



**HELIO HADDAD FILHO**

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE  
E DO pH SOBRE O CRESCIMENTO E  
INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA EM *Listeria*  
*monocytogenes***

**LAVRAS – MG**

**2014**

**HÉLIO HADDAD FILHO**

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE E DO pH SOBRE O  
CRESCIMENTO E INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA EM *Listeria*  
*monocytogenes***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora  
Dr. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG  
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Haddad Filho, Hélio.

Efeito do óleo essencial de gengibre e do ph sobre crescimento e indução de tolerância em *Listeria monocytogenes* / Hélio Haddad Filho. – Lavras : UFLA, 2014.

85 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Adaptação cruzada. 2. Estresse ácido. 3. Concentração mínima inibitória. 4. Tolerância. 5. Gengibre. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

**HÉLIO HADDAD FILHO**

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE E DO pH SOBRE O  
CRESCIMENTO E INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA EM *Listeria*  
*monocytogenes***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 31 de janeiro de 2014.

Dr. Disney Ribeiro Dias

UFLA

Dr. Allan Kardec Carlos Dias

Faculdade Inforium

Dra. Roberta Hilsdorf Picolli  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2014**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, responsável por tudo, que proporcionou as condições para a realização desse mestrado e que sempre esteve presente, amparando nos momentos de fraqueza e dando força para superar as dificuldades.

A minha esposa e amor da minha vida, Graziella, pela paciência e amor incondicionais e constantes diante de minha ausência, assumindo função de mãe e de pai naqueles muitos momentos onde eu não me encontrava presente. Te amo muito. Muito obrigado por tudo!

Aos meus filhos, Bianca e Henrique. Gostaria tanto que soubessem a importância que têm na minha vida e a importância que tiveram para a conclusão desse mestrado. Saibam que foi difícil demais ter que ficar tanto tempo longe de vocês e que me cortava o coração as vezes que vinham gritando “papai” e eu não podia permanecer junto de vocês. Vocês são tudo na minha vida e é por vocês que pretendo fazer muito e muito mais. Amo vocês mais que tudo no mundo!

A toda minha família, pai, mãe e irmãos e, especialmente, ao meu irmão Felipe, que muito ajudou e participou diretamente em vários aspectos desse projeto. Valeu, Titi.

A minha orientadora Profa. Roberta Hilsdorf Picolli, por ter me aceitado como mestrando. Muito obrigado pela sempre compreensão, alegria, disponibilidade e por ter permitido a realização desse sonho!

Aos professores que aceitaram fazer parte da minha banca, o meu muito obrigado.

A todos os professores que participaram dessa minha formação, ministrando disciplinas, dando orientações ou conselhos. Todos foram muito importantes.

Ao professor de Estatística, Paulo César Lima, pela incomensurável ajuda.

A todos os colegas de laboratório e amigos. Todos. Sem exceção. Seria injusto citar alguns e deixar de citar outros, por isso, agradeço a todos que, cada um a sua maneira, com certeza, foram essenciais e muito importantes para a conclusão desse mestrado. Agradeço, em especial, ao João Paulo, que foi fundamental na minha chegada ao laboratório, ajudando muito, mas muito mesmo, principalmente nas etapas iniciais, fundamentais para meu aprendizado. Muito obrigado!

À Eliane, pela constante ajuda dentro do laboratório.

À Lucilene, que sempre me ajudou na resolução dos assuntos burocráticos, que foram muitos.

A todos do laboratório de Fisiologia Vegetal, pela simpatia e ajuda nas análises realizadas.

Enfim, a todos que, de alguma forma, verdadeiramente, ajudaram na concretização desse projeto, acadêmico e de vida.

O meu muito obrigado!

## RESUMO

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram positivo, aeróbio facultativo e não formadora de endósporos, que apresenta grande capacidade de crescimento em condições adversas tornando-se, assim, um sério problema enfrentado pela indústria de produção de alimentos e, conseqüentemente, pelo sistema de saúde, uma vez que a infecção causada por esse micro-organismo apresenta uma elevada taxa de mortalidade, principalmente em indivíduos imunodeprimidos. Bactéria reemergente em vários países, apresenta tolerância a ambientes adversos e capacidade de se adaptar a esses ambientes, podendo tornar-se ainda mais tolerante frente a agentes nocivos diversos. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do pH e do óleo essencial de gengibre sobre o crescimento e a indução de tolerância em *L. monocytogenes*, assim como avaliar a indução de tolerância cruzada entre o óleo essencial de gengibre e a acidez. Determinou-se o pH mínimo inibitório (pHMI) e o pH mínimo de crescimento (pHMC) de *L. monocytogenes*, sendo que o valor acima deste foi utilizado para a indução de tolerância ácida na bactéria. Determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI) do óleo essencial de gengibre pelo método de microdiluição e uma concentração subletal (CMI/4) do óleo essencial e de um composto quaternário de amônio foram utilizadas para a indução de tolerância no micro-organismo. Por fim, a concentração subletal do óleo essencial de gengibre foi utilizada para a indução de tolerância cruzada do óleo para o pHMI. O pHMI, em *L. monocytogenes*, foi 4,5 e o pHMC foi 5,0. Houve indução de tolerância ácida com o ácido clorídrico e não houve com o ácido cítrico. A CMI do óleo essencial de gengibre foi 3,12% e houve indução de tolerância ao óleo quando a bactéria foi exposta à concentração de CMI/4 por seis horas. Não houve indução de tolerância frente à exposição à concentração subletal de composto quaternário de amônio. Quanto à tolerância cruzada, *L. monocytogenes* exposta à concentração subletal de óleo essencial de gengibre apresentou crescimento quanto exposta ao pHMI de 4,5, indicando aquisição de tolerância. Dessa forma, torna-se importante a continuidade dos estudos em relação ao efeito antibacteriano dos óleos essenciais, bem como pesquisas em relação à resistência apresentada pelos micro-organismos diante de exposições a concentrações subletais desses e de diversos métodos de controle microbiológico utilizados na produção dos alimentos. Os óleos essenciais apresentam utilidade promissora, porém muitos estudos ainda precisam ser realizados, adequando a concentração, de modo que essa seja efetiva, não indutora de tolerância e, sensorialmente, aceitável.

**Palavras-chave:** Adaptação cruzada. Estresse ácido. Concentração mínima inibitória. Tolerância. Gengibre.

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is a Gram positive and facultative aerobic bacterium, which don't generates endospores, and have a great ability to grow in hostile conditions. Thus becoming a serious problem faced by the food production industry and therefore the health system, once the infection caused by this microorganism create a high mortality especially in immunocompromised individuals. It is a reemerging bacteria in several countries, and showed tolerance and ability to adapt to adverse environments, becoming even more tolerant against many harmful agents. This study aimed to evaluate the effect of pH and ginger's essential oil on growth and induction of tolerance in *L. monocytogenes*, as well as evaluating the induction of cross-tolerance between the ginger's essential oil and acidity. It was determined the minimum inhibitory pH (MIpH) and the minimum pH for growth (MpHG) for *L. monocytogenes*, onde the next value above that was used to induce the acid tolerance. It was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of ginger's essential oil by the microdilution method and a sublethal concentration (MIC/4) of the essential oil and of a quaternary ammonium compound were used to induce tolerance in the microorganism. Finally, ginger's essential oil's sublethal concentration was used for the induction of cross tolerance from oil to MIpH. The MIpH in *L. monocytogenes* was 4,5 and MpHMG 5,0. There was induction of acid tolerance with hydrochloric acid and not with citric acid. MIC of ginger's essential oil was 3.12% and there was induction of tolerance to oil when the bacteria were exposed to concentrations of MIC/4 for six hours. There was no induction of tolerance after exposure to sublethal concentration of quaternary ammonium compound. Regarding cross-tolerance, *L. monocytogenes* exposed to sublethal concentration of ginger's essential oil has grown when exposed to pHMI 4.5, indicating acquisition of cross-tolerance. Thus, it is important to continue the studies on the antibacterial effect of the essential oils, as well as research regarding resistance displayed by microorganisms against exposure to sublethal concentrations and various methods of microbiological control used in the production of food. Essential oils have promising utility, but many studies still need to be performed adjusting the concentration to the effectiveness and does not induce tolerance or sensory defects.

**Keywords:** Cross-adaptation. Acid stress. Minimum inhibitory concentration. Tolerance. Ginger.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação de <i>L. monocytogenes</i> em linhagens e sorotipos e sua associação com casos de infecção .....	18
Tabela 2	Os principais óleos essenciais no mercado mundial. ....	34
Tabela 3	Relação entre o pH ajustado com ácido cítrico e HCl e o crescimento (Log UFC/mL) de <i>L. monocytogenes</i> .....	50
Tabela 4	Valores médios do crescimento (Log UFC/ mL) de <i>L. monocytogenes</i> em função do pH, após indução de tolerância com HCl.....	55
Tabela 5	Valores médios do crescimento (Log UFC/mL) de <i>L. monocytogenes</i> em função do pH, após indução de tolerância com ácido cítrico .....	57
Tabela 6	Efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre sobre o crescimento (Log UFC/mL) de <i>L. monocytogenes</i> .....	60
Tabela 7	Valores médios do crescimento (Log UFC/mL) de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre .....	61
Tabela 8	Efeito do pH sobre o crescimento (Log UFC/ML) de <i>L. monocytogenes</i> após exposição à CMI/4 de óleo essencial de gengibre .....	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Datas, eventos e áreas de pesquisas relacionadas à <i>Listeria</i> desde sua descoberta em 1926. ....	16
Figura 2	Principais constituintes dos óleos essenciais. ....	33
Figura 3	Sítios e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana. ....	37
Figura 4	Equações de regressão do crescimento (Log UFC/mL) de <i>L. monocytogenes</i> em função do pH, após indução de tolerância. A: com HCl; B: com ácido cítrico. ....	59

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1	<i>Listeria</i> sp. ....	15
2.1.1	<i>Listeria monocytogenes</i> : patógeno alimentar .....	16
2.1.2	Análise do proteoma de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	19
2.1.3	Listeriose .....	21
2.2	Resistência a agentes antibacterianos.....	24
2.3	Agentes antimicrobianos.....	27
2.3.1	Desinfetantes químicos .....	28
2.3.1.1	Compostos quaternários de amônio .....	29
2.3.2	Óleos essenciais .....	30
2.3.2.1	Definição e composição .....	30
2.3.2.2	Biossíntese .....	34
2.3.2.3	Propriedades dos óleos essenciais .....	35
2.3.2.4	Mecanismos de ação antibacteriana.....	36
2.3.2.5	Óleo essencial de gengibre .....	37
2.4	Resposta de <i>L. monocytogenes</i> ao estresse ácido .....	40
2.5	Adaptação cruzada .....	42
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	44
3.1	Micro-organismo e cultura estoque.....	44
3.2	Óleo essencial .....	44
3.3	Preparo e padronização do inóculo .....	44
3.4	Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório de <i>L. monocytogenes</i> .....	45
3.5	Indução da resposta de tolerância ácida .....	46

3.6	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de óleo essencial de gengibre.....	46
3.7	Indução de tolerância ao óleo essencial de gengibre e ao composto quaternário de amônio .....	47
3.8	Indução de adaptação cruzada .....	48
3.9	Análises estatísticas.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	Determinação do pH mínimo inibitório e pH mínimo de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> .....	50
4.2	Indução da resposta de tolerância ácida .....	54
4.3	Concentração Mínima Inibitória do óleo essencial de gengibre .....	60
4.4	Indução de tolerância ao óleo essencial de gengibre e ao composto quaternário de amônio .....	63
4.5	Indução de tolerância cruzada .....	66
5	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72

## 1 INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria que possui grande capacidade de crescimento em ambientes adversos tornando-se assim um grande problema para as indústrias de alimentos e saúde pública. Em relação à indústria de alimentos, é um micro-organismo capaz de resistir a medidas usuais de controle microbiológico, através de mecanismos de adaptação e aquisição de tolerância que as deixaram com maior capacidade de sobrevivência a ambientes hostis. No que tange à saúde, surtos de listeriose têm acontecido no mundo e a explicação pode ser encontrada, entre outros fatores, nos mecanismos de adaptação desenvolvidos por essa bactéria, resultando em maior resistência.

Ao passo que os micro-organismos vão adquirindo resistência ou sendo selecionados pelo uso indiscriminado de agentes antibacterianos, novas medidas de controle vão sendo desenvolvidas e novas drogas são produzidas. Mas, à medida que as novas drogas surgem, os micro-organismos também desenvolvem mecanismos de resistência contra essas drogas, permitindo sua sobrevivência. O que sempre foi crucial para que tenham sobrevivido na natureza torna-se, para os seres humanos, preocupação crescente quanto ao desenvolvimento de novas medidas para combatê-los.

A utilização de óleos essenciais ou seus compostos majoritários, isolados ou associados, como agentes antibacterianos, surgiu como alternativa ao combate a esses micro-organismos, devido ao aumento crescente da resistência aos antimicrobianos usuais, fato que já se tornou um dos grandes desafios encontrados pela ciência atualmente.

Como os óleos essenciais já vêm sendo pesquisados e seu efeito antibacteriano já foi comprovado, consiste em atual preocupação a possibilidade de que os mesmos possam induzir mecanismos de adaptação nos micro-organismos, se usados em doses subletais. Assim, o que seria uma medida de

proteção à saúde humana, acabaria se tornando fator de risco, por aumentar a tolerância desses micro-organismos ao óleo essencial.

Em relação aos desinfetantes químicos utilizados na indústria de alimentos, estudos mostraram a existência de cepas de *L. monocytogenes* já resistentes a alguns desses agentes, tais quais os compostos quaternários de amônio. Porém, em relação aos óleos essenciais e aos seus compostos majoritários, é necessário avaliar a possibilidade de que bactérias, como *L. monocytogenes*, possam desenvolver mecanismos de adaptação, caso os mesmos sejam utilizados em doses subletais.

Na cadeia de produção de alimentos, micro-organismos presentes nos equipamentos podem ser expostos a ambiente ácido intracelular, como determinado por alguns desinfetantes, como medida de combate a seu crescimento. Acredita-se que condições ácidas subletais possam induzir tolerância a alguns desses micro-organismos, deixando-os mais resistentes a medidas posteriores de controle, tolerantes à acidez mais severa e também a outros agentes, como os próprios óleos essenciais.

Os mecanismos de adaptação cruzada são aqueles que conferem, aos micro-organismos, resistência a um fator de estresse diferente daquele ao qual foram submetidos, constituindo, para os seres humanos, outro fator de enorme preocupação no que concerne ao arsenal de combate desenvolvido contra esses micro-organismos.

Assim, os óleos essenciais constituem possível meio a ser usado para inibir o crescimento de micro-organismos contaminantes de alimentos, como *L. monocytogenes*. Porém, é de suma importância definir como e em que concentrações eles devem ser utilizados, afim de que não contribuam para indução de tolerância, tanto ao próprio óleo essencial quanto cruzada a baixos valores de pH, que poderiam ser medidas de controle posteriores incluindo, até mesmo, a acidez encontrada pelos micro-organismos no trato gastrointestinal

humano, que constitui etapa crucial entre os vários mecanismos de defesa do organismo perante a invasão microbiana.

O presente estudo objetivou avaliar o efeito do pH e do óleo essencial de gengibre sobre o crescimento e indução de tolerância em *L. monocytogenes*, assim como avaliar a ocorrência de adaptação cruzada entre o óleo essencial de gengibre e baixos valores de pH.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Listeria* sp.

A análise taxonômica de *Listeria* demorou muitos anos para ser concluída e foi realizada graças a técnicas de taxonomia numérica, análises macromoleculares e, especialmente, estudos da homologia DNA-DNA e do RNA ribossomal (rRNA) 16S. Baseado na combinação de resultados de diferentes estudos de vários micro-organismos *Gram* positivos, utilizando-se a sequência do RNA ribossomal (rRNA) 16S, *Listeria* está classificada próximo a *Brochothrix* e esses dois gêneros, juntamente com *Staphylococcus* e *Kurthia*, ocupam uma posição entre o grupo dos *Bacillus* e dos *Lactobacillus*/*Streptococcus* dentro da ramificação dos *Clostridium*-*Lactobacillus*-*Bacillus*, sendo a porcentagem de G+C de todos esses membros inferior a 50% (JONES, 1988).

