



MÔNICA APARECIDA DA SILVA

**ADAPTAÇÃO DE CEPAS de *Listeria monocytogenes* AOS
ÓLEOS ESSENCIAS DE MELALEUCA, ORÉGANO E
TOMILHO**

LAVRAS – MG

2021

MÔNICA APARECIDA DA SILVA

**ADAPTAÇÃO DE CEPAS DE *Listeria monocytogenes* AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
MELALEUCA, ORÉGANO E TOMILHO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Nutrição, para a obtenção do título de Bacharel.

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Orientadora

Profa. Dra. Mariana Mirelle Pereira Natividade

Coorientadora

LAVRAS - MG

2021

SUMÁRIO

RESUMO.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	4
2 REFERENCIAL TEÓRICO	6
2.1 Importâncias das toxinfecções alimentares	6
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	7
2.2.1 Doenças causadas pela ingestão de <i>L. monocytogenes</i>.....	8
2.3 Controle de microrganismos por uso de conservantes naturais	9
2.3.1 Óleos essenciais.....	10
2.4 Resposta ao estresse (adaptação homóloga)	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Local de condução do experimento.....	14
3.2 Óleos essenciais.....	14
3.3 Microrganismos e cultura estoque.....	14
3.4 Preparo e padronização do inóculo	14
3.5 Determinação da concentração mínima bactericida de óleos essenciais sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	15
3.6 Adaptação de cepas de <i>L. monocytogenes</i> aos óleos essenciais.....	15
3.7 Resposta adaptativa aos óleos essenciais	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais	16
4.2 Adaptação de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> aos óleos essenciais.....	17
5 CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS.....	21

RESUMO

Listeria monocytogenes é uma bactéria causadora de toxinfecção alimentar de destaque atualmente. É um microrganismo de extensa disseminação nos ambientes, capaz de apresentar resistência aos vários agentes desinfetantes comercializados atualmente gerando assim, a necessidade da busca por substâncias eficazes em combatê-la e que não acarrete danos à saúde do consumidor. Diante deste apelo, há grande interesse da indústria de alimentos de novos agentes antimicrobianos dos quais destacam-se os naturais como os óleos essenciais. Esses, são componentes, como fenólicos, terpenóides e fenilpropanóides, que promovem a lise celular. Entretanto, as bactérias quando expostas a condições de estresse, principalmente sub-letais, podem desencadear a síntese de diversas substâncias que a protegem da condição inóspita. Como se sabe que essa condição é uma constante em ambientes de processamento, a resposta de *L. monocytogenes* a condições de estresse sub-letais geradas por componentes naturais deve ser estudada. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta adaptativa às concentrações subletais dos óleos essenciais de melaleuca, orégano e tomilho de *L. monocytogenes* ATCC7644 e ATCC 15313. As concentrações mínimas bactericidas (CMBs) dos óleos essenciais foram determinadas empregando-se a técnica de microdiluição, em placas de 96 poços em caldo triptona de soja contendo 0,6% de extrato de levedura (TSB+EL) acrescido de 0,5% de Tween 80. As culturas estoque foram ativadas TSB+EL a 37°C por 24h. Após ativação, alíquotas de 10 µL das culturas padronizadas (10^8 UFC/mL) foram inoculadas nos poços contendo as concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03, 0,015% (v / v) dos óleos essenciais de melaleuca, orégano ou tomilho e incubadas a 37°C por 24h. A determinação da ação bactericida foi realizada pelo plaqueamento de alíquotas das culturas, previamente cultivadas em presença dos óleos, em ágar triptona de soja acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSA+EL) e incubadas, a 37 °C por 24 h. A capacidade adaptativa das cepas aos óleos essenciais, foi avaliada por pré-exposição das culturas padronizadas das duas cepas de *L. monocytogenes* por 6 h a concentrações de 1/4, 1/8, 1/16 das CMBs dos óleos essenciais. Após pré-cultivo, as células recuperadas foram cultivadas em TSB+EL a 37°C/24h em presença dos óleos essenciais em diferentes concentrações (0,5CMB; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2CMB) e seu crescimento avaliado pela inoculação subsequente das culturas em TSA+EL com incubação a 37°C por 24h. A CMB de todos os óleos essenciais cepa ATCC 7644 foi 2%. Já para a cepa 15313 houve variação entre as CMB dos óleos, sendo 2% para os óleos de melaleuca e tomilho e 1% para o de orégano. Ambas as cepas de *L. monocytogenes* se adaptaram ao óleo essencial de melaleuca apresentando tolerância mesmo na concentração de 2CMB do óleo, após expostas a 1/8 CMB para cepa ATCC7644 e a 1/16 CMB para a cepa ATCC 15313. A cepa 15313 também apresentou resposta adaptativa ao óleo essencial de orégano, após pré-exposição a 1/8 CMB, crescendo em presença de 2CMB do mesmo óleo. Entretanto, não foi observada resposta adaptativa das cepas a concentrações subletais do óleo essencial de tomilho. Os resultados mostram que ambas as cepas de *L. monocytogenes* apresentam respostas adaptativas aos óleos de melaleuca e orégano, indicando a necessidade de uso correto dos óleos essenciais como antimicrobianos.

Palavras-chave: Antimicrobiano natural; Listeriose; Concentração Subletal; toxinfecção alimentar

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é relevante patógeno bacteriano encontrado de forma representativa e em quantidades semelhantes, tanto em meios urbanos quanto em ambientes naturais. A listeriose está associada à veiculação por alimentos e expressa elevada taxa de letalidade (20 a 30%) promovendo a hospitalização de mais de 90% das pessoas acometidas com a doença (FERREIRA *et al.*, 2014; LI *et al.* 2020; SAUDERS *et al.*, 2012).

A bactéria apresenta-se na forma de bastonete Gram-positivo, não esporulada e de elevada resistência fisiológica, permanecendo viável por grandes períodos de tempo. Toleram os ambientes inóspitos do processamento dos alimentos, como às oscilações de temperatura, reduzida concentração de oxigênio e aspectos do ambiente produtivo. Há estudos demonstrando sua sobrevivência após várias etapas de limpeza e desinfecção nas indústrias de laticínios e de processamento de carnes e peixes, também são encontradas em alimentos prontos para o consumo. Apresenta assim uma probabilidade de transmissão ao longo do processo de produção ou após essa etapa (DYGICO *et al.*, 2020; GIMÉNEZ *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2020).

