytogenes* 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. No entanto, Najjar, Chikindas e Montville (2009) mostraram a capacidade de *L. monocytogenes* adquirir tolerância ao pH ácido e crescer em pH 3,5.

Tabela 4 - Avaliação de crescimento de *L. innocua* e *L. monocytogenes* em diferentes pH, após exposição ao estresse ácido.

Microrganismo	Estresse	pH							
		6,0	5,5	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5
<i>L. monocytogenes</i>	adaptada	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>L. innocua</i>	não adaptada	+	+	+	+	-	-	-	-

Fonte: Da autora (2017).

(+) Houve crescimento. (-) Não houve crescimento. Os resultados do crescimento ou ausência do crescimento foram obtidos por meio de plaqueamento.

O pH adverso afeta pelo menos dois aspectos da célula microbiana: 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 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 permeiam a célula, ao passo

que, em valores de pH ácidos, esses compostos se encontram na forma não ionizada e permeando as células (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).

3.5 Avaliação da adaptação cruzada entre os óleos essenciais

Após adaptação de *L. innocua* e *L. monocytogenes* a os óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada, as células foram cultivadas em presença de diferentes concentrações dos óleos aos quais estas não foram previamente adaptadas. A resposta à adaptação cruzada de *L. innocua* e *L. monocytogenes* entre os óleos essenciais é mostrada na Tabela 5. Os resultados de adaptação cruzada entre os óleos essenciais mostram que *L. innocua* apresentou capacidade de adaptação cruzada até a concentração 1,6 CMB (0,016%) para os óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-mocada. *L. monocytogenes* apresentou a mesma capacidade de adaptação cruzada que *L. innocua*.

Tabela 5 - Resposta de adaptação cruzada de *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* entre os óleos essenciais.

Cepa	Estresse Subletal	Conc. 1/8CMB	Estresse letal	Conc. Estresse letal						
				1/2CMB	CMB	1,2CMB	1,4CMB	1,6CMB	1,8CMB	2CMB
<i>L. innocua</i>	Tomilho	0,0125%	Orégano	+	+	+	+	+	-	-
		0,0125%	Noz-moscada	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	Orégano	0,0125%	Tomilho	+	+	+	+	+	-	-
		0,0125%	Noz-moscada	+	+	+	+	+	-	-
	Noz-moscada	0,025%	Tomilho	+	+	+	+	+	-	-
		0,025%	Orégano	+	+	+	+	+	-	-

Fonte: Da autora (2017).

(+) Houve crescimento. (-) Não houve crescimento. Os resultados do crescimento ou ausência do crescimento foram obtidos por meio de plaqueamento.

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, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* modificaram o perfil de proteínas relacionadas à biossíntese de ácidos graxos, aumentando a concentração de ácidos graxos insaturados. Os 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.

3.6 Avaliação da adaptação cruzada entre os óleos essenciais e estresse ácido e entre estresse ácido e óleos essenciais

Conforme apresentado na Tabela 6, *L. innocua* e *L. monocytogenes* apresentaram capacidade de adaptação cruzada por crescer em pH inferior ao mínimo de crescimento (4,5). Ambas as bactérias tornaram-se capaz de crescer em pH 4,0 após expostas aos óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada.

A adaptação cruzada semelhante para ambas as cepas, encontrada neste estudo, pode ter ocorrido, em decorrência da ação tanto dos óleos essenciais quanto do ácido láctico sobre os mesmos alvos na célula, atuarem sobre o início de caminho comum para a morte celular, ou compartilharem via comum de acesso aos seus respectivos alvos (CHAPMAN, 2003).

O fator alternativo Sigma B é uma proteína responsável por controlar genes com importância na resposta ao estresse, virulência, regulação transcricional, metabolismo de carboidratos e transporte; afeta a motilidade e quimiotaxia tanto de *L. innocua* quanto *L. monocytogenes*. As regulações de ambas as cepas por fator alternativo Sigma B mostram um conjunto comum de pelo menos 49 genes. Estes genes em comum podem estar relacionados à resposta semelhante para os tratamentos utilizados no presente estudo (RAENGPRADUB; WIEDMANN; BOOR, 2008).

Tabela 6 - Crescimento de *L. innocua* e *L. monocytogenes* em meio de cultivo com diferentes pH, após adaptação a concentrações subletais (1/8 CMB) de óleos essenciais.

Cepa	Estresse subletal	Conc. (%)	pH							
			6,0	5,0	5,5	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5
<i>L. innocua</i>	Tomilho	0,0125	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	Orégano	0,0125	+	+	+	+	+	-	-	-
	Noz-moscada	0,025	+	+	+	+	+	-	-	-

Fonte: Da autora (2017).

(+) Houve crescimento. (-) Não houve crescimento. Os resultados do crescimento ou ausência do crescimento foram obtidos por meio de plaqueamento.

Os resultados apresentados, na Tabela 7, demonstram que ambas as cepas bacterianas desenvolveram adaptação cruzada entre estresse ácido e os óleos essenciais utilizados, onde as células de *L. innocua* e *L. monocytogenes*, quando pré-cultivadas no pH mínimo de crescimento (4,5), foram inibidas a partir de 1,6 CMB dos óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada.

Tabela 7 - Avaliação da adaptação cruzada entre estresse ácido e óleos essenciais.

Cepa	Estresse Subletal	Estresse letal	Conc. 1/8CMB	Concentração estresse letal CMB						
				pH (MC)	0,5	1	1,2	1,4	1,6	1,8
<i>L. innocua</i>	4,5	Tomilho	0,0125	+	+	+	+	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	4,5	Orégano	0,0125	+	+	+	+	-	-	-
	4,5	Noz-moscada	0,025	+	+	+	+	-	-	-

Fonte: Da autora (2017).