Bactérias do gênero *Listeria* são bastonetes *Gram* positivos, aeróbios facultativos, não formadores de endósporos, que crescem entre temperatura de 0 a 42 °C, podendo se multiplicar lentamente em temperatura de refrigeração. Movimentam-se por flagelos, mas não em todas as temperaturas (FORSYTHE, 2010). Embora a faixa de temperatura de crescimento seja ampla, a temperatura ótima está entre 30 e 37 °C. Medem 0,5 a 2,0µm de comprimento e 0,5µm de diâmetro (JAY, 2005).

De acordo com Jay (2005), são seis espécies caracterizadas pelos seus antígenos, que determinam 17 sorovares. São elas: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. innocua* e *L. grayi* (VOLOKHOV, 2002).

Há relatos de outras espécies, como *L. marthii* (GRAVES, 2010) e *L. rocourtiae* (LECLERCQ et al., 2010), isoladas, respectivamente, nos EUA e na Áustria e também *L. denitrificans* (SKERMAN; MCGOWAN; SNEATH, 1980),



*L. murrayi* (SKERMAN; McGOWAN; SNEATH, 1980), *L. fleischmannii* (BERTSCH et al., 2013), *L. weihenstephanensis* (LANG HALTER; NEUHAUS; SCHERER, 2013), totalizando 12 espécies descritas.

*L. monocytogenes* é a espécie patogênica a humanos e animais. Ocasionalmente, *L. ivanovii* é patogênica a animais, enquanto que as demais espécies são consideradas não patogênicas (BILLE; ROCOURT; SWAMINATHAN, 1999).

A história cronológica de *Listeria sp.* está ilustrada na figura 1.

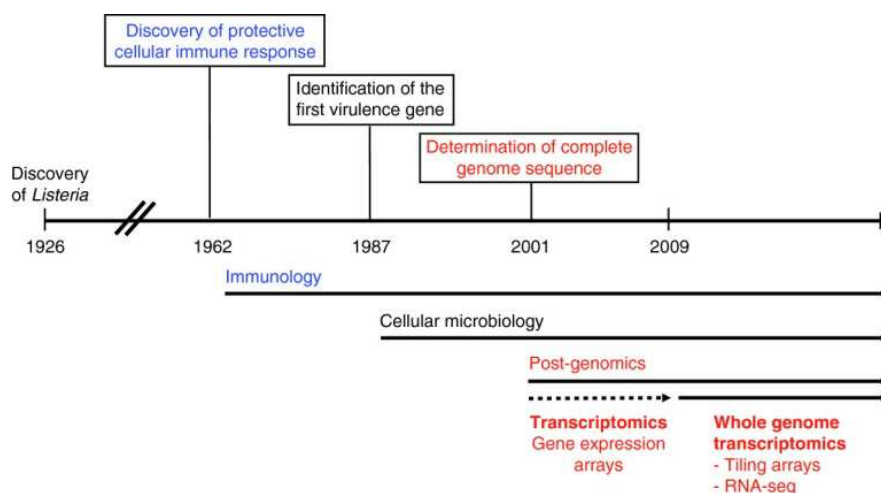


Figura 1 Datas, eventos e áreas de pesquisas relacionadas à *Listeria* desde sua descoberta em 1926

Fonte: Cossart e Archambaud (2009)

### 2.1.1 *Listeria monocytogenes*: patógeno alimentar

Dumont e Cotoni isolaram a bactéria *L. monocytogenes*, pela primeira vez, em 1918, porém ainda sem saber de qual espécie bacteriana se tratava. No entanto, apenas em 1940, foi realmente identificada como sendo *L. monocytogenes*, no Instituto Pasteur, em Paris (FARBER; PETERKIN, 2000).

Antes disso, em 1926, Murray e seus colaboradores isolaram um micro-organismo em forma de bacilo chamando-o de *Bacterium monocytogenes* e alguns anos mais tarde, Pirie, isolando uma bactéria no Norte da África, nomeou-a de *Listerella hepatolytica*. Em 1940, chegou-se à conclusão de que *Bacterium monocytogenes* e *Listerella hepatolytica* eram o mesmo micro-organismo, sendo assim, mudado seu nome para *Listeria monocytogenes* (FARBER; PETERKIN, 1991).

Entretanto, passou a ser fonte de preocupação e problema para a saúde pública, indústria alimentar e agências reguladoras quando, em 1985, foi identificada como agente causadora de um surto de origem alimentar de grande repercussão devido ao consumo de um tipo de queijo mexicano (FARBER; PETERKIN, 2000).

O surgimento repentino da *L. monocytogenes* como agente causador de doença de origem alimentar foi assustador (JAY, 2005).

É uma bactéria capaz de crescer em ambientes com pH entre 5,6 e 9,6 preferindo, no entanto, pH aproximado de 7,5. É capaz de se adaptar a meios ácidos e, concomitantemente, desenvolver proteção relativa a outros fatores adversos, como altas concentrações de sal, sendo que algumas estirpes toleram uma concentração de 10% de NaCl (PINTADO, 2009).

Sua mobilidade é determinada por 2 a 5 flagelos que se desenvolvem entre as temperaturas de 20 e 25 °C e permitem que a bactéria se movimente para ambiente preferencial quando está sob algum estresse, como nutricional ou ambiental (SEELIGER; JONES, 1987). A formação desses flagelos é inibida a 37 °C (FARBER; PETERKIN, 1991). Essas características e outras, como a capacidade de crescer em faixa ampla de temperatura, em ambientes ácidos, na ausência ou em baixos níveis de oxigênio e sua capacidade de formar biofilmes, permitem a persistência e a resistência desse micro-organismo em ambientes variados (FARBER; PETERKIN, 2000).

É um parasita intracelular facultativo que pode invadir e se replicar nas células epiteliais e nos macrófagos (DUSSERGET; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2004).

Dos dezessete sorovares característicos do gênero, a espécie *L. monocytogenes* é a que apresenta a maior variedade antigênica, totalizando treze sorovares: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7. Dentre esses sorovares, alguns são compartilhados com *L. innocua* (4ab) e *L. seeligeri* (1/2b, 4c e 4d). O sorovar 4b é frequentemente isolado de produtos cárneos e humanos, o 1/2a é comum em produtos lácteos e o 1/2b é comumente distribuído na natureza (HOFER; RIBEIRO; FEITOSA, 2000). A tabela 1 representa a classificação de acordo com as linhagens, sorotipos e associações com casos de infecção causada por *L. monocytogenes*.

Tabela 1 Classificação de *L. monocytogenes* em linhagens e sorotipos e sua associação com casos de infecção

Grupos	Surtos	Potencial Patogênico	Sorotipos predominantes
Linhagem I	Maior número de casos	Alto	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e
Linhagem II	Casos esporádicos	Médio	1/2a, 1/2c, 3c
Linhagem III	Casos raros	Baixo	4a, 4c

Fonte: Adaptado de Bhunia (2008)

Onze genomas de *L. monocytogenes* estão, atualmente, disponíveis no *National Center of Biotechnology Information* - NCBI (2011).

A espécie *L. monocytogenes* pode sobreviver em condições extremas encontradas na cadeia de produção de alimentos, como altas concentrações de sal e condições extremas de pH e temperatura, características também comuns a *L. innocua*, espécie não patogênica e frequentemente associada à *L. monocytogenes* em alimentos e no meio ambiente (GLASER et al., 2001).

*L. monocytogenes* ajusta seu metabolismo para resistir aos ambientes estressantes. Nos alimentos é possível encontrar várias situações de estresse, como frio, calor, acidez, alcalinidade, altas concentrações de sal e agentes antimicrobianos. Células expostas à média acidez são, subsequentemente, capazes de resistir à alta acidez. Resistência cruzada também é comum em *Listeria* sp., sendo que a tolerância ácida adquirida pelas células aumenta a resistência ao calor, comparado às células não previamente expostas à acidez (NAJJAR; CHIKINDAS; MONTVILLE, 2009).

Qualquer alimento fresco, seja de origem animal ou vegetal, pode apresentar números variados de *L. monocytogenes*, sendo que o gênero é amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado em vegetação que está em decomposição, solos, fezes de animais, silagem, esgoto e água (JAY, 2005).

Apresentam com maior frequência a presença de *L. monocytogenes*: leite cru, queijos, sorvetes, laticínios de uma forma geral, hortaliças, frutas, carnes frescas, cozidas ou congeladas de várias espécies animais como aves, bovinos, suínos, caprinos, ovinos e frutos do mar, além de alimentos prontos para consumo (BILLE; ROCOURT; SWAMINATHAN, 1999).

### **2.1.2 Análise do proteoma de *Listeria monocytogenes***

A análise do genoma comparativo de *L. monocytogenes* e *L. innocua* pelo *European Listeria Consortium* revelou diferenças consideráveis entre as duas espécies. A diversidade entre as duas espécies manifestou-se no subproteoma das proteínas secretórias e de superfície. As duas espécies transportam a mesma quantidade de proteínas ao meio extracelular, cerca de 100 proteínas para cada uma. Cerca de metade dessas proteínas são compartilhadas por ambas as espécies, sendo que um grupo é específico para *L. monocytogenes*

e outro específico para *L. innocua*. Cerca de dezesseis proteínas foram encontradas no sobrenadante de *L. monocytogenes*, que não tinham genes ortólogos em *L. innocua*, sendo essas as proteínas de grande interesse, pois todos os fatores de virulência conhecidos pertencem a esses grupos (TROST et al., 2005).

Em estudo realizado por Calvo et al. (2005), a análise do genoma de *L. monocytogenes* e *L. innocua* revelou grande número de genes que codificam proteínas de superfície presentes na parede celular (41 e 43, respectivamente). A função dessas proteínas até então é desconhecida e ainda não foram identificadas bioquimicamente. O estudo realizou a primeira caracterização do proteoma de *L. monocytogenes* usando técnica não eletroforética (cromatografia nanolíquida bidimensional acoplada à espectrofotometria de massa).

Para Trost et al. (2005), *L. monocytogenes* expressa mais proteínas para adaptação a condições atípicas, como a sulfatase/fosfatase Lmo0644 e a suposta proteína especializada ao frio *Lmo2016*. Proteínas da família Pur devem ser melhor investigadas, uma vez que foram específicas de *L. monocytogenes* em seus estudos. Para esse mesmo autor, sete proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos foram especificamente encontradas no sobrenadante de *L. innocua* e não no de *L. monocytogenes*. Assim, conseguiram mostrar que a diferença entre as espécies patogênicas e não patogênicas está no secretoma.

Uma das características encontradas, exclusivamente, em *L. monocytogenes*, é a presença das proteínas PbpA e MurA/Nam na parede celular, uma vez que as proteínas P60 e P45 são encontradas tanto em *L. innocua* quanto em *L. monocytogenes*. Acredita-se que a presença dessas proteínas exclusivas em *L. monocytogenes* tenha relação com a patogenicidade dessa espécie aos humanos e a ocorrência de surtos (CALVO, 2005).

### 2.1.3 Listeriose

Estima-se que nos EUA, patógenos conhecidos como sendo transmissores de doenças alimentares sejam responsáveis por 9,4 milhões de casos de doenças anualmente (SCALLAN et al., 2011).

A doença causada pela *L. monocytogenes* é denominada de listeriose. É uma doença grave e a alta mortalidade, estimada em cerca de 30%, acrescida a outras características, faz de *L. monocytogenes* um patógeno de grande preocupação em saúde e também de interesse na indústria de alimentos. Mais de 95% dos casos da doença em seres humanos são causados pelos sorovares 1/2a, 1/2b e 4b (KATHARIOUS, 2002).

Nos Estados Unidos, a listeriose corresponde a menos de 1% dos casos de doenças alimentares, mas com cerca de 28% de mortalidade (MEAD et al, 1999). A doença pode manifestar-se como gastroenterite, encefalite, meningite, aborto e infecção perinatal (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2004). No ano de 2006, foram registrados 138 casos de listeriose nos EUA, com taxa de incidência (0,31) superior à meta estabelecida pelo país (0,28), um baixo número se comparado aos 6.665 casos de salmonelose ocorridos no mesmo ano, porém sempre preocupante devido à alta mortalidade (SCALLAN, 2007).

O trato gastrintestinal é a principal porta de entrada ao micro-organismo e a gastroenterite é a forma localizada da infecção causada por *L. monocytogenes*, podendo ocorrer poucas horas após a ingestão do alimento contaminado, acometendo indivíduos saudáveis. A listeriose invasiva, por sua vez, cursando com comprometimento sistêmico, pode ocorrer dias ou semanas após a ingestão e acomete, geralmente, indivíduos imunocomprometidos como gestantes e idosos, podendo causar aborto, óbito intrauterino, meningite, endocardite, pneumonia e septicemia (MONTVILLE; MATTHEWS, 2008).

A análise microscópica e o estudo imuno-histoquímico de dez placentas provenientes de abortos e partos prematuros, coletadas no Hospital das Clínicas de Porto Alegre em 2000, mostraram que 50% das amostras foram positivas para *L. monocytogenes*, demonstrando ser essa bactéria uma importante causa de má evolução gestacional e que se torna necessário um eficaz diagnóstico e um rápido tratamento em gestantes, evitando-se as complicações embrionárias e fetais (SCHWAB; EDELWEISS, 2003).

Casos de listeriose têm aumentado em muitos países europeus nos últimos anos, por motivos ainda não totalmente esclarecidos (ALLERBERGER; WAGNER, 2010). Na França, a reemergência da listeriose tem sido atribuída à maior susceptibilidade de indivíduos idosos acima de 60 anos com alguma comorbidade, tornando-os, assim, mais predispostos a desenvolver a infecção. O ciclo de infecção e os fatores de virulência são, hoje, bem caracterizados entre as espécies, porém isso não tem diminuído ou impedido a reemergência da listeriose em muitos países, nos últimos anos (RENIER; HEBRAUD; DESVAUX, 2011).

*Listeria monocytogenes* possui várias proteínas relacionadas à sua patogenicidade, o que a torna um micro-organismo que resiste a vários fatores de estresse, facilitando a ocorrência da listeriose. Cada proteína está relacionada a uma função, desde sua entrada na célula do hospedeiro, passando pela fuga do fagossomo, sua movimentação característica dentro da célula, até a migração de uma célula a outra. Internalina A (InlA) e internalina B (InlB) foram os primeiros fatores identificados na invasão de *L. monocytogenes* à célula hospedeira e assim como outras proteínas, como Ami, p60 e FbpA, têm um importante papel na adesão e invasão à célula hospedeira. Listeriolisina O (LLO) é uma proteína relacionada ao escape dos vacúolos primário e secundário, que funcionam como mecanismos de defesa da célula contra o micro-organismo. Já a proteína polimerizadora de actina (ActA) proporciona um rápido movimento

intracelular, permitindo com que *L. monocytogenes* se movimente dentro da célula e migre de uma célula a outra. Assim, várias são as proteínas envolvidas no ciclo de infecção dentro da célula hospedeira humana e que faz de *L. monocytogenes* um micro-organismo capaz de se multiplicar e de crescer, com eficiência, dentro do organismo hospedeiro (DUSSERGET; PIZARRO-LACERDA; COSSART, 2004).

Estados Unidos, França, Inglaterra e Itália são países que já enfrentaram surtos de listeriose. Entre 1983 e 1995, cerca de 1000 indivíduos foram acometidos por listeriose devido à ingestão de carne ou leite e seus derivados contaminados (ROCOUT; COSSART, 1997). No Brasil, não há relatos de surtos, embora várias pesquisas já tenham evidenciado a presença de *L. monocytogenes* em alimentos (MELLO et al., 2008).

Algumas cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de alimentos e de ambientes são avirulentas ou fracamente virulentas, além de apenas alguns sorotipos serem responsáveis pelas infecções ocorrentes. De acordo com vários estudos, a porcentagem de cepas não virulentas varia de 1,6 a 90%. Quanto à virulência, aquelas mais citotóxicas são eliminadas mais rapidamente do organismo, por provocar uma resposta imune mais rápida, enquanto as que causam danos limitados às células do hospedeiro podem persistir por mais tempo, tendo maior chance de atingir outros órgãos e causar a doença. Acidez estomacal, alta osmolaridade e presença de sais biliares no intestino delgado são fatores que tentam impedir a colonização do micro-organismo no trato gastrintestinal humano (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008).