À vista do constante confronto com situações estressantes, as bactérias desenvolveram a capacidade de responder às oscilações ambientais. Teores de oxigênio podem não afetar a taxa de crescimento de todas as estirpes de *L. monocytogenes*, porém as alterações na oferta do oxigênio, bem como modificação no pH, na osmolaridade, na hostilidade e bile são capazes de interferir na resposta aos estressores. A utilização de novas tecnologias deve ser coerente com esse tipo de resposta quando o propósito for neutralizar os patógenos alimentares (ALVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2015; ROBERTS *et al.*, 2020).

Em se tratando de estratégias adaptativas, esses sistemas complexos de defesa por vezes podem derivar do desenvolvimento de mutações genômicas ao acaso, selecionadas e fixadas na comunidade microbiana por ser benéfica ao ambiente. Os Ambientes em mudança constante são percebidos pela célula, acionando assim a resposta adaptativa, culminando em uma corrente de alterações fisiológicas transitórias ao estresse (ALVAREZ-ORDÓÑEZ, *et al.*, 2015).

Diante destes desafios, alternativas aos antimicrobianos comumente utilizados na indústria têm sido buscadas, se destacando os óleos essenciais como promissores. Os óleos essenciais podem ser definidos como extratos oleosos aromáticos e voláteis advindos de vegetais aromáticos e medicinais, dentre eles as flores, botões, raízes, cascas e folhas por via de expressão, fermentação, extração ou destilação a vapor e representam efetiva alternativa

em virtude de sua evidente atividade antimicrobiana de amplo espectro, além de atender a demanda dos consumidores por conservantes alimentares naturais, livres dos prováveis efeitos tóxicos ou cancerígenos dos sintéticos conhecidos (BURT, *et al.*, 2004; JAYASENA; CHEORUN, 2013; SOUZA, 2016).

Sua eficácia se deve ao fato de atuarem em múltiplos alvos na célula microbiana. Possuem propriedade lipofílica, tornando-os capazes de se agregar às membranas bacterianas, seguido por modificação da sua permeabilidade e promovendo o extravasamento do conteúdo celular, uma vez que essa etapa ocorra, observa-se a morte celular. Outra consequência possível é a geração de danos às proteínas de membrana ou alteração na síntese de ATP, culminando na redução do pool intracelular de ATP, além de interferência na síntese proteica intracelular. Ressaltando sua capacidade de atuação, há o destaque na literatura para a maioria dos trabalhos, a respeito de significativas bactérias vinculadas aos alimentos que não reduziram sua susceptibilidade aos antimicrobianos e as ações físicas quando expostas a doses subletais dos óleos essenciais e de seus componentes majoritários. É importante salientar que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais se compõe por mecanismos diversos, sendo afetada pela composição deles e pela quantidade individual de cada componente (NAZZARO *et al.*, 2013; SOUZA, 2016).

Perante o exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de duas cepas de *Listeria monocytogenes* de se adaptarem aos óleos essenciais de melaleuca, orégano e tomilho quando submetidas a concentrações subletais dos óleos essenciais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importâncias das toxinfecções alimentares

As doenças transmitidas por alimentos, ou toxinfecções alimentares, foram definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como: “Qualquer doença de natureza infecciosa ou tóxica causada por, ou que se pensa ser causado pelo consumo de alimento ou água” (ADANS; MOSS, 2008). As toxinfecções alimentares ocorrem quando há a ingestão de alimentos contendo toxinas pré-elaboradas e, ou microrganismos viáveis patogênicos em quantidades suficientes, capazes de causar doenças nos seres humanos ou animais. Devido a sua capacidade pouco competitiva, os microrganismos patogênicos não levam a alterações das características sensoriais do alimento, fazendo com que o consumidor não se de conta de sua presença, ingerindo o alimento contaminado, gerando efeitos deletérios á saúde daqueles susceptíveis aos seus efeitos (BRASIL, 2020; SILVA *et al.*, 2017; VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2020).

Diversos são os sintomas das toxinfecções alimentares, podendo variar de simples diarreia a morte. De modo geral os sintomas que mais se destacam são: náuseas e vômitos, dor de cabeça, diarreia, dores abdominais, febre entre outros sinais que variam de intensidade de acordo com o agente etiológico envolvido e as características individuais do acometido. A frequência de casos envolvendo estes agentes patogênicos é um marcante problema econômico e de saúde pública, pois envolvem mais de 250 diferentes tipos de doenças (BRASIL, 2020).

Nos Estados Unidos da América, o *Food and Drug administration* (FDA) estima que ocorram cerca de 48 milhões de casos de toxinfecções alimentares por ano, resultando em 128.000 hospitalizações e 3.000 mortes.

A ocorrência constante de casos de contaminação e as consequências de seu agravamento levaram alguns países a realizar o monitoramento das toxinfecções alimentares, buscando minimizar os efeitos de possíveis surtos. Um exemplo bem sucedido é o da *Foodborne Diseases Active Surveillance Network*, ou *FoodNet* dos Estados Unidos, implementados em todo o país no ano de 2005 e que rastreia infecções em decorrência de alimentos desde de 1996, fornecendo bases para as políticas de segurança alimentar e meios de prevenção as doenças transmitidas, monitorando ambientes específicos e divulgando os dados obtidos (CDC, 2020). No ano de 2019, FoodNet identificou 25.866 casos de infecção, 6.164 hospitalizações e 122 óbitos, sendo a incidência geral por 100.000 habitantes maior

para *Campylobacter* (19,5), seguida por *Salmonella* (17,1), *Escherichia coli* produtora de shiga toxina (STEC) (6,3), *Shigella* (4,8), *Cyclospora* (1,5), *Yersinia* (1,4), *Vibrio* (0,9) e *Listeria* (0,3) (TACK *et al.*, 2020)

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) deve ser notificada em casos de surtos de DTAs a fim de coletar as informações essenciais que promovam o controle do surto e identifique o agente causador. As ações do órgão executor seguem legislação específica e segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (BERNARDES *et al.*, 2018). Entretanto, observando-se os dados disponíveis nota-se que existe grande subnotificação dos casos de toxinfecções alimentares no Brasil.

Esses dados estão disponíveis no Boletim Epidemiológico 32 da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, e englobam notificações de janeiro de 2016 a dezembro de 2019. Foram relatados 626 surtos por ano, envolvendo 37.247 pessoas (média de 9.312 casos/ano), com 38 óbitos (média de 9,5 mortes/ano) em 26 surtos. Os agentes mais prevalentes foram *Escherichia coli* (35,7%), *Salmonella* (14,9%), *Staphylococcus* (11,5%), Norovírus (8,3%), *Bacillus cereus* (7,4%) e rotavírus (6,95%).