(+) Houve crescimento. (-) Não houve crescimento. Os resultados do crescimento ou ausência do 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. Entretanto, neste estudo, não foi observado esse comportamento, uma vez que ambas as cepas expostas ao pH 4,5 (pH mínimo de crescimento) apresentaram maior tolerância aos OE's, tendo aumentado as CMB's dos óleos essenciais determinadas previamente. 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 *L. innocua* e *L. monocytogenes*. Quando expostas a doses subletais do pH e dos OE's.

Esse tipo de comportamento também foi evidenciado em estudo realizado com *E. coli* enteropatogênica e *E. coli* enterotoxigênica, onde as células expostas ao pH de mínimo crescimento foram capazes de crescer em concentrações de compostos majoritários que anteriormente eram capazes de inibi-las (GONÇALVES, 2017).

Possuir informações 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 e a saúde dos consumidores.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, comprovou-se o efeito dos óleos essenciais de tomilho, orégano e noz-moscada contra *L. innocua* e *L. monocytogenes*, mostrando o potencial dos óleos essenciais como antimicrobianos, desde que utilizados em concentrações bactericidas.

Listeria innocua e *L. monocytogenes* apresentaram capacidade adaptativa quando expostas às doses subletais dos óleos essenciais e ao pH mínimo de crescimento.

Ambas as espécies desenvolveram adaptação cruzada entre os óleos essenciais e o estresse ácido e entre estresse ácido e os óleos essenciais.

Listeria innocua mostrou-se bom modelo para estudos referentes a *L. monocytogenes*, pois ambas as espécies apresentaram respostas semelhantes em todos os tratamentos.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, I. M. et al. Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in leafy vegetables. **Food Control**, Guildford, v. 59, p. 468-477, 2016.
- 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, n. 1, p. 1-20, 2004.
- BRUGNERA, D. F. **Efeito antilisterial de compostos majoritários de óleos essenciais contra células planctônicas e sésseis**. 2014. 108 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- CAMARGO, A. C. et al. *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human Listeriosis: the Brazilian Scenario. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 20, n. 20, p. 1-14, 2017.
- CARVALHO, R. J. et al. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, London, v. 52, p. 59-65, 2015.
- CHAPMAN, J. S. Desinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 51, p. 271-276, 2003.
- CHEN, J. et al. Internalin profiling and multilocus sequence typing suggest four *Listeria innocua* subgroups with different evolutionary distances from *Listeria monocytogenes*. **BMC Microbiology**, London, v. 10, n. 10, p. 471-2180, 2010.
- CRUZ, C. R. et al. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimento e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 2, p. 195-206, abr./jun. 2008.
- DALTON, C. B. et al. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 336, n. 2, p. 100-106, 1997.
- DI PASQUA, R. et al. Changes in the proteome of *Salmonella entericaserovar Thompson* as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, Weinheim, v. 10, n. 5, p. 1040-1049, 2010.
- FIROUZI, R. et al. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 11, p. 2626-2630, 2007.
- GARCÍA-DÍEZ, J. et al. Influence of food characteristics and food additives on the antimicrobial effect of garlic and oregano essential oils. **Foods**, Basel, v. 6, n. 6, p. 44, 2017.

- GONÇALVES, M. C. **Adaptação e adaptação cruzada de Escherichia coli enterotoxigênica e enteropatogênica a componentes majoritários de óleos essenciais e ao estresse ácido**. 2017. 61 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- HADDAD FILHO, H. **Efeito do óleo essencial de gengibre e do pH sobre crescimento e indução de tolerância em *Listeria monocytogenes***. 2014. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- HADJILOUKA, A. et al. Effect of lemongrass essential oil on *Listeria monocytogenes* gene expression. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 77, p. 510-516, 2017.
- 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.
- LUNDÉN, J. M. et al. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 265-272, May 2003.
- MASTRONICOLIS, S. K. et al. Alteration of the phospho- or neutral lipid content and fatty acid composition in *Listeria monocytogenes* due to acid adaptation mechanisms for hydrochloric, acetic and lactic acids at pH 5.5 or benzoic acid at neutral pH. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 307-316, 2010.
- MITH, H. et al. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Science & Nutrition**, London, v. 2, n. 4, p. 403-416, 2014.
- MOURA, S. I. B. **Aplicação de conservantes alimentares para controlo da contaminação por *Listeria* spp. e bolores em queijos**. 2011. 74 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2011.
- NAJJAR, B. M. Z.; CHIKINDAS, M. L.; MONTVILLE, T. J. The acid tolerance response alters membrane fluidity and induces nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, New York, v. 1, n. 2, p. 130-135, 2009.
- 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).
- NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, Dec. 2013.

PÉREZ, T. E. et al. Two outbreaks of *Listeria monocytogenes* infection, Northern Spain. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, n. 12, p. 2155-2157, Dec. 2014.

PIETA, L. et al. Comparative transcriptomic analysis of *Listeria monocytogenes* reveals upregulation of stress genes and downregulation of virulence genes in response to essential oil extracted from *Baccharis psiadioides*. **Annals of Microbiology**, Berlin, v. 67, n. 7, p. 479-490, 2017.

RAENGPADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Comparative analysis of the σ_B -dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 1, p. 158-171, 2008.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial activity of Basil, oregano, and thyme essential oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 27, n. 3, p. 429-438, Mar. 2017.

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**, Botucatu, 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.

TRINH, N. et al. Effect of emulsification and spray-drying microencapsulation on the antilisterial activity of trans cinnamaldehyde. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 32, n. 7, p. 719-723, 2015.

ULTEE, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 5, p. 620-624, 2000.