A infecção por *L. monocytogenes* tem sido estudada por mais de 80 anos e tem sido paradigma que continua fornecendo novas e importantes percepções tanto no campo da microbiologia, quanto no da biologia celular e imunologia. Muitos avanços foram feitos e continuam sendo, principalmente no que concerne a estudos genômicos e proteômicos, para se tentar conhecer melhor a



patogenicidade e os mecanismos de adaptação que permitem a aquisição de tolerância frente a ambientes adversos (STAVRU; ARCHAMBAUD; COSSART, 2011). Porém, mesmo com os avanços recentes obtidos nos estudos sobre a listeriose, não foi ainda possível impedir a reemergência dessa infecção, como evidenciado em vários países europeus (RENIER; HÉBRAUD; DESVAUX, 2011).

Dentre os sorovares de *L. monocytogenes*, o sorovar 1/2a, que pertence à linhagem filogenética I e os sorovares 1/2b e 4b, que pertencem à linhagem filogenética II, constituem os maiores causadores de infecção nos seres humanos. Essas duas linhagens apresentaram diferenças quanto à expressão dos genes, mostrando diferenças metabólicas importantes entre elas, revelando formas e mecanismos distintos de interação com o hospedeiro (SEVERINO et al., 2007).

## **2.2 Resistência a agentes antibacterianos**

É de conhecimento que alterações no metabolismo das bactérias, como o que ocorre na formação de biofilme e na adaptação frente a situações de estresse, modulam sua susceptibilidade às drogas antibacterianas, indicando que existe ligação entre o metabolismo da bactéria e a resistência a drogas antimicrobianas (MARTINEZ; ROJO, 2011).

De acordo com Forattini (2001), os milhões de anos de embate entre micro-organismos e o homem influenciaram na evolução da resistência deste. Assim, no hospedeiro, o sistema imunológico, as mensagens enviadas aos sensores moleculares e a atividade hormonal tenderam a minimizar a ação dos parasitos, ao mesmo tempo em que os parasitos também sofreram mudanças com o objetivo de torná-los mais resistentes aos ambientes hostis do hospedeiro.

Quando ocorre a interação entre micro-organismo e o hospedeiro, uma vez acessado o genoma do hospedeiro, três fenômenos distintos podem ocorrer: rejeição, silenciamento ou incorporação, tratando-se, assim, de verdadeira coevolução entre micro-organismo e hospedeiro. Se ambos tendem à incorporação, os dois genomas se modificam e, assim, surge nova entidade genética, ou seja, ambos evoluem. Em relação ao micro-organismo, aumenta sua capacidade de resistência a antimicrobianos habituais (TOSTA, 2001).

As defesas do hospedeiro e os mecanismos patogênicos dos micro-organismos estão constantemente em evolução. As bactérias possuem sítios de patogenicidade e genes que podem ser herdados por transmissão vertical. Os fatores físicos e sociais do hospedeiro, como privações, danos e agressões ao seu organismo, bem como o desenvolvimento de agentes terapêuticos e a existência de populações imunossuprimidas susceptíveis, contribuem para a diversidade de ambientes humanos os quais as bactérias experimentam. Isso resulta na emergência e na reemergência de patógenos e de doenças (ERNST; GUINA; MILLER, 1999).

A resistência bacteriana pode ser classificada em intrínseca e fenotípica. Por resistência intrínseca, entende-se o fenótipo específico da susceptibilidade bacteriana comum a toda uma população de dada espécie, que não foi adquirido em curto intervalo de tempo, mas que é fenótipo antigo específico de determinada espécie. Pode ser atribuída à ausência de alvo específico a certo antibiótico ou à permeabilidade reduzida em relação a certas drogas (MARTINEZ; ROJO, 2011).

A resistência fenotípica, por sua vez, é a que ocorre em situações transitórias, em população bacteriana susceptível a dado antibiótico, mas que se torna refratária a sua ação. A resistência transitória não requer alteração genética e não é hereditária, apenas surge em decorrência de mudança no metabolismo bacteriano (LEVIN; ROZEN, 2006).

O determinismo da resistência bacteriana a drogas e da virulência pode estar ligado à variabilidade genética e à evolução da espécie, favorecendo a adaptação dos micro-organismos sobreviventes, podendo, assim, vencer as barreiras do hospedeiro (MALMSTRO; MALMSTRO; AEBERSOLD, 2011).

Martinez e Rojo (2011) explicam que a susceptibilidade a antibacterianos pode ser modulada pela inativação de genes envolvidos no metabolismo bacteriano e também por reguladores globais do metabolismo do carbono e do nitrogênio.

Em relação a mecanismos de adaptação e conseqüente evolução, a duplicação de genes é um processo evolutivo normal em micro-organismos, sendo o gene duplicado, geralmente, reduzido a pseudogene, desaparecendo do genoma. Porém, alguns parálogos são retidos para beneficiar o organismo em processo de adaptação a determinadas condições ambientais, sendo associados à síntese de energia, motilidade celular, transporte de íons e a mecanismos de defesa (BRATLIE et al., 2010).

A resistência, que também pode ser transferida entre espécies, pode ser mediada por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e *transposons* também por bombas de efluxo, como ocorre em *L. monocytogenes*. Assim, a resistência pode ocorrer por conjugação ou pelo mecanismo das bombas de efluxo. O trato gastrointestinal humano mostrou-se local de transmissão de genes de resistência enterococos e estreptococos para *L. monocytogenes* (LUNGU et al., 2011).

Shin et al. (2010) observaram que a atividade da proteína sigma  $\beta$ , em *L. monocytogenes*, é induzida após adição do antibiótico vancomicina (antibiótico glicopeptídeo que inibe a síntese de parede celular, podendo causar lise osmótica da célula), sugerindo contribuição dessa proteína na manutenção da integridade da parede celular.

Estudo publicado por Aarestrup, Knochek e Hasman (2007), avaliando a concentração inibitória mínima (CIM) de vários antibióticos e agentes sanitizantes sobre cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos, mostrou possível resistência intrínseca da bactéria ao antibiótico ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração. Nove dos 114 isolados, todos de produtos cárneos, mostraram susceptibilidade reduzida ao cloreto de benzalcônio.

Lungu et al. (2011) relataram que o aumento da resistência a antibióticos em *L. monocytogenes* tem ocorrido no mundo, talvez devido ao seu uso indiscriminado na agricultura e ao uso indevido em seres humanos nos tratamentos de processos infecciosos. Reduzindo-se o uso excessivo, reduz-se a emergência de mais bactérias resistentes, porém aquelas que já são resistentes desaparecem em velocidade bem mais lenta do que a descoberta de novos antibióticos. Novas alternativas precisam ser criadas para se impedir o aumento das infecções causadas por *L. monocytogenes* de origem alimentar, uma vez que a resistência a antibióticos é algo real e preocupante.

Em parte, como resposta ao aumento da resistência antibacteriana nos micro-organismos presentes nos alimentos, a União Europeia banuiu o uso de antibióticos como aditivos alimentares animais, com exceção dos coccidiostáticos, desde janeiro de 2006 (CASTANON, 2007).

### **2.3 Agentes antimicrobianos**

A emergência de micro-organismos com resistência combinada aos antimicrobianos e aos desinfetantes é um desafio tanto para a indústria de alimentos quanto para a área médica. A presença de determinantes de resistência aos antibióticos, intimamente ligados aos determinantes de resistência aos desinfetantes, pode levar à cosseleção durante a desinfecção ou terapia com antibióticos em hospital ou durante desinfecção na indústria de alimentos. Essa

resistência bacteriana aos desinfetantes pode ser intrínseca ou extrínseca por adaptação (SIDHU; SORUM; HOLCK, 2002).

### 2.3.1 Desinfetantes químicos

Desinfetantes químicos são usados, extensivamente, em indústrias de alimentos, hospitais e residências, fazendo parte essencial do controle de crescimento microbiano e da ocorrência de infecções. De acordo com McDonnell e Russell (1999), do ponto de vista conceitual, biocida é um termo geral destinado a caracterizar um agente químico de amplo espectro que objetiva à inativação de um micro-organismo, seja inibindo seu crescimento ou levando a sua morte. Antissépticos são definidos como biocidas que destroem ou inibem o crescimento de micro-organismos em tecidos vivos e desinfetantes são similares, porém são utilizados, geralmente, em objetos ou superfícies. Já os antibióticos são definidos como substâncias naturais ou substâncias orgânicas sintéticas que agem inibindo ou destruindo, seletivamente, uma bactéria ou outro micro-organismo.

Desinfetantes químicos têm sido utilizados por mais de cem anos pela sociedade, fornecendo inúmeros benefícios no controle do crescimento de micro-organismos, tanto no processamento de alimentos quanto na área médica. São, geralmente, usados em altas concentrações, diferentemente dos antibióticos, que são utilizados em concentrações próximas à concentração mínima inibitória (KASTBJERG; GRAM, 2012).

A resistência aos desinfetantes químicos ocorre, principalmente, devido à desinfecção inadequada que pode levar à resistência como o resultado do processo de seleção ou devido à exposição regular a concentrações subletais do desinfetante (AASE, 2000). Estudos mostraram que bactérias *Gram* positivas, como *L. monocytogenes*, já apresentam resistência a alguns desses agentes, tais

quais os compostos quaternários de amônio (AASE et al., 2000; HEIR et al., 1995; SIDHU et al., 2001; SIDHU; LANGSRUD; HOLCK, 2001).

Quanto aos mecanismos de ação, pode-se citar a desestruturação da membrana plasmática, a dissipação da força próton motiva, as interações com sistemas enzimáticos, ácidos nucleicos, ribossomos ou outros constituintes celulares. A tolerância bacteriana aos biocidas pode ser devido à resistência intrínseca ou a fatores adquiridos (MORENTE, 2013).

### **2.3.1.1 Compostos quaternários de amônio**

A atividade antimicrobiana dos compostos quaternários de amônio foi descoberta em 1935 e a partir daí passaram a ter grande importância comercial. Os mais comumente utilizados como antissépticos e desinfetantes são os sais de monoalquil trimetil amônio, monoalquil dimetil benzil amônio (cloreto de benzalcônio) e o amônio heteroaromático, entre outros. São amplamente utilizados na indústria de alimentos como desinfetantes de uso geral, pela baixa toxicidade, baixa ação corrosiva e ação surfactante e também como sanificantes de pisos, paredes, equipamentos e utensílios. Penetra bem em superfícies porosas formando um filme bacteriostático sobre a superfície. É aceito que atuem principalmente na membrana citoplasmática, causando alteração estrutural e perda na sua integridade, junto ao extravasamento de componentes celulares devido ao rompimento da membrana, além de desnaturação de proteínas e de enzimas (MIYAGI; TIMENETSKY; ALTERTHUM, 2000).

A resistência a compostos quaternários de amônio já foi comprovada em bactérias *Gram* positivas e negativas, determinada por alterações na membrana celular. Em *L. monocytogenes*, as bombas de efluxo MdrL e a Lde parecem estar associadas à resistência a múltiplas drogas. Assim, quando pressão seletiva é aplicada, mutantes com alta concentração dessas bombas serão selecionados,

reforçando o processo adaptativo com aquisição de resistência. Foi demonstrado que mecanismo de bomba de efluxo similar pode ser induzido pelo cloreto de benzalcônio em certas cepas de *L. monocytogenes* (ROMANOVA et al., 2006).

Vários trabalhos evidenciaram resistência a compostos quaternários de amônio em vários micro-organismos associados aos alimentos, como *L. monocytogenes*, estafilococos e lactobacilos (AASE et al., 2000; HEIR et al., 2004; SIDHU et al., 2001, SIDHU; LANGSRUD; HOLCK 2001).

### **2.3.2 Óleos essenciais**

Devido ao atual problema da resistência bacteriana a agentes antimicrobianos, as empresas farmacêuticas têm aumentado o interesse pela busca de novas substâncias a partir de produtos naturais, principalmente em espécies de plantas utilizadas na medicina popular, no combate a diversas doenças, tais como resfriados, bronquites, doenças respiratórias, gastroenterites, diarreias, infecções urinárias, entre outras. Com base nesse interesse, vários estudos e pesquisas com óleos essenciais têm sido desenvolvidos (DIAS, 2009).

#### **2.3.2.1 Definição e composição**

Os óleos essenciais são compostos metabólicos secundários. Existem, basicamente, dois tipos de compostos metabólicos: àqueles originados do metabolismo primário e os originados do metabolismo secundário. Os compostos metabólicos primários são os relacionados, diretamente, com a sobrevivência do organismo, ou seja, com as funções vitais como crescimento e reprodução. Os compostos metabólicos secundários são os relacionados, principalmente, à defesa do organismo, sendo assim ligados, de maneira indireta, à sobrevivência. São utilizados, nesse contexto, para atrair outras espécies ou

para se defender de predadores (SANTOS, 2007) e são produzidos em processos como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, assimilação, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos (GUIMARÃES, 2007).

A Resolução – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, conceitua os óleos essenciais como produtos voláteis de origem vegetal, obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor-d'água, destilação à pressão reduzida ou outro método adequado) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2007). São definidos, pela *International Standard Organization* (ISO), como produtos obtidos de partes das plantas, através da destilação por arraste com vapor-d'água, bem como produtos obtidos pela expressão de pericarpos de frutos cítricos. São citadas, na literatura, outras técnicas de extração de compostos voláteis como hidrodestilação, enfloração (enfleurage) e utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico.

De acordo com Simões et al. (2007), óleos essenciais são misturas complexas de compostos que conferem aromas agradáveis e sabores característicos. Em sua maioria, são instáveis, especialmente na presença de luz, calor, umidade, ar e metais. Sua síntese e composição em plantas são influenciadas pelo genótipo, pelo estágio de desenvolvimento da planta e pelas condições ambientais (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Os óleos essenciais constituem-se de mistura de hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos e outros compostos, em maior ou menor proporção, de acordo com a parte da planta do



qual foram extraídos e de acordo com o método de extração (OUSSALAH et al., 2007).

Condições ambientais como temperatura, umidade relativa, período de exposição ao sol e regime de ventos exercem influência direta sobre a composição dos óleos essenciais, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas de estocagem de óleo essencial em sua superfície (SALGADO, 2005).

Os óleos essenciais podem estar localizados em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquisolisígenas. Das plantas, podem ser extraídos do todo ou apenas de alguma parte, como raiz, caule, casca, sementes, folhas ou frutos, sendo o método de extração utilizado variável de acordo com a parte em questão (OUSSALAH et al., 2007).

A composição do óleo essencial varia em função do método de extração utilizado devido à grande labilidade dos seus constituintes. São compostos principalmente por terpenoides, destacando-se os mono e sesquiterpenos e por fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas. Os terpenoides constituem o principal grupo encontrado na constituição dos óleos essenciais, sendo formados pela união de unidades isoprênicas, que são unidades formadas por cinco átomos de carbono ( $-C_5H_8$ ). De acordo com o número de unidades isoprênicas, os terpenos podem se classificar em hemi, mono, di, tri, tetra e sesquiterpenos, principalmente. Os monoterpenos são substâncias voláteis pela sua baixa massa molecular, podendo ocorrer nas células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos, pelos glandulares e bolsas lisígenas (SIMÕES et al., 2007).

Os monoterpenos, formados por duas unidades isoprênicas, possui 10 átomos de carbono e é o composto encontrado em mais de 90% dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

A figura 2 ilustra os principais componentes dos óleos essenciais.

