



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Filomena de Oliveira e Carvalho

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *MELISSA OFFICINALIS* EM *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* E APLICAÇÃO EM MODELOS ALIMENTARES

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar,  
orientada pela Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira e pela  
Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena, apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Filomena de Oliveira e Carvalho

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *MELISSA OFFICINALIS* EM *LISTERIA MONOCYTOGENES*  
E APLICAÇÃO EM MODELOS ALIMENTARES**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira e pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2021

## **Agradecimentos**

Ao longo deste ano de trabalho foi imprescindível o apoio de várias pessoas, às quais deixo os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao CICS-UBI por me receber para a realização da minha tese, permitindo que este trabalho se concretizasse.

Deixo um grande agradecimento à minha orientadora externa, Doutora Susana Ferreira, por me aceitar no seu grupo de trabalho e pela excelente orientação, por toda a ajuda, toda a paciência e tudo o que me ensinou ao longo deste ano.

Quero agradecer a todo o pessoal do CICS-UBI por toda a simpatia e constante disponibilidade para ajudar. Deixo um grande agradecimento a todos os meus colegas de laboratório, em especial à Alexandra, Francisca, Rodrigo, Cathy e Cristiana pelo ambiente incrível que sempre proporcionaram no laboratório e toda a entreeajuda e companheirismo ao longo deste ano. À Alexandra, um obrigada especial pela mentora que considero ter sido para mim e por tudo o que partilhámos ao longo deste ano, trabalhando lado-a-lado.

Um muito obrigada à minha orientadora interna, Professora Doutora Angelina Pena, por disponibilizar-se a acompanhar-me neste trabalho.

Aos meus colegas de faculdade e amigos, Filipa e Robalo, por partilharmos entre nós todas as falhas e todas as conquistas e sempre me incentivarem a dar o meu melhor.

A todos os meus amigos, obrigada por todo o apoio e por me motivarem a continuar.

Ao meu namorado Jorge, por estar comigo em todos os altos e baixos e nunca me deixar desistir.

À minha família: aos meus pais, irmãos, cunhadas e sobrinha, agradeço por estarem do meu lado e sempre me apoiarem em todo o meu percurso, tornando isto possível.

## Índice

Agradecimentos .....	i
Índice .....	ii
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tabelas.....	iv
Lista de Abreviaturas .....	v
Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Contaminação biológica de alimentos e doenças de origem alimentar .....	1
1.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	1
1.1.1.1. Listeriose e fatores de virulência .....	3
1.1.1.1.1. Biofilmes, motilidade e <i>quorum sensing</i> .....	5
1.1.1.2. Resistência a antibióticos e biocidas.....	7
1.1.1.3. Persistência em alimentos e ambiente de processamento alimentar.....	8
1.2. Conservação dos alimentos .....	9
1.2.1. Óleos essenciais como agentes antimicrobianos.....	9
1.2.1.1. Uso alimentar .....	11
1.3. <i>Melissa officinalis</i> .....	12
1.3.1. Usos tradicionais.....	13
1.3.2. Composição química.....	13
2. Objetivos do estudo.....	15
3. Materiais e Métodos .....	16
3.1. Óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> .....	16
3.2. Microrganismos e meios de cultura utilizados.....	16
3.3. Avaliação da suscetibilidade de <i>Listeria monocytogenes</i> ao óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> .....	17
3.3.1. Método da difusão em disco .....	17
3.3.2. Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI).....	17
3.4. Determinação de curvas de morte .....	18
3.5. Avaliação do efeito do óleo essencial no <i>quorum sensing</i> .....	19
3.6. Determinação do efeito do óleo essencial na formação de biofilme .....	20
3.7. Ensaio de motilidade.....	20
3.8. Avaliação da tolerância a condições adversas.....	21
3.8.1. Calor.....	21
3.8.2. Ácido .....	22
3.8.3. Stress osmótico.....	22
3.8.4. Dessecação.....	22
3.9. Resistência cruzada .....	22
3.10. Capacidade de invasão por <i>L. monocytogenes</i> em células epiteliais Caco-2.....	23
3.11. Aplicação do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> em modelos alimentares .....	24
3.11.1. Alface, leite e suco de frango.....	24
3.11.2. Sumo de melancia.....	24
3.12. Análise estatística .....	25