A ocorrência dos surtos geram custos durante sua investigação. Os cuidados médicos prestados também são onerosos e sobrecarregam o sistema de saúde. O indivíduo afetado deixa de ser produtivo e também sofre perdas financeiras, além do risco do fechamento do empreendimento precedido de perdas financeiras quando o consumidor passa a se recusar a adquirir o produto de comércios já relacionados a ocorrências. Enfim, altas taxas de DTAs podem convergir em efeitos prejudiciais ao sistema econômico de um país (MELO *et al.*, 2018).

2.2 *Listeria monocytogenes*

Dentre os principais microrganismos causadores de DTA, a *Listeria* se destaca por ser um patógeno descrito como oportunista, estando amplamente distribuída nos ambientes naturais como solo, vegetação e nos excrementos dos animais saudáveis. A bactéria também é constantemente encontrada em alimentos, bem como nos ambientes de processamento (VÄLIMAA; TILSALA-TIMISJÄRVI; VIRTANEN, 2015; ROBERTS *et al.*, 2020).

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram positiva, da família Listeriaceae constituída pelas espécies *Listeria grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. monocytogenes*, sendo que entre todas, apenas *L. monocytogenes* é caracterizada como patogênica para humanos. Ela possui a forma de coccobacillus e psicrotófica, se

multiplicando em ampla faixa de temperatura - entre - 0,4 ° C a 45 ° C - como também em ampla faixa de pH - 4,0 a 9,6 (6-8, pH ótimo)- em ambientes aeróbicos e anaeróbicos com até 0,90 na faixa de atividade de água (aw) (KUMARASWAMY *et al.*, 2018; PALMA *et al.*, 2016; VÄLIMAA; TILSALA-TIMISJÄRVI; VIRTANEN, 2015).

Listeria monocytogenes possui a habilidade de se fixar em diferentes superfícies, como aço inoxidável e poliestireno, onde consegue sobreviver por longos períodos, até mesmo por anos, na forma de biofilmes. Estes filmes de proteção a permitem tolerar ampla gama de agentes estressores, como temperaturas, sanitizantes e antimicrobianos caso o processo de saneamento não seja bem executado, resultando na contaminação de alimentos que entrem em contato com essas superfícies (VÄLIMAA; TILSALA-TIMISJÄRVI; VIRTANEN, 2015; ROBERTS *et al.*, 2020).

A doença causada nos seres humanos pelo consumo de alimentos contendo *L. monocytogenes* é denominada de listeriose. Essa espécie possui 13 sorotipos destacando-se entre eles quatro, 4b, 1/2a, 1/2b e 1/2c, que estão envolvidos em mais de 95% das ocorrências clínicas de listeriose nos seres humanos, sendo o consumo de alimentos contaminados o principal veículo de transmissão dessa patologia (PALMA *et al.*, 2016).

2.2.1 Doenças causadas pela ingestão de *L. monocytogenes*

Quando seres humanos consomem alimentos contaminados por *L. monocytogenes*, podem ter como consequência uma infecção de múltiplos efeitos, que podem variar de gastroenterite acompanhada por febre (sem expansão quando ocorrida em pessoas saudáveis), à bacteremia, resultando em risco de morte, meningite, cerebrite, rombencefalite e infecção focal na população classificada em maior risco, que é formada por mulheres grávidas, neonatos, pacientes imunocomprometidos e os idosos. Sua ação impactante se deve ao fato de conseguir permear as três importantes barreiras para os seres humanos, a intestinal, a hematoencefálica e a fetoplacentária (KUMARASWAMY *et al.*, 2018; LECUIT, 2005).

Casos de complicações mais raras, como a endocardite, também podem ocorrer, sendo inicialmente relatado em 1955. Os casos afetam cerca de 8% dos pacientes com listeriose e, frequentemente, podem resultar em complicações embólicas levando a morte em 37– 50% dos casos (KUMARASWAMY *et al.*, 2018).

Listeria monocytogenes, originalmente era reconhecida como patógeno intracelular obrigatório, entretanto na década de 1970, vários surtos envolvendo grande número de pessoas foram associados a essa bactéria. Dessa forma, *L. monocytogenes* passou a ser

reconhecido como relevante patógeno devido a sua transmissão por via alimentar (HOFER *et al.*, 2006; ROBERTS *et al.*, 2020).

A European Food Safety Authority (EFSA) notificou nos estados membros em 2018, 2.549 casos de listeriose, com taxa de mortalidade de 15,6%, sendo o maior número de casos relacionados à carne e derivados, seguidos por peixes e frutos do mar e produtos lácteos, respectivamente. Apenas no ano de 2018, o número de casos em razão do consumo de vegetais congelados branqueados, foi de 46 notificações de hospitalizações e cinco mortes (EFSA, 2020).

Nos Estados Unidos, a *L. monocytogenes* possui a terceira maior taxa de contaminações ocasionadas por alimentos, representando 16%, sendo menos frequente apenas que contaminações causadas por *Clostridium botulinum* (17%) e *Vibrio vulnificus* (35%). No país, os casos são nacionalmente notificáveis para que as autoridades de saúde pública possam identificar sinais de surtos através do sistema nacional de vigilância, o Iniciativa *Listeria*, integrante da rede de vigilância ativa FoodNet. Estima-se que 1600 pessoas contraíam listeriose a cada ano e cerca de 260 morram, além de ser a bactéria responsável por cerca de 65% dos recalls alimentares (CDC, 2020).

Diante do reconhecimento dos impactos ocasionados pela bactéria é primário que sejam seguidas as boas práticas de fabricação e de higiene ao longo do processo da produção, estocagem e de distribuição dos alimentos, reforçando estas atividades de prevenção também nos domicílios a fim de precaver a listeriose. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a refrigeração dos alimentos a temperaturas inferiores aos 5°C e esse controle é eficaz em delimitar o desenvolvimento exponencial de organismos como a *L. monocytogenes* nos alimentos industrializados (EFSA, 2020).

2.3 Controle de microrganismos por uso de conservantes naturais

Os aditivos alimentares são capazes de oferecer aos alimentos processados sabores semelhantes ao de produtos preparados na hora, podendo, no caso do uso de conservadores, se ter a vantagem da extensão da vida útil destes alimentos e a inibição do crescimento de microrganismos.

Aditivo alimentar pode ser definido como substância química adicionada ao alimento sem a função de nutrir. Sendo de origem sintética, do ponto de vista do consumidor, diminuem a saudabilidade dos alimentos. Assim, o uso de substâncias naturais tem sido

sugeridas em detrimento aos aditivos sintéticos, particularmente aos conservantes (CHOTYAKUL; BOONNOON, 2016).