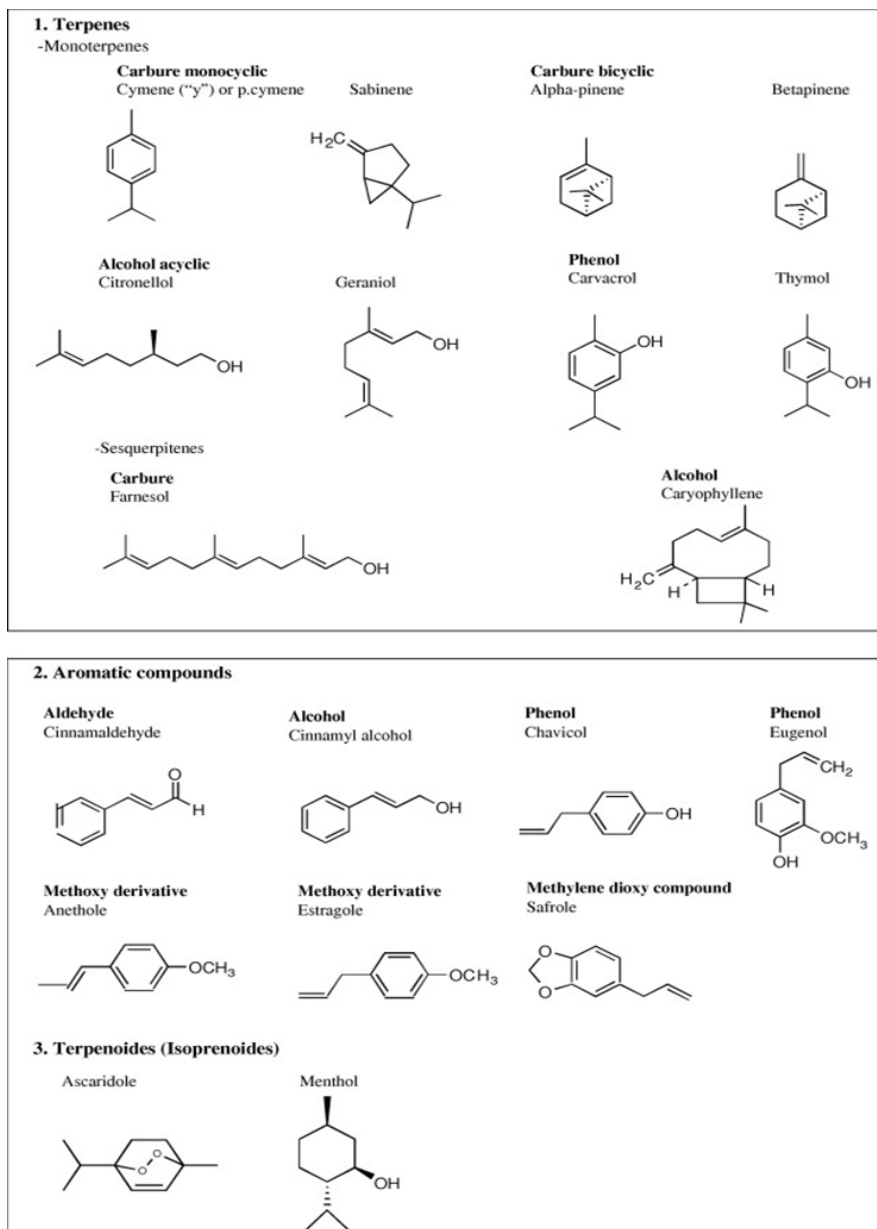


Figura 2 Principais constituintes dos óleos essenciais  
Fonte: Bakkali et al. (2008)

Bizzo (2009) cita que há 300 óleos essenciais de importância comercial no mundo. Os 18 principais podem ser vistos na Tabela abaixo:

Tabela 2 Os principais óleos essenciais no mercado mundial

Óleo essencial	Espécie
Laranja (Brasil)	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Menta japonesa (Índia)	<i>Mentha arvensis</i> L. f. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes
Eucalipto (tipo cineol)	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill., <i>E. polybractea</i> R.T. Baker e <i>Eucalyptus</i> spp.
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt e <i>C. nardus</i> (L.) Rendle
Hortelã-pimenta	<i>Mentha x piperita</i> L.
Limão	<i>Citrus limon</i> (L.) N.L. Burm.
Eucalipto (tipo citronela)	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. e L. M. Perry
Cedro (EUA)	<i>Juniperus virginiana</i> L. e <i>J. ashei</i> Buchholz
Lima destilada (Brasil)	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm. & Panz.) Swingle
Spearmint (nativa)	<i>Mentha spicata</i> L.
Cedro (China)	<i>Chamaecyparis funebris</i> (Endl.) Franco
Lavandim	<i>Lavandula intermedia</i> Emeric ex Loisel
Sassafrás (China)	<i>Cinnamomum micranthum</i> (Hayata) Hayata
Cânfora	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl.
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> L.
Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i> Macfady
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.

Fonte: Bizzo (2009)

### 2.3.2.2 Biossíntese

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dos intermediários principais: o ácido

chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico dá origem aos aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, tais como taninos hidrolisáveis, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos (triptofano e fenilalanina/ tirosina) e os fenilpropanoides.

A combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato origina as antraquinonas, flavonoides e os taninos condensados. Os derivados do acetato podem ser produzidos pela via ciclo do ácido cítrico, dando origem aos alcaloides derivados dos aminoácidos alifáticos, ornitina e lisina, e aos glicosídeos e glicosinolatos; pela via do mevalonato, originam os derivados do isopreno e, pela condensação da acetil CoA, formam-se os ácidos graxos e acetogeninas (SIMÕES et al., 2007).

### **2.3.2.3 Propriedades dos óleos essenciais**

Pereira et al. (2004) relataram que plantas, condimentos e seus óleos essenciais têm sido estudados devido a suas propriedades antimicrobianas em micro-organismos patogênicos presentes em alimentos, sendo que os princípios ativos antimicrobianos encontram-se no óleo essencial e que o mecanismo inibitório sobre o micro-organismo depende da natureza do composto.

Em amplo trabalho de revisão sobre as propriedades dos óleos essenciais, Edris (2007) relatou o efeito benéfico contra o câncer, ações benéficas no sistema cardiovascular, ação antibacteriana, antiviral, antioxidante e antidiabetogênica, além do uso em aromaterapia e massagens.

Estudos mostram que os compostos majoritários, grupo de um a três componentes principais dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008) têm, geralmente, maior poder inibitório se usado isoladamente, comparando-se ao próprio óleo essencial do qual faz parte, sobre determinados micro-organismos. Isso ocorre devido ao uso em alta concentração. Aldeído cinâmico e eugenol,

compostos majoritários de óleos essenciais de canela e cravo, respectivamente, obtiveram melhor atividade antimicrobiana, em certos micro-organismos, do que seus óleos essenciais (DIAS, 2009).

#### **2.3.2.4 Mecanismos de ação antibacteriana**

Os óleos essenciais são lipofílicos, penetrando o envelope celular e membrana citoplasmática, destruindo a camada de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípides, alterando sua permeabilidade. Em bactérias, a alteração da permeabilidade leva à perda de íons com perda do potencial de membrana, colapso da bomba de prótons e depleção de ATP, coagulação citoplasmática e clivagem de macromoléculas. Essa citotoxicidade dos óleos essenciais confere ação antimicrobiana e tem uso promissor (SOLOMAKOS et al., 2008).

Moreira et al. (2005), afirmam que os compostos fenólicos dos óleos essenciais se ligam à bicamada fosfolipídica da membrana celular aumentando sua permeabilidade e extravasando os constituintes intracelulares ou danificando o sistema enzimático da célula. Souza et al. (2010) afirmam que mesmo pequenas mudanças ocorridas na estrutura da membrana citoplasmática podem afetar o metabolismo, incluindo a síntese de macromoléculas.

Estudos mostram que bactérias *Gram* positivas são mais susceptíveis aos óleos essenciais do que as *Gram* negativas (BURT, 2004; HUSSAIN et al., 2010; INOUE; TAKIZAWA; YAMAGUCHI, 2001; SAHIN et al., 2004; SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998) e essa menor atividade contra *Gram* negativas pode ser devido à estrutura de sua parede celular, principalmente devido à presença de lipoproteínas e lipopolissacarídeos, que funcionam como barreira aos compostos hidrofóbicos (INOUE; TAKIZAWA; YAMAGUCHI, 2001; MANN; COX; MARKHAM, 2000).

Andrade et al. (2012) avaliaram a ação anti-bacteriana dos óleos essenciais de citronela, canela e gengibre sobre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginos*, observando que o óleo essencial de canela foi o mais efetivo em inibir o crescimento bacteriano e essa alta atividade deve-se, provavelmente, à alta concentração do composto majoritário aldeído cinâmico, sendo o mecanismo de ação, talvez, semelhante ao de outros aldeídos, envolvendo danos a lipídeos e proteínas.

A figura 3 ilustra locais e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana.

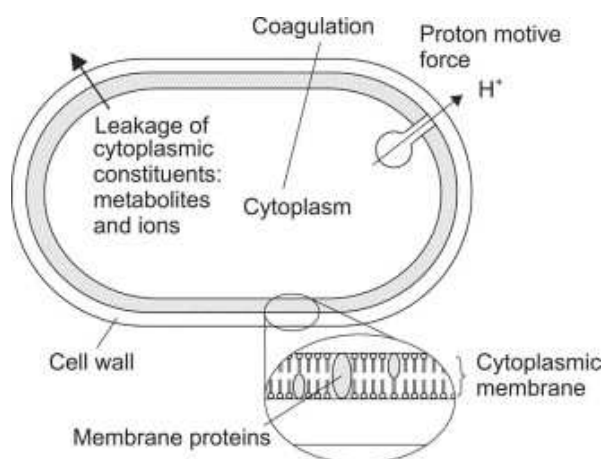


Figura 3 Sítios e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana  
Fonte: Modificado de Burt (2004)

### 2.3.2.5 Óleo essencial de gengibre

O gengibre (*Zingiber officinale*), especiaria muito utilizada em alimentos, é reconhecido por suas propriedades curativas na medicina tradicional. Tem ação comprovada em várias doenças gastrintestinais, como

náuseas, vômitos, desconfortos abdominais e diarreia, no tratamento de artrite, reumatismo, dor, desconforto muscular e várias doenças cardiovasculares e metabólicas. Além dessas, estudos mostram que o gengibre apresenta ação anticancerígena em grande variedade de modelos experimentais (TUNTIWECHAPIKUL et al., 2010).

Os chineses têm usado o gengibre por pelo menos 2500 anos para tratamento de diversas desordens, principalmente do trato gastrintestinal, trato respiratório e também frente a afecções sanguíneas. Na Malásia e Indonésia, sopa de gengibre é dada às mulheres por cerca de um mês após o parto, para ajudar a aquecê-las e eliminar as impurezas. Na medicina árabe é utilizado como afrodisíaco e alguns países africanos o usam como repelente de mosquito. Foi distribuído pelos continentes na época das grandes navegações e com o comércio de especiarias (DUKE; AYENSU, 1985).

Os constituintes mais ativos do gengibre residem nos seus óleos voláteis, que perfazem o total de 1-3% de seu peso seco. O óleo essencial do gengibre é encontrado, principalmente, no rizoma. Os principais compostos químicos ativos do gengibre são os compostos fenólicos e sesquiterpenos, sendo também constituídos por cetonas, ácidos e vários outros (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996). Cerca de 50 componentes presentes no óleo já foram caracterizados, sendo a maioria monoterpenos (EVANS; SAUNDERS, 2002).

Machado et al. (2003) observaram nos sistemas de produção orgânico e convencional do gengibre produzido em Morretes, os seguintes constituintes, respectivamente:  $\alpha$ -zingibereno (20,6%; 24,3%), geranial (21,6%; 17,7%),  $\beta$ -sesquifelandreno (8,5%; 11%),  $\alpha$ -farneseno (6,9%; 8%), cineol (6,0%; 7%), neral (8,2%; 4,9%), geraniol (4,5%; 6,9%) e  $\gamma$ -curcumeno (6,0%; 0,0%). Jolad (2005), avaliando a composição do óleo essencial de gengibre produzido no Havaí, verificou a presença de 63 constituintes, os quais têm sido utilizados farmacologicamente com sucesso nos tratamentos de inflamações crônicas,

obstruções pulmonares, asma e artrites reumatóides. Segundo Sakamura (1987), durante seu armazenamento ocorre cerca de 60% de aumento dos teores dos constituintes neral e geranial e decréscimo de geraniol e acetato de geranila.

Dabague et al. (2011) concluíram que o teor dos constituintes majoritários do óleo essencial de rizomas de gengibre de diferentes procedências foram o geranial (23,6 a 30,3%); neral (10 a 14,8%); geraniol (5,8 a 7,6%); acetato de geranila (3,5 a 4,5%); eucaliptol (3,6 a 5,9%); canfeno (2,8 a 5,8%), zingibereno (2,3 a 5%);  $\beta$ -felandreno (0,5 a 4%) e  $\beta$ -bisaboleno (2,8-3,4%). Mostraram também que o teor de óleos essenciais reduziu com o período de secagem. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que altos teores de citral (geranial e neral) são observados no óleo essencial de rizomas após secagem. Maiores níveis desses constituintes são de interesse comercial para as indústrias de aroma e fragrância (WOHLMUTH et al., 2006) e, portanto, a secagem de rizomas em temperatura ambiente pode aumentar o valor comercial do óleo essencial. Observaram que os teores de geranial e neral foram superiores enquanto os teores de  $\alpha$ -zingibereno foram inferiores comparados aos resultados obtidos por Machado et al. (2003).

Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (1998) mostraram em trabalho o qual avaliou a inibição do crescimento de cinco importantes patógenos alimentares (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*), por óleos essenciais de 21 plantas, que o óleo essencial de gengibre inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* em concentrações maiores que 1%, o que foi maior que as concentrações de cravo e de canela necessárias à inibição, as quais se mostraram eficazes entre 0-0,3%.



#### 2.4 Resposta de *L. monocytogenes* ao estresse ácido

Juntamente com a desinfecção, a acidificação é um importante mecanismo de controle do crescimento de micro-organismos no processamento de alimentos. No entanto, é relatado que os microrganismos podem desenvolver resistência aumentada ao estresse ácido quando expostos a condições ácidas subletais (LEENANON; DRAKE, 2001; TIWARI et al., 2004)

O estresse ácido no qual a *L. monocytogenes* está envolvida inclui os ácidos orgânicos usados como conservantes e desinfetantes na indústria de alimentos e também os ácidos inorgânicos encontrados no trato gastrointestinal de hospedeiros (SONI; NANNAPANENI; TASARA, 2011).

Nas etapas de processamento de alimentos, desinfetantes químicos são usados em superfícies que entram em contato com o alimento em cozinhas, centros de cuidados e em áreas de preparação de fórmulas alimentares em hospitais (MARRIOTT; GRAVANI, 2006).

O mecanismo da resposta de tolerância ácida desenvolvido por determinadas bactérias constitui sério problema para a saúde pública, pois aumenta a capacidade de sobrevivência do micro-organismo sob condições ácidas letais em habitats naturais, alimentos e hospedeiros, aumentando dessa forma, a virulência dessas estirpes (BONNET; MONTVILLE, 2005).

Foi mostrado, por Lin, Lee e Chou (2011), que cepas de *L. monocytogenes* tiveram sua resistência aumentada a agentes desinfetantes à base de cloro e composto quaternário de amônio, quando expostas previamente a ambientes ácidos, mostrando resposta de adaptação à acidez a qual foram submetidas.

O perfil das proteínas do estresse ácido indica que proteínas envolvidas na respiração, transporte de osmólitos, resistência ao estresse, reparo de proteínas, síntese de flagelo e metabolismo são recrutados como parte da

resposta ao estresse. A permeabilidade da célula a prótons envolve alteração da composição da membrana citoplasmática. 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; COTTER; GAHAN; HILL, 2000).

O gene Sigma  $\beta$  coordena a transcrição de genes relacionados à resposta ao estresse geral. Mutantes de *L. monocytogenes* que perderam o gene Sigma  $\beta$  têm variedade de fenótipos de sensibilidade ao estresse como o baixo pH, estresse osmótico, salinidade, bacteriocinas, alta pressão hidrostática, limitação de carbono e alta temperatura (ABRAM et al., 2008). O regulador de estresse geral Sigma  $\beta$ , presente em muitas bactérias *Gram* positivas, mostrou-se responsável pela sobrevivência de cepas bacterianas após exposição a situações de estresse ácido, oxidativo e energético (OLIVER et al., 2010).

O gene *lmo0038* está envolvido no crescimento de *L. monocytogenes* em situações de estresse, como em ambientes com acidez ou calor e também está relacionado à sua virulência. Estudo feito por Chen et al. (2009) comprovou que o gene *lmo0038* é específico para *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.