4. Resultados e Discussão.....	26
4.1. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i> .....	26
4.2. Efeito do óleo essencial na virulência de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	29
4.2.1. <i>Quorum sensing</i> , biofilmes e motilidade.....	29
4.2.2. Tolerância a condições adversas, resistência cruzada e capacidade de invasão celular .....	33
4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> em modelos alimentares.....	41
5. Conclusão .....	48
6. Perspetivas Futuras .....	49
Referências bibliográficas .....	50

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de patogênese de <i>Listeria monocytogenes</i> . .....	5
<b>Figura 2.</b> Curvas de morte para <i>Listeria monocytogenes</i> incubada com óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> .....	28
<b>Figura 3.</b> Inibição de <i>quorum sensing</i> pelo óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> , DMSO e resveratrol. ....	31
<b>Figura 4.</b> Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> na formação de biofilme por <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	32
<b>Figura 5.</b> Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> na motilidade de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	33
<b>Figura 6.</b> Influência de altas temperaturas na sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> após incubação com o óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> . ....	35
<b>Figura 7.</b> Influência de pH ácido na sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> após incubação com o óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> . ....	36
<b>Figura 8.</b> Influência de altas concentrações de NaCl na sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> após incubação com o óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> . ....	37
<b>Figura 9.</b> Influência de condições de dessecação na sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> após incubação com o óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> . ....	37
<b>Figura 10.</b> Capacidade de invasão de <i>Listeria monocytogenes</i> após incubação com o óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> . ....	40
<b>Figura 11.</b> Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i> em suco de alface iceberg. ....	42
<b>Figura 12.</b> Efeito do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i> em leite magro e leite gordo. ....	43
<b>Figura 13.</b> Efeito do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i> em suco de frango. ....	44
<b>Figura 14.</b> Efeito do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i> em sumo de melancia não pasteurizado.....	45
<b>Figura 15.</b> Sumo de melancia com e sem óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> após 14 dias..	47

## Índice de Tabelas

<b>Tabela I.</b> Composição do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> .....	16
<b>Tabela II.</b> Halos de inibição e valores de concentração mínima inibitória do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> e da ampicilina para <i>Listeria monocytogenes</i> .....	27
<b>Tabela III.</b> Valores de concentração mínima inibitória de diferentes antibióticos para <i>Listeria monocytogenes</i> após incubação com óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> .....	39
<b>Tabela IV.</b> Efeito do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> sob a microbiota natural de sumo de melancia.....	46