Tal requerimento do público consumidor levou a indústria de alimentos a considerar as inovações tecnológicas, bem como conservantes naturais, capazes de garantir alto desempenho na inativação microbiana, com a manutenção das características sensoriais do produto, frescor e mínimas perdas de nutrientes. Essa crescente busca dos consumidores impõe a oferta de alimento “o mais natural possível” e sem aditivos sintéticos como os sais de nitrato e nitrito, que já são de conhecimento do grande público consumidor que podem gerar riscos à saúde do cólon, do pâncreas e do estômago, devido às reações no ambiente gástrico após ingestão desses alimentos, gerando nitrosaminas, conhecidas como substâncias cancerígenas, além das chances de gerar hipersensibilidade e asma (CHOTYAKUL; BOONNOON, 2016; RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005).

Nos Estados Unidos da América, a Food and Drug Administration (FDA) tem a responsabilidade de conferir e aprovar os aditivos por meio de Lei e Regulamentações, estabelecendo medidas que definiram uma lista de substâncias alimentares Generally Recognized As Safe (GRAS) e os métodos científicos para avaliá-las, bem como o reconhecimento de uso seguro em alimentos de uma determinada parcela destes elementos devido ao seu uso comum pela população em alimentos anterior a 1958. O açúcar, sal, ervas e especiarias, bem como vitaminas (A, B, D), ácido acético e ácido cítrico são exemplos dessas substâncias utilizadas pelas indústrias de alimentos. As frutas, hortaliças, óleos essenciais (OEs) e extratos de leveduras também são substitutos naturais promissores. No entanto, as especiarias englobam condimentos que agregam paladar ao produto, devendo ser empregadas de forma equilibrada e para que esses conservantes alternativos sejam considerados para uso deverão ser dotados de propriedades antimicrobianas, antivirais, antimicóticas, antioxidantes e inseticidas, proveitosas na extensão da vida de prateleira e na atenuação da oxidação lipídica (FDA, 2019; TARCITANO; DE MESQUITA, 2017).

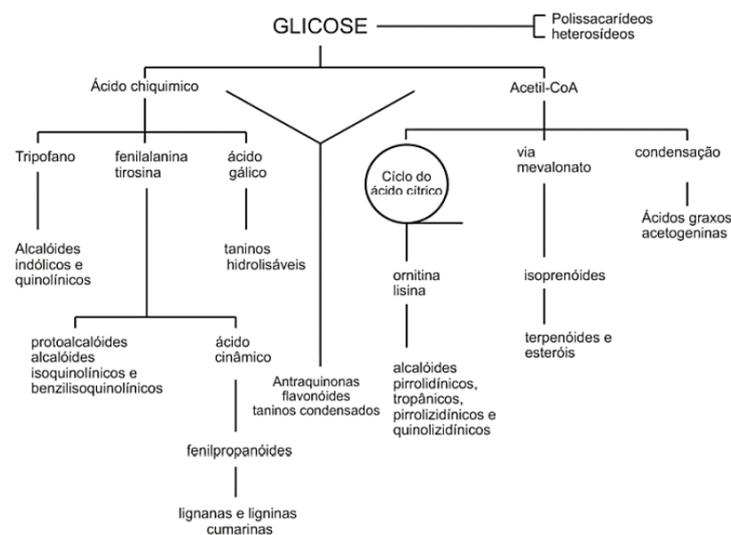
2.3.1 Óleos essenciais

Os líquidos olorosos originados de frações vegetais como as sementes, botões, flores, folhas, galhos, cascas, madeiras, ervas, frutas, são denominados como óleos essenciais (OE). Eles podem estar mais comumente preservados em células que o expelem, em cavidades e canais ou apêndices glandulares e são obtidos de diferenciadas formas, dentre elas está a

extração, a fermentação, a expressão, a enflourage e a destilação a vapor (BURT *et al.*, 2004; NAZZARO *et al.*, 2013).

Os OE são originados de plantas medicinais e aromáticas e possuem ampla gama de substâncias químicas advindas do metabolismo secundário (Figura 1), como a família dos terpenos, aldeídos, álcoois, ésteres, éteres, fenólicos e cetonas. Encontram-se de forma concentrada e líquida, são lípidos, coloridos e lipofílicos. Com relevantes funções para as indústrias dos mais diversos segmentos, os óleos essenciais representam elevado potencial econômico. Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente cerca de 3000 OE, sendo aproximadamente 300 de maior importância para a produção farmacêutica, alimentícia, de cosméticos entre outras aplicações (BAKKALI *et al.*, 2008; NAZZARO *et al.*, 2013; SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016).

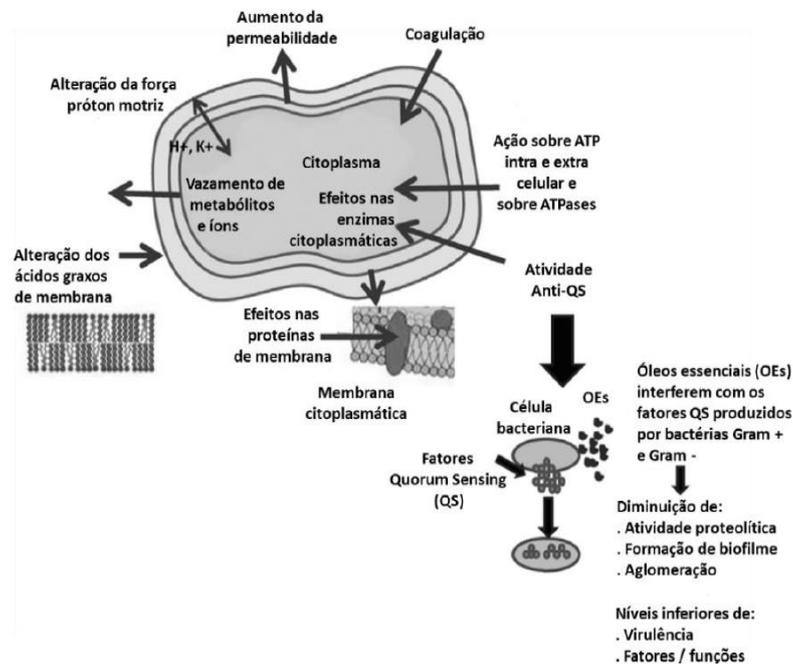
Figura 1– Ciclo biossintético de metabólitos secundários em plantas.



Fonte: Santos (2000).