Quando expostas à média acidez (pH 5,5), células de *L. monocytogenes* tornaram-se capazes de crescer em acidez severa (pH 3,5), devido ao mecanismo denominado de resposta de tolerância ácida (Acid Tolerance Response: ATR). 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 (NAJJAR; CHIKINDAS; MONTVILLE, 2009).

Em estudo feito por Mastronicolis et al. (2010), onde foi avaliado o efeito do estresse ácido sobre a composição lipídica de *L. monocytogenes* em pH 5,5, os mecanismos de adaptação da bactéria ocasionaram aumento dos ácidos graxos de cadeia curta saturados e aumento da porcentagem de lipídeos neutros, com conseqüente redução da permeabilidade da membrana. Na presença de ácido benzoico, em pH neutro, alteração similar ocorreu com os ácidos graxos e nenhuma alteração com os lipídeos neutros, porém, houve redução na quantidade relativa de fosfolípidos o que determinou diminuição da permeabilidade de membrana.

Estudos mostram que o ácido láctico, quando usado para induzir a resposta de tolerância ácida em bactérias em meio BHI (*Brain Heart Infusion*), reduz a densidade celular à medida que se reduz o pH. O pH de 5,5 foi o valor mais baixo de viabilidade, não havendo crescimento em  $\text{pH} \leq 5$  nas células que não foram submetidas ao estresse ácido, sendo chamadas ATR (-). Houve viabilidade em pH de 3,5 apenas naquelas expostas a um pH anterior de 5,5, tendo sido induzida, nessas células, a resposta de tolerância ácida (NAJJAR; CHIKINDAS; MONTVILLE, 2009).

## **2.5 Adaptação cruzada**

Foi mostrado, em estudos, que a exposição de *L. monocytogenes* a estresse subletal induz o desenvolvimento e crescimento do micro-organismo condicionado ao estresse, que é fisiologicamente mais tolerante a níveis aumentados do mesmo ou de diferentes fatores estressantes. Como exemplo, células bacterianas de *L. monocytogenes* expostas a estresse ácido subletal apresentam resistência aumentada a níveis maiores de estresse ácido e tornam-se

mais tolerantes ao estresse térmico e osmótico (GAHAN; O DRISCOLL; HILL, 1996).

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).

*Listeria monocytogenes* isoladas da cadeia de produção de alimentos apresentaram resistência ou susceptibilidade antibacteriana diminuída a antibióticos para os quais a bactéria apresenta, normalmente, sensibilidade. Apesar de não ter sido observado resistência aos antibióticos, normalmente usados no tratamento da listeriose, algumas cepas isoladas, incluindo os sorovares 1/2a e 4b, relacionados à listeriose, apresentaram resistência a determinados antibióticos. Algumas cepas tiveram a concentração mínima inibitória de cloreto de benzalcônio aumentada quando expostas, previamente, ao antibiótico ciprofloxacina (KOVACEVIC, 2013).

Desinfetantes químicos são muito usados na indústria de alimentos. Os mecanismos de resistência cruzada a antibióticos, nas bactérias resistentes a desinfetantes, são alvo de inúmeros estudos. Os desinfetantes mais estudados são os compostos quaternários de amônio e o peróxido de hidrogênio, sendo que a resistência aos quaternários de amônio é acompanhada pela expressão de bombas de efluxo e outros mecanismos menos específicos (CHAPMAN, 2003).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Micro-organismo e cultura estoque**

As cepas bacterianas utilizadas foram *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 sorotipo 4d e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 sorotipo 1/2c, adquiridas da Seção de Coleção de Culturas da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-SP).

A cultura estoque foi mantida congelada em caldo triptona de soja acrescido de 0,6% (m/v) de extrato de levedura (TSB-YE) e 20% de glicerol.

#### **3.2 Óleo essencial**

O óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*) foi adquirido na empresa FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda.

#### **3.3 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 TSB-YE, sendo incubado a 37°C por 24 horas.

Após esse período, alíquota de 100µL da cultura foi transferida para 150mL de TSB-YE e incubada a 37°C até a obtenção de cerca de 10<sup>8</sup> UFC/mL

(D<sub>0 600nm</sub>= 0,305).

A padronização do inóculo foi realizada por meio da elaboração de curva de crescimento. O crescimento do micro-organismo foi monitorado por espectrometria por meio da densidade ótica a 600nm e contagem direta em placas contendo ágar triptona de soja acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE).

### **3.4 Determinação do pH mínimo de crescimento e mínimo inibitório de *L. monocytogenes***

A influência do pH no crescimento de *L. monocytogenes* foi avaliada em microplacas de poliestireno de 96 cavidades. Em cada cavidade, foram dispensados 140µL de TSB-YE, com pH ajustado com ácido clorídrico para 7,0; 6,5; 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0 e 3,5. O mesmo procedimento foi realizado, em outra microplaca, porém, ajustando-se o pH com ácido cítrico. Após adição do meio de cultura e ajustados os valores de pH, 10µL de cultura padronizada foram adicionadas em cada poço. Foi lida a absorbância a 600nm em leitor de microplacas (Anthos 2010) antes e depois da incubação por 24 horas, a 37°C. O

pH mínimo inibitório foi o menor valor capaz de inibir, completamente, o crescimento bacteriano. O pH mínimo de crescimento foi aquele imediatamente acima do pH mínimo inibitório.

### **3.5 Indução da resposta de tolerância ácida**

Após ser determinado o pH mínimo de crescimento, o pH 5,5 (valor acima do mínimo de crescimento) foi utilizado para avaliar a indução da resposta de tolerância ácida. Em tubo tipo Falcon contendo TSB-YE com pH 5,5, foi adicionado alíquota de cultura padronizada, obtendo-se a concentração final de  $10^5$ UFC/mL. A cultura foi incubada a 37°C por uma hora (NAJJAR; CHIKINDAS; MONTVILLE, 2009). Após esse período, alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos e centrifugadas (10000xg/ 10 minutos) e as células recuperadas. Essas foram ressuspensas em TSB-YE e foi lida a absorbância.

Utilizando-se microplacas, em cada cavidade foram dispensados 140µL de TSB-YE, com pH ajustado com ácido clorídrico para 7,0; 6,5; 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0 e 3,5. O mesmo procedimento foi realizado, em outra microplaca, porém, ajustando-se o pH com ácido cítrico. Após adição do meio de cultura e ajustados os valores de pH, 10µL da cultura previamente exposta ao pH 5,5 foram adicionados em cada poço. Foi lida a absorbância a 600nm em leitor de microplacas (Anthos 2010) antes e depois da incubação por 24 horas, a 37°C.

### **3.6 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de óleo essencial de gengibre**

Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo TSB-YE, em microplacas de poliestireno de 96 cavidades com concentrações padronizadas de

25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39% de óleo essencial de gengibre. A homogeneização do óleo essencial de gengibre com o meio de cultivo foi realizada pela adição de 0,5% (v/v) de Tween 80, atingindo-se o volume de

140 $\mu$ L em cada cavidade. Alíquota de 10 $\mu$ L da cultura padronizada ( $10^8$

UFC/mL) foi adicionada a cada cavidade. Para cada concentração, cavidades contendo o meio de cultura e o agente antibacteriano foram preparadas sem adição do inóculo bacteriano. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A absorbância a 600nm em leitor de microplacas (Anthos 2010) foi lida antes e depois da incubação. A CMI foi a menor concentração de óleo essencial de gengibre capaz de inibir, completamente, o crescimento bacteriano.

Como controle negativo, foi utilizado o composto quaternário de amônio com CMI de 1%, segundo recomendação do fabricante.

### **3.7 Indução de tolerância ao óleo essencial de gengibre e ao composto quaternário de amônio**

Para se induzir a tolerância ao óleo essencial de gengibre e ao composto quaternário de amônio, a dose subletal foi calculada utilizando-se medida proporcional à CMI de óleo essencial de gengibre e do composto quaternário de amônio, respectivamente, 0,78% e 0,25%, equivalentes à CMI/4 (LUDÉN et al., 2003). Os antimicrobianos, nas doses subletais, foram adicionados a 10 mL de TSB-YE para quaternário de amônio e TSB-YE acrescido de Tween 80 para óleo essencial de gengibre, em tubos de ensaio, sendo homogeneizadas. Posteriormente, foi adicionado o inóculo bacteriano, obtendo-se a concentração de  $10^5$ UFC/mL. Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C por 6 horas.



Após a incubação por 6 horas, foram retiradas alíquotas de 1 mL das culturas e centrifugadas (10000 x g/ 10 minutos) em microtubos. As células foram recuperadas, ressuspensas em meio TSB-YE, sendo a suspensão padronizada em  $10^5$  UFC/mL. Em microplacas de 96 cavidades contendo o meio de cultivo e o agente antibacteriano, sendo o óleo essencial de gengibre homogeneizado com Tween 80 a 0,5% (v/v), alíquota de 10 $\mu$ L da cultura padronizada ( $10^5$  UFC/mL) exposta à CMI dos agentes antibacterianos foi adicionada a cada cavidade. Para cada concentração, cavidades contendo o meio de cultura e o agente antibacteriano foram preparadas sem o inóculo bacteriano. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A absorbância a 600nm em leitor de microplacas (Anthos 2010) foi lida antes e depois da incubação.

### **3.8 Indução de adaptação cruzada**

Após a exposição à concentração subletal de óleo essencial de gengibre de 0,78%, correspondente à CMI/4, por seis horas, as células bacterianas foram recuperadas por centrifugação (10000xg/ 10 minutos) e ressuspensas em meio

TSB-YE. Alíquotas de 10 $\mu$ L da suspensão padronizada ( $10^5$  UFC/mL) foram

adicionadas à microplaca de 96 cavidades contendo 140 $\mu$ L de TSB-YE com pH ajustado com HCl para 4,5; 4,0 e 3,5. A microplaca foi incubada a 37°C por 24 horas e medidas as absorbâncias, a 600nm, antes e após a incubação.

### **3.9 Análises estatísticas**

Para avaliar os efeitos dos tratamentos, foi realizado um experimento segundo o delineamento inteiramente casualizado. Os resultados obtidos para pH mínimo inibitório e mínimo de crescimento, indução da resposta de tolerância ácida, determinação da CMI de óleo essencial de gengibre, indução de tolerância ao óleo essencial de gengibre e ao composto quaternário de amônio e indução de tolerância cruzada, foram submetidos à análise de variância. Para comparação das médias foi utilizado o teste de Scott-Knott, a 5% de significância. Para a indução de tolerância ácida, foi utilizada também a análise de regressão linear.

Para as análises de variância, análise de regressão e testes de médias, foi utilizado o software R.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação do pH mínimo inibitório e pH mínimo de crescimento de *L. monocytogenes*

Para *L. monocytogenes* ATCC 19117, tanto para o HCl quanto para o ácido cítrico, o pH mínimo inibitório, ou seja, o menor valor de pH capaz de inibir, completamente, o crescimento bacteriano, foi 4,5. O pH mínimo de crescimento, ou seja, aquele valor imediatamente acima do pH mínimo inibitório foi 5,0.

Houve um efeito muito semelhante entre o ácido clorídrico e o ácido cítrico quanto à inibição do crescimento de *L. monocytogenes*, havendo crescimento bacteriano a partir de pH 5,0.

A tabela 3 representa a relação entre o pH ajustado com ácido cítrico e HCl e o crescimento (Log UFC/mL) de *L. monocytogenes*.

Tabela 3 Relação entre o pH ajustado com ácido cítrico e HCl e o crescimento (Log UFC/mL) de *L. monocytogenes*

pH	Log UFC/mL	
	Ácido Cítrico	HCl
3,5	-	- *
4,0	-	- *
4,5	-	- *
5	9,62	9,68
5,5	9,68	9,70
6	9,81	9,70
6,5	9,85	9,81
7	9,89	9,88

\*Ausência de crescimento

Na literatura, encontram-se valores de pH mínimo de crescimento de *L. monocytogenes* de 4,3 (RYSER; MARTH, 2007), 4,5 (SEVERINO, 2007), 4,4 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO / WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2004) e 5,5 (NAJJAR; CHIKINDAS; MONTVILLE, 2004), valores bem próximos aos testados no presente estudo. Valores como 4,3 e 4,4 não foram testados e poderiam até ser encontrados caso intervalos pequenos de pH fossem sido utilizados.

Tanto o pH mínimo de crescimento quanto o pH mínimo inibitório de *L. monocytogenes* podem ter relação com o meio utilizado, a temperatura de incubação, a natureza do ácido e a cepa bacteriana. Ácidos diferentes, sejam orgânicos ou inorgânicos, por mecanismos de ação ou intensidades de ação diferentes, promovem variados níveis de estresse no micro-organismo inibindo, em maior ou menor intensidade, o seu crescimento.

Wang e Johnson (1997) verificaram que as maiores taxas de crescimento de *L. monocytogenes* ocorreram em valores de pH iguais ou superiores a 6,0, verificando-se desenvolvimento em escala muito menor, ou a sua ausência, em ambientes com pH inferior a 5,0. Observaram ainda que em produtos alimentícios ácidos (pH < 4,5), *L. monocytogenes* não sobrevivia.

O mesmo valor de pH 4,5 foi encontrado no presente estudo, sendo esse o mínimo valor capaz de inibir, totalmente, o crescimento de *L. monocytogenes*. Verificou-se, ainda, que à medida que os valores de pH foram aumentados, aproximando-se de 7,0 foi maior o crescimento bacteriano. Isso pode ser explicado, pois o pH ótimo de crescimento de *L. monocytogenes* encontra-se próximo à neutralidade, conforme trabalhos de FAO/WHO (2004), Ryser e Marth (2007) e Severino (2007).

Najjar, Chikindas e Montville (2009) avaliaram o crescimento de quatro cepas de *L. monocytogenes* em meio com valores de pH ajustados com ácido

lático entre 3,5 e 7,0 e detectaram ausência de crescimento para todas as cepas em valores de  $\text{pH} \leq 5,0$ . A diferença entre o pH mínimo inibitório de 5,0 encontrado por esse autores e o pH 4,5 encontrado no presente trabalho pode ser explicada pela natureza do ácido utilizado e também pela cepa estudada. No presente estudo, tanto o ácido cítrico quanto o ácido clorídrico inibiram o crescimento de *L. monocytogenes* em valores de  $\text{pH} \leq 4,5$ .

Vários estudos mostram a efetividade dos ácidos orgânicos, cuja ação é devido à dissociação intracelular sofrida por esses ácidos, causando maiores danos à célula (BUCHANAN; GOLDEN, 1998; HIRSHFIELD; TERZULLI; O'BYRNE, 2003; KOUASSI; SHELEF, 1996) e também à ação da forma não dissociada em alterar as atividades metabólicas do micro-organismo (VASSEUR et al., 1999).

Ita e Hutkins (1991) observaram que o baixo pH intracelular não foi o fator mais importante na inibição do crescimento de *L. monocytogenes* em meio ácido, uma vez que células tratadas com ácido lático em meios com pH 3,5 mantiveram seu pH intracelular em torno de 5,0, mostrando que a forma não dissociada do ácido tem efeito inibitório no crescimento de *L. monocytogenes*, assim com o efeito de acidificação do meio intracelular causado pelos íons  $\text{H}^+$ .

A susceptibilidade de diferentes cepas de *L. monocytogenes* a meios ácidos ajustados com ácidos de diferentes naturezas, entre eles, orgânicos (ácidos lático e acético) e inorgânico (HCl) foi estudada por Vasseur et al. (1999). A sensibilidade entre cada uma das cinco cepas avaliadas foi diferente em relação ao ácido utilizado. Todas as cepas tiveram redução da taxa de crescimento proporcional à redução do pH, ou seja, em meios mais ácidos, a taxa de crescimento foi menor. O ácido acético foi o mais efetivo e o HCl, o menos efetivo. Segundo os autores, a maior efetividade do ácido acético na inibição do crescimento de *L. monocytogenes* pode ser explicada pela maior capacidade em transpor a membrana plasmática na sua forma não dissociada e

lipolítica, levando ao acúmulo de ácido no citoplasma com acidificação do meio, desintegração da força próton motiva e alteração do transporte de substratos.

De acordo com trabalho de Young e Foegeding (1993), a inibição de crescimento de *L. monocytogenes* com vários ácidos orgânicos foi maior com o ácido acético, seguida do ácido láctico e por fim, com o ácido cítrico. Ita e Hutkins (1991) mostraram que o ácido cítrico apresentou a maior capacidade em reduzir o pH intracelular, entretanto apresentou a menor capacidade de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*, entre vários ácidos orgânicos testados, sendo o ácido acético o que melhor inibiu o crescimento.

A inibição do crescimento de *L. monocytogenes* por ácido orgânico depende de fatores como o pH, o tipo de ácido e sua concentração, sendo que ácidos orgânicos em baixa concentração tiveram o efeito inibitório atribuído ao pH, enquanto que em moderada a alta concentração, equivalente a 1-2M (Molar), o efeito foi atribuído ao pH e também à concentração do ácido (BUCHANAN; GOLDEN, 1998). Esses autores verificaram ainda que o ácido cítrico em concentração maior que 1M teve maior potencial em inibir o crescimento bacteriano enquanto a concentração menor que 1M relacionou-se com aumento da sobrevivência de *L. monocytogenes*, demonstrando um efeito protetor, principalmente em pH 5,0 e 6,0, com um leve efeito protetor em pH 4,0.

Assim, de acordo com Young e Foegeding (1993), o efeito tóxico do ácido cítrico em *L. monocytogenes* relaciona-se à concentração da forma não dissociada e o efeito protetor relaciona-se aos níveis calculados das formas mono e dihidroxi, o que sugere relação com a capacidade quelante dos ácidos nas formas parcialmente ionizadas. Demonstraram, também, que o estímulo do crescimento de *L. monocytogenes* em baixas concentrações pode ser devido à oferta de citrato como fonte de carbono ou devido à quelação de íons metálicos. O ácido cítrico apresentou a maior atividade bacteriostática expressa em função

da concentração molar, comparados com ácido láctico e acético; já em base equimolar, apresentou-se com o pior efeito inibitório. Conner, Scott e Bernard (1990) também evidenciaram que baixos níveis de ácido cítrico não afetaram o pH mínimo de crescimento de *L. monocytogenes*, sugerindo, assim, uma relação entre o efeito inibitório e a concentração do ácido.

A sequência da exposição a diferentes fatores de estresse também pode interferir na eficácia da inibição do crescimento de *L. monocytogenes*. Em estudo que avaliou exposição a diferentes fatores de estresse em doses letais, a sequência de exposição primeiramente com baixo pH e depois com elevada concentração de NaCl, resultou em mais rápida redução do crescimento de *L. monocytogenes* do que a sequência inversa. Essa sequência demonstrou, também, resultado melhor do que a aplicação de um dos métodos isolados ou mesmo simultâneos (TIGANITAS et al., 2009).

O uso de métodos e agentes antibacterianos que, sinergicamente, inibem o crescimento de micro-organismos nos alimentos, pode contribuir para uma maior eficácia dessa inibição, mas, por outro lado, o uso de concentrações subletais desses diversos agentes pode levar à seleção ou à indução de tolerância nos micro-organismos, tornando-os mais resistentes aos agentes utilizados.

#### **4.2 Indução da resposta de tolerância ácida**

Após 1 hora de exposição a pH 5,5 em meio ajustado com HCl e em meio ajustado com ácido cítrico, a 37°C, as células de *L. monocytogenes* ATCC 19117 foram expostas aos valores de pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0 e 3,5. Não houve crescimento nos meios de cultura com pH 4,5; 4,0 e 3,5 indicando que não houve indução de tolerância ao pH nas células após exposição ao pH 5,5. Assim, optou-se por aumentar o tempo de exposição para 6 horas. Feito isso, também não houve crescimento nos valores de pH supracitados. Até o

presente momento, a cepa utilizada havia sido somente *L. monocytogenes* ATCC 19117. Sabendo-se que a resposta adaptativa da bactéria depende também da fisiologia do micro-organismo e que pequenas diferenças podem ser observadas entre cepas da mesma espécie, optou-se por trabalhar com outra cepa, substituindo a cepa utilizada, ATCC 19177, por ATCC 7644 e apenas essa cepa foi mantida até o final do experimento.

Sendo substituída a cepa, após 6 horas de exposição a pH 5,5 em meio ajustado com HCl e em meio ajustado com ácido cítrico, a 37°C, as células foram expostas aos valores de pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0 e 3,5. Para as células expostas aos meios com pH ajustado com HCl, houve crescimento em pH 4,5, o que não havia acontecido antes da exposição ao pH 5,5. Para as células expostas aos meios com pH ajustado com ácido cítrico, não houve crescimento em pH 4,5 ou em pH 4,0 e 3,5.

A tabela 4 demonstra o efeito do pH sobre o crescimento de *L. monocytogenes* (Log UFC/mL) após exposição a pH 5,5 em meio ajustado com HCl.

Tabela 4 Valores médios do crescimento (Log UFC/ mL) de *L. monocytogenes* em função do pH, após indução de tolerância com HCl

pH	Log UFC/mL
4,5	8,831667 e
5,0	8,918333 d
5,5	9,076667 c
6,0	9,808333 a
6,5	9,821667 a
7,0	9,745000 b

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se que a exposição das células o valor de 0,5 unidades acima do pH mínimo de crescimento, ajustado com HCl, induziu tolerância em *L.*



*monocytogenes*, permitindo o posterior crescimento em pH 4,5, valor que havia inibido, completamente, o crescimento das células anteriormente.

Najjar, Chikindas e Montville (2009), em seu trabalho, expuseram as células de *L. monocytogenes* a pH 5,5, por uma hora, a 37°C e, posteriormente, as expuseram a pH 3,5. Os valores de pH foram ajustados com ácido láctico e com ácido clorídrico. Quando usado o ácido láctico, as células previamente expostas ao pH 5,5 tiveram sobrevivência significativamente maior ao pH 3,5, demonstrando a indução de tolerância ácida. Já com o ácido clorídrico, não houve indução de tolerância em nenhuma das cepas utilizadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Alexandrou, Blackburne e Adams (1995), Smigic et al. (2009) e Van Houteghem et al. (2008)

Diferentemente do que foi encontrado por Najjar, Chikindas e Montville (2009), Alexandrou, Blackburne e Adams (1995), Smigic et al. (2009) e Van Houteghem et al. (2008), que evidenciaram indução de tolerância quando utilizados ácidos orgânicos em concentrações subletais, esse estudo mostra a indução de tolerância ácida quando os valores de pH foram ajustados com HCl, um ácido forte inorgânico, não havendo a indução com o ácido cítrico.

Nos estudos acima citados, a indução de tolerância ácida aconteceu com ácidos orgânicos diferentes do utilizado no presente estudo. A natureza do ácido orgânico deste estudo, o ácido cítrico, assim como características específicas como constante de acidez e constante de ionização, que interferem nos danos celulares causados pelo ácido, podem estar relacionados ao efeito inibitório do

ácido. O ácido cítrico é um ácido fraco, tricarboxílico, de  $pK_1$  3,13, bem menor

que a  $pK_a$  do ácido acético, 4,76, uma das maiores entre os ácidos orgânicos

carboxílicos (CATANI; ALCARDE, 1966). Sendo ácidos fracos, caracterizam-se por valores pequenos de constantes de ionização. Porém, de acordo com Vasseur et al. (1999), sabendo-se que quanto menor a pKa maior a extensão da dissociação, uma possível explicação para o ácido cítrico não ter induzido tolerância em *L. monocytogenes* pode ser a menor concentração da forma não dissociada do ácido se comparado a outros ácidos orgânicos, como o acético.

Assim, se o pH da solução for maior que a pKa do ácido orgânico, esse será predominantemente dissociado, resultando em menor concentração de sua forma não dissociada e menor efeito inibitório do crescimento bacteriano. No entanto, se o pH da solução for menor que a pKa, a dissociação será menor. O

ácido cítrico, possuindo a menor pKa entre os ácidos orgânicos (pK<sub>1</sub>: 3,13),

abaixo dos valores de pH utilizados no presente trabalho, pode ter sofrido elevada dissociação, não ocorrendo uma eficaz inibição do crescimento de *L. monocytogenes*, principalmente se utilizado em baixa concentração.

A tabela 5 representa o efeito do pH sobre o crescimento (Log UFC/mL) de *L. monocytogenes* em meio ajustado com ácido cítrico, após exposição a pH 5,5 por seis horas.

Tabela 5 Valores médios do crescimento (Log UFC/mL) de *L. monocytogenes* em função do pH, após indução de tolerância com ácido cítrico

<b>pH</b>	<b>Log UFC/mL</b>
5,0	8,938333 d
5,5	9,018333 c
6,0	9,810000 b
6,5	9,890000 a
7,0	9,851667 a

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

A figura 4 demonstra as equações de regressão do crescimento de *L. monocytogenes* (Log UFC/ mL) em função do pH, na indução de tolerância ácida com HCl e ácido cítrico.

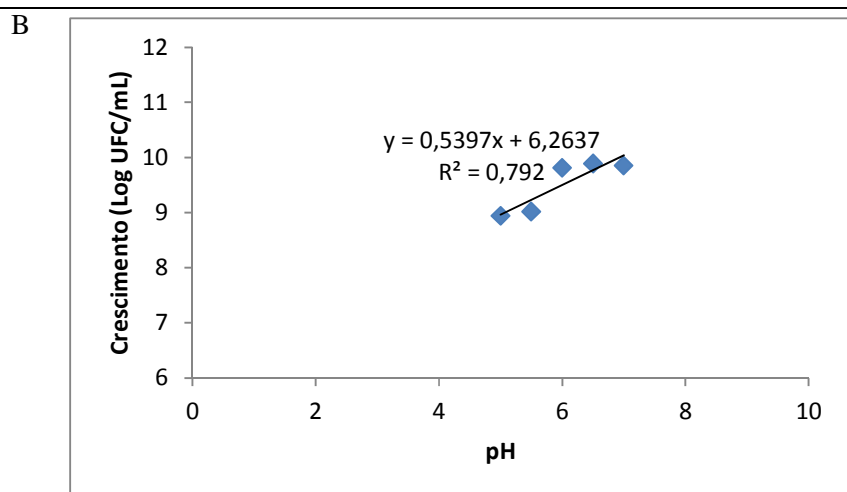
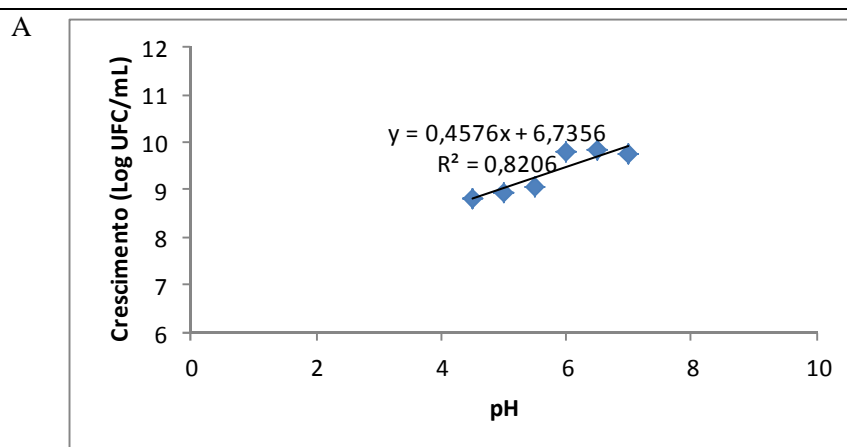


Figura 4 Equações de regressão do crescimento (Log UFC/mL) de *L. monocytogenes* em função do pH, após indução de tolerância. A: com HCl; B: com ácido cítrico

Alguns trabalhos tentam elucidar os mecanismos de adaptação de *L. monocytogenes* que permitem com que sobrevivam em ambientes ácidos. Em trabalho feito por Sun et al. (2012), estudou-se a correlação entre os ácidos graxos da membrana de *L. monocytogenes* e sua resistência. Foi evidenciado que a bactéria contém, principalmente, ácidos graxos saturados de cadeia ramificada e que isso tem relação com a sobrevivência a baixo pH e baixas temperaturas. Alterações na composição desses ácidos graxos, induzida por mutações, levou a alterações no crescimento em pH ácido e em baixa temperatura.

Também estudando esses mecanismos de adaptação, Feehily e Karatzas (2012) cita o efeito da enzima glutamato descarboxilase diante do estresse ácido e outros tipos de estresse e também na tolerância ácida em várias bactérias, como *L. monocytogenes*, facilitando a homeostase do pH intracelular por consumir prótons em reação de descarboxilação, com produção de GABA (ácido gama amino-butírico) a partir do glutamato. Tanto o GABA quanto o glutamato são dois dos principais solutos compatíveis presentes em bactérias e estão envolvidos na manutenção do metabolismo intracelular diante de múltiplos agentes estressores.

Portanto, vários são os mecanismos que tornam *L. monocytogenes* capaz de sobreviver a ambientes ácidos após exposição a pH subletal. Esses mecanismos envolvem a ativação/ inativação de genes e, segundo Oliver (2010), um importante gene regulador é o sigma  $\beta$ , regulador de estresse envolvido na resposta de adaptação ao estresse geral e a estresses específicos como acidez, estresse oxidativo e energético, que está presente em muitas bactérias Gram positivas. De acordo com esse autor, em *L. monocytogenes*, sigma  $\beta$  regula, diretamente, cerca de 160 genes e, direta e indiretamente, mais de 200 genes,

inclusive está relacionado à transcrição de genes de virulência. Isso pode ser evidenciado pela diminuição de sua virulência quando inoculada no trato gastrointestinal de porcos, após mutação em sigma  $\beta$ , conforme demonstrado por Garner et al. (2006).

Estudos em proteômica comparativa têm sido realizados, com o objetivo de se identificar as proteínas presentes em *L. monocytogenes* antes e após a exposição ao estresse, buscando descobrir as proteínas relacionadas à aquisição de tolerância do micro-organismo frente a ambiente adverso. Tão importante quanto o estudo genômico, porém, dinâmico, o estudo do proteoma revela, perante o ambiente ao qual o micro-organismo está exposto em determinado momento, o status proteico, que está totalmente relacionado à exposição ambiental.

#### 4.3 Concentração Mínima Inibitória do óleo essencial de gengibre

A concentração mínima inibitória (CMI) de óleo essencial de gengibre em *L. monocytogenes* foi de 3,12%. A tabela 6 compara o efeito de todas as concentrações de óleo essencial de gengibre sobre o crescimento (Log UFC/mL) de *L. monocytogenes*.

Tabela 6 Efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre sobre o crescimento (Log UFC/mL) de *L. monocytogenes*

Concentração (% v/v)	Log UFC/mL
25,0	-*
12,5	-*
6,25	-*
3,12	-*
1,56	9,02
0,78	9,33
0,39	9,17

\*Ausência de crescimento

A tabela 7 demonstra o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de gengibre sobre o crescimento (Log UFC/mL) de *L. monocytogenes*.

Tabela 7 Valores médios do crescimento (Log UFC/mL) de *L. monocytogenes* em diferentes concentrações de óleo essencial de gengibre

Concentração (% v/v)	Log UFC/mL
1,56	9,028333 c
0,78	9,333333 b
0,39	9,716667 a

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5%

O efeito antibacteriano do óleo essencial é atribuído, na maioria das vezes, ao seu composto ou a seus compostos majoritários, grupo de substâncias presentes em maior porcentagem. Os compostos majoritários podem variar de acordo com alguns fatores como a parte da planta de onde o óleo foi extraído, método de extração, condições ambientais como umidade relativa, temperatura, exposição ao vento e ao sol e período de estocagem e secagem. Como mostrado por Machado et al. (2003),  $\alpha$ -gingibereno e geranial foram os principais constituintes do óleo essencial de gengibre. Já segundo Dabague et al. (2011), geranial e neral foram os compostos majoritários, inclusive com seus teores aumentados quando os rizomas de gengibre permaneceram maior período em secagem. No presente estudo, o óleo essencial de gengibre utilizado possui como compostos majoritários, zingibereno e beta-sesquifelandreno.

No presente estudo, não houve crescimento bacteriano após exposição a concentrações de óleo essencial de gengibre de 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12%, sendo essa a CMI para a cepa estudada. Altas concentrações de óleo essencial

têm eficaz ação antibacteriana, porém acarretam alterações sensoriais importantes nos alimentos, sendo inviável seu uso apenas sob a ótica da eficácia antimicrobiana. Portanto, o objetivo dos estudos sobre óleos essenciais é encontrar baixa concentração mínima inibitória, eficaz contra o micro-organismo e aceitável, sensorialmente, se usada nos alimentos.