Os óleos essenciais são conhecidos e utilizados pelos seres humanos desde a antiguidade, tendo propriedades antibacterianas amplamente reconhecidas. As propriedades biológicas dos compostos são influenciadas pelo local onde se encontram os grupos funcionais nas moléculas e diante de situações estressoras, as quais as plantas podem ser submetidas, enzimas específicas ativam essas moléculas caso elas não sejam naturalmente ativadas na planta a fim de garantir sua sobrevivência. Os mecanismos de ação dos OE (Figura 2) e seus componente sobre os microrganismos são múltiplos, podendo atuar em vários alvos celulares e inibirem a produção de toxinas (NAZZARO *et al.*, 2013; SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016).

Figura 2– Alvos de ação dos óleos essenciais nas células bacterianas.



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

Os OE podem causar a desestabilização da bicamada fosfolipídica, inflingindo alteração da permeabilidade da membrana celular microbiana, levando ao extravasamento de compostos importantes intracelulares e inativando mecanismos enzimáticos, de transporte de elétrons para a produção de energia, devido à presença de componentes, como eugenol, timol e carvacrol, eficazes em elevar os níveis intracelulares de ATP, que pode resultar na morte celular (NAZZARO *et al.*, 2013; MITTAL; RANA; JAITAK, 2019).

Em razão do impacto antimicrobiano propiciado por essas moléculas biologicamente ativas, os OE podem exercer sua funcionalidade antimicrobiana e inseticida na composição de embalagens, ou ainda serem utilizados na preservação de alimentos, alcançando o padrão de excelência de ação exigido pelas indústrias (DAS *et al.*, 2019).

2.4 Resposta ao estresse (adaptação homóloga)

Tanto para a produção de alimentos quanto para a prática higiênica pessoal e de ambientes é necessário que se exerça o controle sobre os microrganismos. Esse controle ocorre na forma de agentes estressores como os antimicrobianos, antibióticos, agentes sanificantes ou conservantes, além das próprias condições ambientais de onde possam se encontrar como temperatura, pH e pressão osmótica. Diversas situações promovem nos

microrganismos a elevação da expressão de proteínas responsivas ao estresse, buscando o reparo das proteínas que foram lesadas. Uma dessas situações é na permanência de níveis inferiores aos considerados letais de óleos essenciais aos microrganismos. Quando resistem às pressões seletivas esses microrganismos podem representar risco à saúde e perdas econômicas (BRASCHI *et al.*, 2018; CEBRIÁN *et al.*, 2010; NAZZARO *et al.*, 2013).

Assim como há diferenças genéticas entre as diversas espécies microbianas, há também formas particulares entre elas de constituírem seus sistemas de resposta e sobrevivência às condições estressoras ambientais. Uma maneira de se comportar mediante as adversidades do meio é a aquisição transitória de resposta, onde o microrganismo retorna a sua tolerância habitual ao causador do estresse, após cessar a exposição àquele estressor em particular. A capacidade das bactérias se adaptarem às situações que deveriam exercer controle sobre elas é o que irá determinar sua permanência no ambiente produtivo das indústrias (ALVAREZ-ORDÓÑEZ, *et al.*, 2015; BRAUNER *et al.*, 2016; WESCHE *et al.*, 2009).

Quando as bactérias são expostas por curto período de tempo à condições subletais, pode haver a indução de resistência transitória à condições de estresse que cotidianamente seriam letais. Essa condição é capaz de gerar nessas células adaptadas tolerância a formas alternativas de controle ou habilidade de enfrentar as defesas gastrointestinais do hospedeiro, por meio de suas transformações estruturais e fisiológicas interpostas por reguladores genéticos e que virão a desaparecer quando, as condições estressoras também se findem. No entanto, as respostas ao estresse poderão afetar o potencial de virulência de importantes patógenos alimentares como *L. monocytogenes*, no qual os genes responsáveis pela sobrevivência e os genes da regulação transcricional de virulência podem vir a sofrer sobreposição regulatória, impactando na forma que a toxinfecção se apresentará (ALVAREZ-ORDÓÑEZ, *et al.*, 2015).

Se as cepas de *L. monocytogenes* passarem pelo processo de adaptação após exposição às concentrações subletais, poderão ocorrer transformações na sua expressão genética e de proteínas internas, sobrevivendo assim em áreas de produção alimentícia, se tornando mais tolerantes às barreiras do ambiente produtivo. Essa capacidade de persistência local culmina em elevado risco a saúde e pode gerar inestimáveis perdas financeiras aos responsáveis pelo processo produtivo dos alimentos contaminados (BRASCHI *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2014).

Mediante a demanda crescente de se optar por meios de conservação de alimentos eficientes e naturais, é que este trabalho se mostra importante, por colaborar na produção de

resultados que ajudem a promover com segurança a uma possível escolha por estas formas alternativas de conservação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de condução do experimento

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

3.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) foram adquiridos da FERQUIMA® Indústria e Comércio Ltda (Brasil).

3.3 Microrganismos e cultura estoque

As cepas empregadas foram *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC 15313, pertencentes ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos/ DCA-UFLA, adquiridas da Seção de Coleção de Culturas da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo-SP.

As culturas estoques foram mantidas congeladas em meio de congelamento (glicerol 15%, peptona bacteriológica 0,5%, extrato de levedura 0,3%, NaCl 0,5% e água destilada), até a sua utilização. Anterior ao seu uso foi confirmada a pureza das culturas, empregando-se o equipamento MALDI-TOF MS Biotyper (Bruker).

3.4 Preparo e padronização do inóculo

A reativação das cepas foram realizadas inoculando-se alíquotas de 1 mL das culturas estoque em tubo de ensaio, contendo 10 mL de caldo de triptona de soja acrescido de extrato de levedura 0,6% (TSB- EL) e incubação a 37 °C por 24 horas.

Após esse período, alíquota de 100 µL das culturas foram transferidas para 100 mL de TSB-EL e incubadas a 37 °C até a obtenção de cerca de 10⁸ UFC.mL⁻¹. A padronização do inóculo foi realizada por curva de crescimento. A densidade óptica (DO 600nm) foi

monitorada juntamente com a contagem em placa em ágar triptona de soja (TSA) suplementado com 0,6% (m / v) de extrato de levedura (EL). A absorbância encontrada foi 0,385 para *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 0,135 para *L. monocytogenes* ATCC 15313, à concentração de 10^8 UFC. mL⁻¹.

3.5 Determinação da concentração mínima bactericida de óleos essenciais sobre *Listeria monocytogenes*

A concentração mínima bactericida dos óleos essenciais foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo com adaptações, utilizando placas de poliestireno de 96 cavidades (CLSI, 2019). Os óleos essenciais foram homogeneizados em TSB-EL, acrescido de Tween 80 (0,5%). Foram avaliadas as concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03, 0,015% (v / v). Alíquotas de 100 µL das soluções foram adicionadas nas cavidades e inoculadas com 10 µL das culturas padronizadas. As microplacas foram vedadas e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA-EL e incubadas a 37 °C por 24 horas. Foi realizado um controle negativo, contendo TSB-EL acrescido de 0,5% de Tween 80 e o óleo essencial. A CMB foi considerada a menor concentração de óleo essencial onde não se observou crescimento em placas das bactérias. O experimento foi realizado em triplicata e três repetições.

3.6 Adaptação de cepas de *L. monocytogenes* aos óleos essenciais

As células de *L. monocytogenes* foram expostas a concentrações subletais dos óleos essenciais de melaleuca, orégano e tomilho. As doses subletais foram determinadas com base nas CMB e foram equivalentes a CMB/4, CMB/8, CMB/16 (LUNDÉN *et al.*, 2003). Em tubos tipo Falcon contendo 36 mL de caldo TSB-EL acrescido de 0,5% de Tween 80, foram adicionados os óleos essenciais nas concentrações subletais. Após homogeneização, alíquotas de 4 mL de inóculo padronizado foram inoculadas ao meio e os tubos foram incubados a 37°C por 6 horas. O volume dos tubos falcon foram transferidos para tubos eppendorfs de 2 ml, e centrifugados em centrífuga da marca Spinlab, modelo SL 5 AM, a 3.000 xg por 5min., o sobrenadante descartado, as células, denominadas de adaptadas, foram lavadas três vezes com solução salina (0,85% m/v), ressuscendidas em caldo TSB- EL e padronizadas em torno de 10^8 UFC.mL⁻¹ para utilização.

3.7 Resposta adaptativa aos óleos essenciais

As células adaptadas e padronizadas foram incubadas em presença de diferentes concentrações do mesmo óleo essencial utilizado para sua adaptação nas concentrações de CMB/2; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2CMB. Utilizou-se microplacas de poliestireno de 96 cavidades. Os óleos essenciais foram homogeneizados em TSB-EL, adicionados de Tween 80 (0,5%). Aliquotas de 100 µL das soluções foram adicionadas nas cavidades e inoculadas com 10 µL das culturas padronizadas. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, alíquotas de 10 µL foram plaqueadas em TSA-EL empregando-se a técnica de microgotas e incubadas a 37 °C por 24 horas.

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais

A CMB dos óleos essenciais de melaleuca, orégano e tomilho sobre a cepa ATCC 7644 foi de 2%. O mesmo valor foi observado para os óleos de melaleuca e tomilho para a cepa ATCC 15313, já para o óleo de orégano a CMB foi de 1%.

Silva *et al.* (2019) determinaram uma CMB de 0,15µL/ml utilizando óleo essencial de melaleuca aplicado em uma cepa de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e concentração mínima inibitória (CMI) de 0,1 µL/ml. As concentrações também diferenciaram das encontradas por Mazzarrino *et al.* (2015), que obtiveram CMI de 10 µg/ml utilizando a mesma cepa. Esse resultado pode estar relacionado à variação da concentração de compostos majoritários do óleo, como de terpinen-4-ol que variava em cerca de 5% de predominância na composição, segundo os autores. A atividade dos óleos essenciais está condicionada à capacidade de desestruturar a parede e membrana celular bacteriana, aumentando sua permeabilidade por meio de alterações na conformação de alguns polissacarídeos, ácidos graxos além das camadas de fosfolipídios (GUTIÉRREZ-DEL-RÍO; FERNÁNDEZ; LOMBÓ, 2018).

Testes realizados por Mouwaked *et al.* (2018) avaliaram o óleo essencial de cominho negro (*Nigella Sativa*) buscando avaliar seus compostos ativos, dentre eles o carvacrol que também compõe majoritariamente o óleo essencial de orégano, contra cepas de *L.*

monocytogenes. No estudo o composto se mostrou ativo exibindo um valor de CMI de 0,15mg/ml.

Santos *et al.* (2018) obtiveram 1,0 mg/mL de CMB dos óleos essenciais de orégano e tomilho em testes com cepas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*. O estudo também teve o achado de valores iguais de CMB para diferentes cepas da bactéria em relação óleo essencial de tomilho.

Os valores diversos encontrados pelos diferentes autores podem ser atribuídos a como se apresentam os compostos majoritários dos óleos, que desenvolvem com ênfase a ação antimicrobiana, bem como pela variação na composição de seus componentes-traço, que são descritos em estudos anteriores como atuantes cruciais, devido ao possível efeito do sinergismo sendo capazes de intensificar a ação biológica (JING *et al.* 2014; O'BRYAN *et al.*, 2008; SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017).

4.2 Adaptação de cepas de *Listeria monocytogenes* aos óleos essenciais

A avaliação da adaptação foi realizada pela adição de 1/4, 1/8 e 1/16 da concentração dos óleos essenciais obtidas no teste de CMB das células de *L.monocytogenes*, conforme indicado nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1- Concentração subletal dos óleos essenciais para a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644.

ESTRESSE SUBLETAL	Concentração	Concentração	Concentração
	1/4CMB	1/8CMB	1/16CMB
MEL	0,5%	0,25%	0,125%
OREG	0,5%	0,25%	0,125%
TOM	0,5%	0,25%	0,125%

Fonte: Da autora, (2020).

Tabela 2- Concentração subletal dos óleos essenciais para a cepa *L. monocytogenes* ATCC 15313 (continua).

ESTRESSE SUBLETAL	Concentração	Concentração	Concentração
	1/4CMB	1/8CMB	1/16CMB

MEL	0,5%	0,25%	0,125%
OREG	0,25%	0,125%	0,062%
TOM	0,5%	0,25%	0,125%

Fonte: Da autora, (2020).

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4, ocorreu à adaptação das bactérias frente ao óleo de melaleuca em ambas as estirpes, sendo observada a adaptação de até duas vezes mais (4%), quando expostas a 1/8 (0,25%) do óleo para a cepa ATCC7644 e quando exposta a 1/16 (0,125%) do óleo para a cepa ATCC 15313. Foi possível também observar a adaptação da cepa 15313 ao óleo essencial de orégano em até duas vezes mais (2%) quando exposta a 1/8 (0,125%) do óleo. Em ambas as cepas para o óleo essencial de tomilho foi considerado que não houve adaptação ao óleo essencial, por não apresentar crescimento nas placas.

Tabela 3- Adaptação de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 aos óleos essenciais de melaleuca, orégano e tomilho.