Em trabalho realizado por Sivasothy et al. (2011), os óleos extraídos da folha e do rizoma de *Zingiber officinale* foram testados contra bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformes*, *Bacillus spizizenii*) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas stutzeri*). Os óleos extraídos dessas duas partes da planta mostraram moderada atividade antibacteriana, com CMI de 0,016- 0,063% contra todas as bactérias testadas. Segundo os autores, a atividade foi, provavelmente, devido aos compostos óxido de cariofileno, alfa-pineno, alfa terpineol, 1,8 cineol e geraniol, já sabidamente antibacterianos.

Trabalho que avaliou a CMI do óleo essencial de *Zingiberofficinale* em *L. monocytogenes* em três diferentes valores de pH (5,0; 6,0 e 7,0) encontrou os seguintes valores de CMI: 0,015%; 0,03% e 0,06%, respectivamente. Quando associados à nisina, caíram para 0,0019%; 0,0074% e 0,0150%, respectivamente, mostrando ação sinérgica da nisina ao óleo essencial utilizado (RAHNAMA; NAJIMI; ALI, 2012). Esses autores comprovaram maior dificuldade de crescimento em pHs mais baixos, ao verificarem que foi suficiente menor concentração de óleo essencial de gengibre para inibir o crescimento bacteriano em meios mais ácidos. Pode-se dizer que a acidez, como fator isolado ou associado, consegue interferir, negativamente, no crescimento de *L. monocytogenes*.

Em relação aos possíveis mecanismos de ação do óleo essencial de gengibre, Bakkali et al. (2008) mostraram que o óleo essencial de gengibre é rico em monoterpênicos e como essas substâncias são hidrofóbicas, têm

preferência em se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas da membrana. Segundo Andrade et al. (2012), o acúmulo dos constituintes dos óleos essenciais na bicamada lipídica da membrana citoplasmática irá promover alteração de permeabilidade, ocorrendo a dissipação da força próton motiva, redução de ATP, do pH interno, do potencial elétrico e a perda de íons como potássio e fosfato. Esses danos na membrana levam ao comprometimento das suas funções. Dorman e Deans (2000) relataram que os álcoois terpênicos presentes na composição dos óleos essenciais de gengibre agem como desidratantes e solventes, provocando desnaturação das proteínas.

No presente estudo, a CMI de óleo essencial de gengibre em *L. monocytogenes* foi diferente da CMI de 0,625% mostrada por Norajit, Laohakunkit e Kerdchoechuen (2007) e da CMI de 0,6% mostrada por Thongson et al. (2005), sendo bem maior do que as determinadas por Rahnama, Najimi e Ali (2012).

Vários fatores podem ser responsáveis pelas variações referentes à determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de óleos essenciais, como a técnica utilizada, o micro-organismo e a cepa utilizados, a origem da planta, o local da planta onde o óleo essencial foi extraído, a época da colheita da planta, o tempo de armazenagem pós-colheita, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de óleo testada (FENNEL et al., 2004).

#### **4.4 Indução de tolerância ao óleo essencial de gengibre e ao composto quaternário de amônio**

As células de *L. monocytogenes* expostas à concentração subletal de óleo essencial de gengibre (CMI/4) de 0,78%, apresentaram crescimento quando expostas, posteriormente, à CMI de 3,12%, atingindo a concentração de 9,76



Log UFC/mL. Isso mostra que quando as células foram expostas à concentração subletal de 0,78% de óleo essencial de gengibre, houve indução de tolerância, permitindo seu crescimento quando posteriormente expostas à concentração mínima inibitória.

Em relação ao composto quaternário de amônio, *L. monocytogenes* exposta à concentração subletal (CMI/4) de 0,25% não apresentou crescimento quando exposta, posteriormente, à concentração de 1%. Assim, não houve indução de tolerância em *L. monocytogenes* após exposição à concentração subletal de composto quaternário de amônio.

Estudos sobre ação antibacteriana de óleos essenciais têm surgido continuamente, porém os estudos sobre indução de tolerância a concentrações subletais desses óleos essenciais é algo novo e que vem sendo pesquisado. Muito se tem estudado sobre os mecanismos de adaptação bacteriana perante fatores de estresse diversos, porém, especificamente aos óleos essenciais, poucos estudos há na literatura.

Luz et al. (2012a) avaliaram a indução de tolerância de óleo essencial de *Origanum vulgare* e de carvacrol sobre o crescimento de *L. monocytogenes*. As células foram expostas por dezoito horas à concentração de CMI/2 e CMI/4, sendo que a CMI foi de 0,62µL/mL, o que corresponde a uma baixa concentração de 0,062% tanto para o óleo essencial de *Origanum vulgare* quanto para o carvacrol. Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem das células que foram expostas às concentrações de CMI/2 e CMI/4 quando foram, posteriormente, expostas ao valor de CMI por 4 horas.

As concentrações mínimas inibitórias de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e o do composto 1,8 cineol foram pesquisadas e 4% foi a CMI para ambos, em *L. monocytogenes*. Posteriormente, células de *L. monocytogenes* foram expostas a CMI/2 e CMI/4 por uma noite, para se avaliar a indução de tolerância. Não houve indução de tolerância após exposição às concentrações

subletais de *Rosmarinus officinalis* e de 1,8 cineol (GOMES NETO, 2012). Esse estudo, assim, mostrou-se divergente ao presente estudo, no qual foi evidenciada a indução de tolerância à CMI de 3,12%, quando as células de *L. monocytogenes* foram previamente expostas à concentração subletal (CMI/4) de óleo essencial de gengibre. Tratou-se, no entanto, de utilização de cepas diferentes e de diferentes óleos essenciais.

Na indústria de alimentos, alguns sorotipos de *L. monocytogenes* sobrevivem após a limpeza e desinfecção (HOLAH et al., 2002; KETO-TIMONEN et al., 2007; WULFF et al., 2006). A persistência dos micro-organismos resistentes pode ser explicada pela tolerância aos desinfetantes usados. No entanto, essa tolerância é evidenciada em alguns estudos enquanto outros não comprovam sua ocorrência (AASE et al., 2000; HEIR et al., 2004; HOLAH et al., 2002). O presente estudo, que foi concordante com alguns e discordante de outros quanto à ocorrência de indução de tolerância, não evidenciou indução com o composto quaternário de amônio em *L. monocytogenes*, após período de exposição à concentração subletal (CMI/4) de seis horas.

Lundén et al. (2003) avaliaram a indução de tolerância de *L. monocytogenes* após exposição à CMI/4 de desinfetantes químicos, por duas horas. Em relação aos dois compostos quaternários de amônio testados, houve resistência da bactéria quando exposta à CMI anterior e aumento de três vezes no valor da CMI. Entre algumas diferenças do presente estudo com o trabalho de Lundén et al. (2003), a cepa utilizada foi diferente e o tempo de exposição à concentração subletal foi de seis horas no presente estudo e de duas horas no outro. Em relação ao maior tempo de exposição, era esperado que houvesse indução de tolerância, porém, assim como em alguns estudos citados no presente trabalho, não foi encontrado aumento de resistência no micro-organismo testado.

A exposição a concentrações subletais tanto de desinfetantes químicos quanto de produtos antibacterianos, como os óleos essenciais, assim como procedimentos que visam a impedir o crescimento dos micro-organismos pode levar a alterações na fisiologia do micro-organismo, gerando respostas adaptativas aos agentes antibacterianos (HILL et al., 2002; SHADBOLT; ROSS; MCMEEKIN, 2001).

Uma questão não esclarecida e que ainda necessita de muitos estudos é o fato da tolerância ser, predominantemente, induzida pelas mudanças metabólicas adaptativas ocorridas no micro-organismo ou pelo processo de seleção que proporciona o crescimento dos micro-organismos já resistentes. Mecanismos de adaptação metabólica, como visto nessa discussão, existem. O que resta saber é se são responsáveis, por si só, pela tolerância apresentada pelo micro-organismo a um agente agressor.

Em relação aos mecanismos que explicam a tolerância, o trabalho realizado por Ramanova (2006) mostrou a relação entre bomba de e fluxo, em *L. monocytogenes*, e a adaptação ao composto quaternário de amônio (cloreto de benzalcônio). Aumento da expressão do gene *mdr1* ocorreu naquelas cepas que se tornaram resistentes ao cloreto de benzalcônio após exposição, mostrando importante correlação entre a bomba de e fluxo codificada pelo gene e o mecanismo de adaptação frente a esse desinfetante químico.

#### **4.5 Indução de tolerância cruzada**

As células de *L. monocytogenes* expostas à concentração subletal de óleo essencial de gengibre (CMI/4) de 0,78%, por seis horas, apresentaram crescimento quando expostas, posteriormente, ao pH 4,5 ajustado com ácido clorídrico, não havendo crescimento na exposição ao pH 4,0 e 3,5. Observou-se, assim, indução de tolerância cruzada à acidez.

A tabela 8 demonstra o efeito do pH sobre o crescimento (Log UFC/mL) de *L. monocytogenes* após exposição à concentração de 0,78% (CMI/4) de óleo essencial de gengibre.

Tabela 8 Efeito do pH sobre o crescimento (Log UFC/ML) de *L. monocytogenes* após exposição à CMI/4 de óleo essencial de gengibre

<b>pH</b>	<b>Log UFC/mL</b>
3,5	- *
4,0	- *
4,5	8,9

\*Ausência de crescimento

Foi observado que o pH mínimo inibitório de 4,5 não se mostrou eficaz em inibir o crescimento após a exposição da bactéria à concentração subletal do óleo essencial de gengibre. Conforme o conceito de tolerância cruzada, onde o micro-organismo 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. monocytogenes*. Isso comprova a grande importância dos mecanismos adquiridos por *L. monocytogenes* que a permitem crescer frente a várias medidas de controle.

Se *L. monocytogenes*, após ser exposta à concentração de 0,78% de óleo essencial de gengibre, consegue sobreviver a valor de pH inibitório e apresentar crescimento, surge a grande preocupação em relação à utilização dos óleos essenciais, se usados em concentrações subletais, durante o processamento dos alimentos ou como biocida. O objetivo dos estudos sobre ação antibacteriana de óleos essenciais é a possibilidade de sua utilização como uma medida adicional de inibição de crescimento microbiano em alimentos. Como uma das características dos óleos essenciais é apresentar alta volatilidade e apresentar aromas e sabores intensos, torna-se difícil, sensorialmente, seu uso em altas

concentrações. Assim, o uso em baixa concentração, com o objetivo de promover alguma ação antibacteriana é preocupante, pois a concentração subletal poderia aumentar a resistência de *L. monocytogenes*, permitindo que sobreviva, por exemplo, diante da acidez do trato gastrointestinal humano, onde o pH ácido estomacal, que funciona como barreira de proteção contra agressões microbianas, poderia tornar-se ineficaz se o micro-organismo tiver sido exposto á concentração subletal de um outro agente agressor, como os óleos essenciais, durante as etapas de processamento do alimento.

Com o crescente número de estudos sobre as propriedades antibacterianas dos óleos essenciais, um dos objetivos é o seu uso na indústria de alimentos, tanto como conservante como desinfetante e sanificante. Torna-se muito importante, para tal, descobrir a melhor forma de uso e a concentração ideal, inibitória e não indutora de tolerância frente aos outros fatores de estresse com os quais os micro-organismos possam entrar em contato posteriormente, não diminuindo, assim, a eficácia desses outros métodos de controle.

Em trabalho realizado por Luz et al. (2012a), células de *L. monocytogenes* expostas a concentrações subletais de óleo essencial de *Origanumvulgare* e submetidas a fatores de estresse diferentes como alta temperatura (45°C), acidez (pH 5,2) e alta concentração de sal (Na Cl a 10%), não foi observada tolerância cruzada entre o óleo essencial de *Origanumvulgare* e os outros fatores de estresse.

Luz et al. (2012b) também pesquisaram a indução de tolerância cruzada à temperatura de 45°C, pH 5,2 e concentração de 10% de NaCl em *Salmonella*

*enterica* Typhimurium, quando previamente exposta a concentrações subletais

de óleo essencial de *Origanum vulgare* e de carvacrol. Assim como no trabalho de Luz et al. (2012a) , não houve indução de tolerância nas células de *S. Typhimurium* que previamente expostas a CMI/2 e CMI/4.

A adaptação e a aquisição de tolerância dependem de fatores como o tipo de micro-organismo, a natureza do estresse e o ambiente ao qual o micro-organismo está inserido, sendo que algumas bactérias têm a capacidade de se recuperar e de reiniciar o crescimento após a exposição ao fator estressante (SMIGIC et al., 2009).

Lin, Lee e Chou (2011) avaliaram a adaptação ácida em *L. monocytogenes* e em *Salmonella Typhimurium* expostas a desinfetantes químicos. No processo de adaptação, foi feita a exposição a pH 5,5 ajustado com HCl e incubação por 1 hora a 37°C. Após a indução, as células foram submetidas ao contato com dois desinfetantes químicos (um composto à base de cloro e um composto quaternário de amônio) em duas temperaturas. Ambos os desinfetantes tiveram melhor atividade antibacteriana a 40°C do que a 25°C, mostrando a influência da temperatura na ação antibacteriana. *Listeria monocytogenes* adaptada teve sua sobrevivência aumentada quando exposta ao composto clorado a 25°C, tendo a viabilidade reduzida a 40°C. Com o composto quaternário de amônio, a viabilidade das células adaptadas, a 25°C, foi reduzida se comparada ao composto clorado.

No trabalho acima também foi usado o valor de pH 5,5 ajustado com HCl, para se induzir a tolerância ácida em *L. monocytogenes*, evidenciando que a indução de tolerância ocorreu, em intensidades diferentes, frente aos dois desinfetantes químicos. O HCl mostrou-se, em concordância com este trabalho, eficaz em induzir a tolerância ácida.

Berghols et al. (2013), estudando a indução de resistência cruzada, avaliaram a indução de resistência ao antibacteriano nisina, em *L. monocytogenes*, após exposição à concentração de 6% de NaCl. Observaram que

as células previamente expostas à concentração de 6% de NaCl, em BHI (Brain Heart Infusion), a 7°C, adquiriram resistência à nisina (2mg/ml de Nisaplin). Os autores também verificaram que níveis transcricionais aumentados do gene *liaR* foram encontrados nas cepas de *L. monocytogenes* que tiveram a resistência aumentada, mostrando a correlação desse gene com o aumento da resistência à nisina.

Assim, inúmeros são os agentes agressores aos quais os micro-organismos podem estar expostos e muitos estudos têm tentado demonstrar se exposição a doses e concentrações subletais de um determinado agente estressor pode induzir tolerância frente a outro.

Devido ao surgimento de micro-organismos cada vez mais resistentes às medidas de combate usuais, estratégias vêm sendo testadas, isoladas ou associadas, com o objetivo de inibir o crescimento de micro-organismos contaminantes em alimentos e causadores de doenças em animais e em seres humanos. Segundo Rajkovic, Smigic e Devlieghere (2010), o emprego de altas temperaturas, processamentos de alta pressão, campos elétricos pulsados, pulsos de luz intensa, ácidos orgânicos, dióxido de cloro aquoso e, principalmente, o uso combinado de técnicas, são usados como tentativa de controle de crescimento de micro-organismos nos alimentos.

Processos como a irradiação (AYARI et al., 2012) e encapsulamento de agentes antibacterianos em nano vesículas (TEIXEIRA et al., 2008) já são estudados em alimentos e, na área médica, pesquisas com o uso de nano antibióticos (HUH; KWON, 2011) já estão sendo feitas e um futuro promissor é esperado no campo das tecnologias de combate aos agentes causadores de doenças alimentares.

## 5 CONCLUSÃO

O pH mínimo de crescimento de *L. monocytogenes* foi 5,0.

*Listeria monocytogenes* apresentou resistência aumentada após ser exposta a pH ácido, ocorrendo indução de tolerância ácida nessas células.

O óleo essencial de gengibre apresentou concentração mínima inibitória (CMI) de 3,12% sobre o crescimento de *L. monocytogenes*.