ESTRESSE SUBLETAL								
1/4CMB		CMB/2	CMB	1,2x CMB	1,4x CMB	1,6x CMB	1,8x CMB	2x CMB
0,5%	MEL	-	-	-	-	-	-	-
0,5%	OREG	-	-	-	-	-	-	-
0,5%	TOM	-	-	-	-	-	-	-
1/8CMB		CMB/2	CMB	1,2x CMB	1,4x CMB	1,6x CMB	1,8x CMB	2x CMB
0,25%	MEL	+	+	+	+	+	+	+
0,25%	OREG	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	TOM	-	-	-	-	-	-	-
1/16CMB		CMB/2	CMB	1,2x CMB	1,4x CMB	1,6x CMB	1,8x CMB	2x CMB
0,125%	MEL	+	+	+	+	+	+	+
0,125%	OREG	-	-	-	-	-	-	-
0,125%	TOM	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Da autora, (2020).

Tabela 4- Adaptação de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 aos óleos essenciais de melaleuca, orégano e tomilho (continua).

ESTRESSE SUBLETAL								
1/4CMB		CMB/2	CMB	1,2x CMB	1,4x CMB	1,6x CMB	1,8x CMB	2x CMB
0,5%	MEL	-	-	-	-	-	-	-

0,25%	OREG	-	-	-	-	-	-	-
0,5%	TOM	-	-	-	-	-	-	-
1/8CMB		CMB/2	CMB	1,2x	1,4x	1,6x	1,8x	2x
				CMB	CMB	CMB	CMB	CMB
0,25%	MEL	-	-	-	-	-	-	-
0,125%	OREG	+	+	+	+	+	+	+
0,25%	TOM	-	-	-	-	-	-	-
1/16CMB		CMB/2	CMB	1,2x	1,4x	1,6x	1,8x	2x
				CMB	CMB	CMB	CMB	CMB
0,125%	MEL	+	+	+	+	+	+	+
0,062%	OREG	+	+	+	+	+	+	+
0,125%	TOM	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Da autora, (2020).

Respostas transitórias adaptativas ao estresse caracterizam-se como a tolerância adquirida após submissão a condição de estressoras de forma subletal àquelas normalmente letais. Nostro *et al.* (2017) ao testarem diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* em concentrações subletais à CMB, observaram a adaptação de metade delas ao composto carvacrol. Já Luz *et al.* (2012) ao exporem cepas de *L. monocytogenes* à condições subletais não verificaram efeitos sobre o aumento de tolerância ao carvacrol e ou ao óleo essencial de orégano (MELO *et al.*, 2015).

Quando Neto *et al.* (2012) submeteram *L. monocytogenes* e *S. aureus* ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. ou ao seu componente majoritário 1,8-cineol, um dos componentes em comum com o óleo de melaleuca, não observaram resposta adaptativa das bactérias.

Melo *et al.* (2015) avaliaram a capacidade de adaptação das bactérias *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Enterococcus faecalis* a doses subletais dos óleos essenciais de melaleuca, tomilho e orégano, obtiveram o posterior crescimento de todas as cepas testadas para óleo de melaleuca, seguido por maior adaptação das diferentes estirpes para os óleos essenciais de orégano, seguida pelo de tomilho. Esta atuação pode se dever a modificação do perfil de proteínas relacionadas à biossíntese de ácidos graxos, aumentando a concentração de ácidos graxos insaturados (SANTOS *et al.*, 2018).

Quendera, Barreto, Samed-Lemsaddek (2018) avaliaram diferentes óleos essenciais contra bactérias patogênicas de origem alimentar, ressaltando a eficiência do óleo essencial de melaleuca e assegurando o destaque ao efeito antimicrobiano dos componentes de alguns destes óleos, em evidência o timol.

Compartilhando de resultados que também destacaram o óleo essencial de tomilho, Braschi *et al.*(2018), tiveram evidências que estresse subletal gerado pelo OE de tomilho induziu a menor expressão do gene codificador de proteínas de resposta ao estresse e de proteção e reparo do DNA. Mesmo que a adaptação não ocorra, há alteração nos genes e um claro efeito do óleo no controle dos mecanismos bioquímicos celulares e na divisão dessas células, quando aplicado na bactéria *Listeria monocytogenes*.

5 CONCLUSÃO

Verificou-se que os óleos essenciais de melaleuca orégano e tomilho possuem ação bactericida sobre as células de cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e ATCC15313.

Ambas apresentaram capacidade adaptativa quando expostas a dose subletal do óleo essencial de melaleuca. A cepa *L. monocytogenes* ATCC 15313 mostrou adaptação ao óleo essencial de orégano, no entanto este foi o óleo testado que apresentou a maior eficiência bactericida.

Já o óleo essencial de tomilho foi o único que nenhuma das estirpes desenvolveu adaptação nas concentrações subletais e nos diferentes tempos avaliados neste estudo, mostrando-se o mais seguro para possível aplicação na indústria de alimentos e na área da saúde.

Tais resultados reforçam a eficiência e a necessidade de se respeitar a concentração adequada de uso destes agentes antimicrobianos, com o intuito de prevenir a capacidade adaptativa desses patógenos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food Microbiology**. 3rd. ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008, 463 p.
- ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. *et al.* The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 213, p. 99-109, Nov. 2015.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p.446- 475, 2008.
- BERNARDES, N. B. *et al.* Intoxicação Alimentar: Um problema de Saúde Pública. **Id on Line Revista Multidisciplinar e de Psicologia**, Guararapes, v. 12, n. 42, p. 894-906, 2018.
- BRASCHI, Giacomo *et al.* Gene expression responses of *Listeria monocytogenes* Scott A exposed to sub-lethal concentrations of natural antimicrobials. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 286, p. 170–178, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.026>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico 32**. Disponível em: <https://socgastro.org.br/novo/2020/08/ao-ano-brasil-tem-mais-de-600-surtos-de-doencas-transmitidas-por-agua-e-comida/>. Acesso em: 07 mar. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Informações Técnicas: Doenças Transmitidas por Alimentos**. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos/informacoes-tecnicas>. Acesso em: 05 jan. 2021.
- BRAUNER, A. *et al.* Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 14, n. 5, p. 320-330, Apr. 2016.
- BURT, S. A. *et al.* Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.3, n. 01, p. 223- 253, Aug. 2004.
- CEBRIÁN, G. *et al.* Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 01, p. 26- 33, 2010.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL PREVENTION (2020). **Listeria (Listeriosis)**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>. Acesso em: 09 dez. 2020.
- CHOTYAKUL, Nattaporn; BOONNOON, Nutdanai. High Pressure Food Processing: an Alternative Technology To Reduce Food Additives Used in Processed Meat Products. [s. l.], v. 8, n. 1, p. 327–341, 2016.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria**; 1th ed. Wayne, PA: CLSI document M100, 2019.
- DAS, Sourav *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin – captured essential oils. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 278, p. 305–313, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.047>.

DYGICO, L. K. *et al.* The ability of *Listeria monocytogenes* to form biofilm on surfaces relevant to the mushroom production environment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 317, p. 1- 10, Mar. 2020.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2020). *Listeria*. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria>. Acesso em: 09 dez. 2020.

FERREIRA, V. *et al.* *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 77, n. 01, p. 150-170, Jan. 2014.

FOOD & DRUG ADMINISTRATION. **Generally Recognized as safe (GRAS)**. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>. Acesso em: 07 dez. 2020.

FOOD & DRUG ADMINISTRATION. **What You Need to Know about Foodborne Illnesses**. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/consumers/what-you-need-know-about-foodborne-illnesses>. Acesso em: 07 mar. 2021.

GIMÉNEZ *et al.* Treatment of beef with gaseous ozone: Physicochemical aspects and antimicrobial effects on heterotrophic microflora and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Vurrey, v. 121, Mar, 2021.

GUTIÉRREZ-DEL-RÍO, I.; FERNÁNDEZ, J.; LOMBÓ, F. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: Terpenoids, polyphenols and thiols. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 52, n. 03, p. 1-7, Sept. 2018.

HOFER, E. *et al.* Serovars of *Listeria monocytogenes* and related species isolated from human clinical specimens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 32–37, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0037-86822006000100006>.

JAYASENA, D.D.; CHEORUN, J. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Netherlands, v. 34, n. 02, p. 96-108, Dec. 2013.

JING, L. *et al.* Antifungal activity of citrus essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 14, p. 3011–3033, Apr. 2014.

KUMARASWAMY, M. *et al.* *Listeria monocytogenes* endocarditis: case report, review of the literature, and laboratory evaluation of potential novel antibiotic synergies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 468–478, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.12.032>.

LECUIT, M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 430–436, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01146.x>.

LI, J. *et al.* Fluorescent Janus emulsions for biosensing of *Listeria monocytogenes*. **Processing of the National Academy of science of the United States of america**, Washington, v. 117, n. 22, p. 11923- 11930, Apr. 2020.

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

LUZ, I. S. *et al.* Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. **Food Research International**, Essex, v. 48, n.02, p.667–672, Oct. 2012.

MAZZARRINO,G. *et al.* *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. **Food Control**, Vurrey, v. 50, p. 794-803, Apr. 2015.

MELO, A. D. B. *et al.* Antimicrobial effect against diferent bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 79. n. 04, p. 285-289, Oct. 2015.

MELO, E.S., *et al.* Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil: revisão Foodborne diseases and major bacterial agents involved in outbreaks in Brazil: review Enfermedades transmitidas por alimentos y principales agent. **Pubvet**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1-9, 2018.

MITTAL, R.; RANA, A.; JAITAK, V. Essential Oils: An impending substitute of synthetic antimicrobial agents to overcome antimicrobial resistance. **Current Drug Targets**, Chennai, v. 20, n. 06, p. 605- 624, 2019.

MOUWAKEH, A. *et al.* Antibacterial and resistance modifying activities of *Nigella sativa* essential oil and its active compounds against *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research**, Singapura, v. 32, n. 04, p. 737- 743, Aug. 2018.

NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 06, n. 12, p. 1451-1474, Nov. 2013.

NETO, N. J.G. *et al.* *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, n. 08, p. 973-981, Aug. 2012.

NOSTRO, A. *et al.* Effects of adaptation to carvacrol on *Staphylococcus aureus* in the planktonic and biofilm phases. **Journal Biofouling**, Abingdon, v. 33, n. 06, p. 470-489, May. 2017.

O'BRYAN, C. A. *et al.* Orange essential oils antimicrobial activites against *Salmonella* spp. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 73, n. 06, p. 264- 267, Aug. 2008.

PALMA, Joana M. *et al.* Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito

Federal, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 36, n. 10, p. 957–964, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016001000007>.

QUENDERA, A. P.; BARRETO, A. S.; SEMEDO-LEMSADDEK, T. Antimicrobial activity of essential oils against foodborne multidrug-resistant enterococci and aeromonads in planktonic and biofilm state. **Food Science and Technology International**, New York, v. 25, n. 02, p. 101-108, Mar. 2019.

ROBERTS B. N. *et al.* *Listeria monocytogenes* response to anaerobic environments. **Pathogens**, Basel, v. 09, n. 03, p. 210-219, Mar. 2020.

RUUSUNEN, Marita; PUOLANNE, Eero. Reducing sodium intake from meat products. **Meat Science**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 531–541, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.016>.

SANTA CATARINA. Vigilância Sanitária. **Doenças Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)**. Disponível em: <http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/91-area-de-atuacao/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/415-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-dtha>. Acesso em: 07 dez. 2020.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C.M. O. *et al.*, (Org.) **Farmacognosia da plantaõ medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da universidade, 2000, p.333-365.

SANTOS, J. M. P. *et al.* Homologous and Heterologous adaptation of *Listeria* spp. to essential oils of condiment plants. **Advances in Microbiology**, v.08, n. 08, p. 639-649, Aug. 2018.

SAUDERS, B. D. *et al.* Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 12, p. 4420-4433, Jun. 2012.

SILVA, J. C. G. *et al.* Incidência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no estado de Pernambuco, um acompanhamento dos dados epidemiológicos nos últimos anos. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde- FACIPE**, Recife, v. 3, n. 1, p. 23, 2017.

SILVA, C. S. *et al.* Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Melaleuca Alternifolia* (Tea tree) essential oil in ground beef. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 293, p. 79-86, Mar. 2019.

SOUZA, E.L. The effects of sublethal doses of essential oil and your constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance entre food-related bacteria: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Netherlands, v. 56, p. 1-12, 2016.

SWAMY, Mallappa Kumara; AKHTAR, Mohd Sayeed; SINNIAH, Uma Rani. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–21, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>.

TACK, D. M. *et al.* Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens

Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016–2019. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [s. l.], v. 69, n. 17, p. 509–514, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6917a1>.

TARCITANO, Luiz Antonio Costa; DE MESQUITA, Eliana de Fatima Marques. Ação dos condimentos alimentares in Natura sobre a microbiota patógena durante o processamento, preparo e/ou consumo do pescado: Uma revisão sistemática de literatura. **Arquivos de Ciências do Mar**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 141, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.32360/acmar.v50i1.18839>.

VÄLIMAA, Anna Liisa; TILSALA-TIMISJÄRVI, Anu; VIRTANEN, Elina. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain- A review. **Food Control**, [s. l.], v. 55, p. 103–114, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.037>.

WESCHE, ALISSA M. et al. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 05, p. 1121-1138, 2009.