*Listeria monocytogenes*, quando exposta à concentração subletal (CMI/4) do óleo essencial de gengibre, apresentou adaptação ao óleo essencial.

Houve adaptação cruzada da bactéria após ser exposta à concentração subletal do óleo essencial, aumentando sua tolerância a baixo pH.



## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; KNOCHEL S.; HASMAN, H. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* from food products. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 4, n. 2, p. 216-221, Fev. 2007.
- AASE, B. et al. Occurrence and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, p. 57-63, 2000.
- ABRAM, F. Identification of components of the Sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 22, p. 6848-6858, Nov. 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 2, de 15 de janeiro de 2007**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9a67750047457f218ac0de3fbc4c6735/RDC\\_2\\_2007.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9a67750047457f218ac0de3fbc4c6735/RDC_2_2007.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 22 set. 2013.
- ALEXANDROU, O.; BLACKBURNE C. W.; ADAMS, M. R. Capacitance measurement to assess acid induced injury to *Salmonella enteritidis* PT4. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 27, p. 27-36, 1995.
- ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborn infection. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 16, p. 16-23, 2010.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./ jun. 2012.
- AYARI, S. et al. Response of *Bacillus cereus* vegetative cells after exposure to repetitive sublethal radiation processing in combination with nisin. **Food Microbiology**, London, v. 32, p. 361-370, 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.

BERGHOLZ, T. M. Nisin Resistance of *Listeria monocytogenes* is increased by exposure to salt stress and is mediated via LiaR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, p. 5682-5688, 2013.

BERTSCH, D. et al. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, p. 526-532, 2013.

BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. New York: Springer, 2008. 290 p.

BILLE, J.; ROCOURT, J.; SWAMINATHAN, B. *Listeria, Erysipelothrix and Kurtia*. In: MURRAY, P. et al. **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. cap.22, p. 346-362.

BIZZO, H. R. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BONNET, M.; MONTVILLE, T. J. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Campina Grande, v. 40, p. 237-242, 2005.

BRATLIE, M. S. et al. Gene duplications in prokaryotes can be associated with environmental adaptation. **BMC Genomics**, London, v. 11, p. 588-604, 2010.

BUCHANAN, R. L.; GOLDEN, M. H. Interactions between pH and malic acid concentration on the inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 18, n. 37, p. 37-48, 1998.

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, p. 2021-2030, 2010.

CALVO, E. Analysis of the *Listeria* cell wall proteome by two-dimensional nanoliquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, New York, v. 5, p. 433-443, 2005.

CASTANON, J. I. R. History of the use of antibiotics as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, p. 2466-2471, 2007.

CATANI, R. A.; ALCARDE, J. C. O pH de soluções de ácido cítrico, acético, oxálico e tartárico. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 23, p.145-164, 1966.

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. *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.

CONNER, D. E.; SCOTT, V. N.; BERNARD, D. T. Growth, inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, p. 652-655, 1990.

COSSART, P.; ARCHAMBAUD, C. The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*: an emerging model in prokaryotic transcriptomics. **Journal of Biology**, London, v. 8, p. 107.1-107.4, 2009.

COTTER P. D.; GAHAN, G. C.; HILL, C. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* FOF1-ATPase operon in the acid tolerance response. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, p. 137-146, 2000.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 2, p. 195-206, abr./jun. 2008.

DABAGUE, I. C. M et al. Essential oil yield and composition of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) rhizomes after different drying periods. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 79-84, 2011.

DIAS, V. L. N. **Fotodisponibilidade de metais, caracterização nutricional, constituição química, avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.** 2009. 88 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, p. 308-316, 2000.

DUKE J. A.; AYENSU, E. S. **Medicinal plants of China**: medicinal plants of the world. Algonac: Reference, 1985. v. 1, 362 p.

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 58, p. 587-610, June 2004.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, p. 308-323, Jan. 2007.

ERNST, R. K.; GUINA, T.; MILLER, S. I. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 179, p. 326-30, 1999. Suppl. 2.

EVANS, W. C.; SAUNDERS, W. B. **Ginger, trease and Evans pharmacosy**. 15th. ed. Edimburgo: WB Saunders, 2002. 280 p.

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

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*. In: LUND, B.; BAIRD-PARKER, T.; GOULD, G. **The microbiological safety and quality of food**. Aspen: Aspen Publication, 2000. v. 2, cap. 44, p. 1178-1216.

FEEHILY, C.; KARATZAS, K. A. G. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. **Journal of Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 114, p. 11-24, 2012.

FENNEL, C. W. et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 95, n. 2/3, p. 113-121, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEATH ORGANIZATION. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. Rome, 2004. 78 p.

FORATTINI, O. P. O pensamento epidemiológico evolutivo sobre as infecções. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 257-62, 2001.

FORSYTHE, S. J. **The Microbiology of safe food**. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. 496 p.

GAHAN, C. G.; O DRISCOLL, B.; HILL, C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3128-3132, 1996.

GARNER, M. R. et al. Sigma  $\beta$  contributes to *Listeria monocytogenes* gastro intestinal infection but not to systemic spread in the guinea pig infection model. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, p. 876-886, 2006.

GLASER, P. et al. Comparative Genomics of *Listeria* Species. **Science**, Washington, v. 294, p. 849-852, 2001.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOMES NETO, N. J. *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and the related compound 1,8-cineole do not induce direct or cross-protection in *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 cultivated in meat broth. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 58, p. 973-981, 2012.

GRAVES, L. M. *Listeria marthii* sp. nov. isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 6, p. 1280-1288, 2010.

GUIMARÃES, L. G. L. **Estudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)**. 2007. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

HEIR, E. et al. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, p. 85–96, 2004.

HILL, C. et al. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, p. 273-283, 2002.

HIRSHFIEL, S. I. N.; TERZULLI, S.; O'BYRNE, C. Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. **Science Progress**, London, v. 86, p. 245-269, 2003.

HOFER, E.; RIBEIRO R.; FEITOSA, D.P. Species and sorovar of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memorias do Instituto Adolfo Cruz**, São Paulo, v. 95, n. 5, p. 615-620, 2000.

HOLAH, J. T. et al. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 92, p. 111S-120S, 2002.

HUH, A. J.; KWON, Y. J. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 156, p. 128-145, 2011.

HUSSAIN, A. I. et al. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, p. 1827-1836, 2010.

INOUYE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 47, p. 565-573, 2001.

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**, Des Moines, v. 54, p. 15-19, 1991.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 25, p. 517-542.

JOLAD, S. D. Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-stimulated PGE2 production. **Phytochemistry**, New York, v. 66, p. 1614-35, 2005.

JONES, D. The place of *Listeria* among Gram-positive bacteria. **Infection**, Munich, v. 16, p. 85-88, 1988. Suppl.

KASTBJERG, V. G.; GRAM, L. Industrial disinfectants do not select for resistance in *Listeria monocytogenes* following long term exposure. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 160, p. 11-15, 2012.

KATHARIOUS, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, p. 1811-1829, 2002.

KETO-TIMONEN, R. et al. An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, p. 1866-1873, 2007.

KOUASSI, Y.; SHELEF, L. A. Metabolic activities of *Listeria monocytogenes* in the presence of sodium propionate, acetate, lactate and citrate. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 81, p. 147-153, 1996.

KOVACEVIC, J. Antimicrobial resistance and co-selection phenomenon in *Listeria* spp. recovered from food and food production environments. **Food Microbiology**, London, v. 34, p. 319-327, 2013.

LANG HALTER, E.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, p. 641-647, 2013.

LECLERCQ, A. et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 9, p. 2210-2214, 2010.

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

LEVIN, B. R.; ROZEN, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 556-562, 2006.

LIN, M. H; LEE, A. L.; CHOU, C. C. Acid adaptation affects the viability of *Listeria monocytogenes* BCRC 14846 and *Salmonella Typhimurium* BCRC 10747 exposed to disinfectants at 25°C and 40°C. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 8, n. 10, p. 1077-1081, Oct. 2011.

LUNDÉN, J. M. et al. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 265-72, May 2003.

LUNGU, B. et al. *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 8, n. 5, p. 569-578, Nov. 2011.

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, p. 667-672, 2012a.

LUZ, I. S. Evidence for lack of acquisition of tolerance in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* ATCC 14028 after Exposure to Subinhibitory Amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 14, p. 5021-5024, 2012b.

MACHADO, G. C. et al. Composição química de amostras de gengibre (*Zingiber officinale*) de cultivo convencional e orgânico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 26., 2003, Maringá. **Proceedings...** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2003.

MALMSTRO, L.; MALMSTRO, J.; AEBERSOLD, R. Quantitative proteomics of microbes: Principles and applications to virulence. **Proteomics**, Weinheim, v. 11, p. 2947-2956, 2011.

MANN, C. M.; COX, S. D.; MARKHAM, J. L. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Letters in Applied Microbiology**, Campina Grande, v. 30, n. 4, p. 294-297, 2000.

MARIOTT, N. G.; GRAVANI, R. B. Sanitizers. In: MARRIOT, N. G.; GRAVANI, R. B. **Principals of food sanitization**. 5th ed. New York: Springer, 2006. p. 165-189.



MARTINEZ, J. L.; ROJO, F. Metabolic regulation of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 36, p. 768-789, 2011.

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

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147-79, Jan. 1999.

MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, p. 607-625, 1999.

MELLO, J. F. et al. Molecular analysis of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* isolated from cheeses un Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Sao Paulo, v.3, p. 169-172, 2008.

MIYAGI, F.; TIMENETSKY, J.; ALTERTHUM, F. Avaliação da contaminação bacteriana em desinfetantes de uso domiciliar. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 444-448, 2000.

MONTVILLE, T. J.; MATTHEWS, K. R. **Food Microbiology**: an introduction. 2nd ed. Washington: ASM, 2008. 428 p.

MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 38, p. 565-570, 2005.

MORENTE, E. O. Biocide tolerance in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 162, p. 13-25, 2013.

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

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Complete microbial genome**. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>>. Acesso em: 20 mar. 2012.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Herbal medicines: a guide for health-care professionals**. London: Pharmaceutical, 1996.

NORAJIT, K.; LAOHAKUNJIT, N.; KERDCHOECHUEN, O. Antibacterial effect of five *Zingiberaceae* essential oils. **Molecules**, Basel, v. 12, n. 8, p. 2047-2060, 2007.

OLIVER, H. F. et al. *Listeria monocytogenes* sigma B has a small core regulon and a conserved role in virulence but makes differential contributions to stress tolerance across a diverse collection of strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 13, p. 4216-4232, July 2010.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

PEREIRA, R. S. et al. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, n. 2, v. 38, p. 326-328, 2004.

PINTADO, C. M. B. S. **Efeito de bioconservantes no crescimento e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em queijo de ovelha**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Agro-Industrial) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

RAHNAMA, M.; NAJIMI, M.; ALI, S. Antibacterial effects of *Myristica fragrans*, *Zataria multiflora* Boiss, *Syzygium aromaticum*, and *Zingiber officinale* Rosci essential oils, alone and in combination with nisin on *Listeria monocytogenes*. **Comparative Clinical Pathology**, Heidelberg, v. 21, n. 6, p. 1313-1316, 2012.

RAJKOVIC, A.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, p. 529-542, 2010.

RENIER, S.; HEBRAUD, M.; DESVAUX, M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram- positive foodborne pathogen. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 835-850, Apr. 2011.

- ROCOUT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, P. M.; DEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 1997. p. 337-352.
- ROMANOVA, N. A. et al. Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *L. monocytogenes* to benzalkonium chloride. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3498-3503, May 2006.
- RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis and food safety**. 3th ed. Boca Raton: Taylor and Francis, 2007. 873 p.
- SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 15, p. 549-557, 2004.
- SAKAMURA, F. Changes in volatile constituents of *Zingiber officinale* rhizomes during storage and cultivation. **Phytochemistry**, New York, v. 26, p. 2207-2212, 1987.
- SALGADO, A. P. S. **Efeito da luz na planta e no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2005. 49 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007. p. 323-354.
- SCALLAN, E. Activities, achievements, and lessons learned during the first 10 years of the Foodborne Diseases Active Surveillance Network: 1996-2005. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 44, n. 5, p. 718-25, Mar. 2007.
- SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, p. 7-15, 2011.
- SCHWAB, J. P.; EDELWEISS, M. I. A. Identification of *Listeria monocytogenes* in human placentas and abortion species through immunohistochemical technique. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 111-114, 2003.
- SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria* Pirie. 1940, 383 AL. In: SNEATH, P. H. A. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, section 14, p.1235.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A. et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1987. p. 1235–1245.

SEVERINO, P. et al. Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall, and stress response. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 6078-6088, Oct. 2007.

SHADBOLT, C.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Differentiation of the effects of lethal pH and water activity: food safety implications. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, p. 99–102, 2001.

SHIN, J. H. et al. Sigma B-dependent protein induction in *Listeria monocytogenes* during vancomycin stress. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 308, n. 1, p. 94-100, 2010.

SIDHU, M. S. et al. Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and Beta-lactam antibiotics in food related *Staphylococcus ssp.* **Microbiol Drug Resistance**, New Rochelle, v. 7, p. 363-371, 2001.

SIDHU, M. S.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A. Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from the food industry. **Microbial Drug Resistance**, New Rochelle, v. 7, p. 73-83, 2001.

SIDHU, M. S.; SORUM, H.; HOLCK, A. Resistance to quaternary ammonium compounds in food-related bacteria. **Microbial and Drug Resistance**, New Rochelle, v. 8, p. 393-899, 2002.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007. 1102 p.

SIVASOTHY, Y. et al. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* *Theilade* and their antibacterial activities. **Food Chemistry**, London, v. 124, p. 514-517, 2011.

SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved Lists of Bacterial Names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 30, p. 225-420, 1980.

- 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, p. 629–637, 2009.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Campina Grande, v. 26, p. 118–122, 1998.
- SOLOMAKOS, N. et al. The antimicrobial effects of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**, London, v. 25, p. 120-127, 2008.
- SONI, K. A.; NANNAPANENI, R.; TASARA, T. The contribution of transcriptomic and proteomic analysis in elucidation stress adaptation responses of *Listeria monocytogenes*. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 8, n. 8, p. 843-852, 2011.
- SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2/3, p. 308-311, Feb. 2010.
- STAVRU, F.; ARCHAMBAUD, C.; COSSART, P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 240, n. 1, p. 160-184, mar. 2011.
- SUN et al. Fatty Acids Regulate Stress Resistance and Virulence Factor Production for *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, n. 19, p. 5274, July 2012.
- TEIXEIRA, M. L. et al. Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 9, p. 49–53, 2008.
- THONGSON, C. et al. Antimicrobial effect of Thai spices against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* DT104. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 10, p. 2054-2058, Oct. 2005.

TIGANITAS, A. et al. Study of the effect of lethal and sublethal pH and a(w) stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 1/2, p. 104-112, Aug. 2009.

TIWARI, R.P. et al. Adaptive acid tolerance response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Typhi. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 44, p. 137-146, 2004.

TOSTA, C. E. Coevolutionary networks: a novel approach to understanding the relationships of humans with the infectious agents. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 415-25, 2001.

TROST, M. et al. Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 1544-1557, 2005.

TUNTIWECHAPIKUL, W. et al. Ginger extracts inhibits human telomerase reverse transcriptase and c-Myc expression in A549 lung cancer cells. **Journal of Medicinal Food**, Orlando, v. 13, n.6, p. 1347-54, Dec. 2010.

VAN HOUTEGHEM, N. et al. Effects of CO<sub>2</sub> on the resuscitation of *Listeria monocytogenes* injured by various bactericidal treatments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, p. 67-73, 2008.

VASSEUR, C. et al. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 3, p. 469-476, 1999.

VOLOKHOV, D. et al. Identification of *Listeria* species by Microarray: based-assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 4720-4728, Dec. 2002.

WANG, L. L.; JOHNSON, E. A. Control of *Listeria monocytogenes* by Monoglycerides in Foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, p. 131-138, 1997.

WOHLMUTH, H. et al. Essential oil composition of diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) grown in Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 4, p. 1414-9, 2006.

WULFF, G. et al. One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominate and persist in several fish slaughter- and smokehouses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 4313–4322, 2006.

YOUNG, K. M.; FOEGEDING, P. M. Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 74, n. 5, p. 515-20, May1993.