## Lista de Abreviaturas

**ADN** – ácido desoxirribonucleico

**ATP** – trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)

**CMI** – concentração mínima inibitória

**CO<sub>2</sub>** – dióxido de carbono

**DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**DO** – densidade ótica

**EUA** – Estados Unidos da América

**FbpA** – proteína ligante de fibronectina

**FBS** – *Fetal Bovine Serum*

**FDA** – do inglês *Food and Drug Administration*

**GC-MS** – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*)

**InIA** – Internalina A

**InIB** – Internalina B

**LAP** – proteína de adesão de *Listeria*

**LB** – *Luria-Bertani*

**log<sub>10</sub>** – logaritmo decimal

**LPS** – lipopolissacarídeo

**NaCl** – cloreto de sódio

**PALCAM** – do inglês *Polymyxin acriflavine lithium chloride ceftazidime aesculin mannitol*

**rcf** – força centrífuga relativa (do inglês *relative centrifugal force*)

**rpm** – rotações por minuto

**TSA** – do inglês *Tryptic Soy Agar*

**TSB** – do inglês *Tryptic Soy Broth*

**UE** – União Europeia

**UFC** – unidades formadoras de colónia

**UHT** – ultrapasteurizado

**UV** – ultravioleta

**YGCA** – do inglês *Yeast Extract Glucose Chloramphenicol agar*

## Resumo

A contaminação de alimentos por organismos patogênicos está associada a um impacto negativo na saúde pública e na economia dos países e entre estes agentes salienta-se a bactéria *Listeria monocytogenes*. A utilização de alguns métodos convencionais para o controlo destes patógenos, nomeadamente de conservantes químicos, tem vindo a ser questionada, devido a potenciais efeitos negativos para a saúde que podem advir do seu uso. Assim, o uso de plantas medicinais em segurança alimentar tem sido evidenciado, pelo seu conteúdo em substâncias bioativas com propriedades antimicrobianas. *Melissa officinalis* é uma planta vastamente utilizada em áreas que incluem a alimentação, conhecida como tendo diversas propriedades biológicas. Assim, o objetivo deste trabalho foi a avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de *M. officinalis* em *L. monocytogenes* e a sua aplicação em diferentes modelos alimentares, com vista à utilização do óleo essencial em conservação alimentar. A atividade antimicrobiana do óleo essencial sobre *L. monocytogenes* foi avaliada através do método da difusão em disco e da determinação da concentração mínima inibitória, sendo o seu modo de ação na bactéria definido através de curvas de morte. A capacidade de interferir com fatores relacionados com a virulência da bactéria foi também estudada, avaliando a inibição do *quorum sensing*, da formação de biofilmes e da motilidade. Para analisar o efeito de uma pré-exposição ao óleo essencial na resistência e virulência de *L. monocytogenes*, testou-se a tolerância da bactéria a diferentes stresses e antibióticos e a sua capacidade de invasão celular, após incubação com concentração subinibitória do óleo essencial. A aplicação do óleo essencial em modelos alimentares foi testada num suco de alface *iceberg*, suco de frango, leite e em sumo de melancia não pasteurizado. O óleo essencial de *M. officinalis* demonstrou forte atividade antimicrobiana em *L. monocytogenes*, exercendo um efeito bactericida. Para além disso, demonstrou, em determinadas concentrações, um efeito inibitório acentuado no *quorum sensing* e formação de biofilmes pela bactéria, assim como uma ligeira inibição da motilidade. A exposição prévia de *L. monocytogenes* a concentração subinibitória do óleo essencial não provocou um aumento da tolerância a ácido (pH 2,4), temperatura alta (55 °C), stress osmótico (12% (m/v) NaCl) e dessecação, indução de resistência cruzada com antibióticos, nem capacidade aumentada de invadir células epiteliais intestinais (Caco-2). Em modelos alimentares, o óleo essencial levou a uma forte inibição de *L. monocytogenes* em simulante de alface *iceberg* e sumo de melancia, assim como da microbiota natural do mesmo sumo. O óleo essencial de *M. officinalis* demonstrou assim um forte potencial para ser utilizado no controlo de *L. monocytogenes* e como conservante na indústria alimentar.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, óleo essencial, *Melissa officinalis*, atividade antimicrobiana, conservação alimentar.

## Abstract

The contamination of food by pathogenic organisms, among which *Listeria monocytogenes* is highlighted, is associated to a negative impact on public health and countries' economy. The utilization of conventional methods for the control of these pathogens, namely of chemical preservatives, has been questioned because of its potential negative health effects. Recently, the use of medicinal plants in food safety has become a trend, for its content in bioactive substances with antimicrobial properties. *Melissa officinalis* is a plant that has been used in various areas, including food, and which is known for its biological properties. Thus, the goal of this work was to evaluate the antimicrobial effect of *M. officinalis* essential oil against *L. monocytogenes* and its application in different food models, aiming for its future use in food preservation. The antimicrobial activity of this plant's essential oil against *Listeria monocytogenes* was evaluated through the disk diffusion method and determination of the minimal inhibitory concentration, with its action mode on the bacteria being defined through time-kill curves. The ability to interfere with some virulence related factors of the bacterium was also studied, by evaluating quorum sensing, biofilm formation and motility's inhibition. In order to test the effect of a pre-exposition of *L. monocytogenes* to the essential oil on the bacterial resistance and virulence, the bacteria's tolerance to different stresses and antibiotics and its invasion ability were tested, after incubation with subinhibitory concentration of the essential oil. The application of the essential oil in food models was tested in an iceberg lettuce liquid media, chicken juice, milk and watermelon fresh juice. The essential oil of *M. officinalis* showed strong antimicrobial activity against *L. monocytogenes*, having a bactericidal effect. Furthermore, it demonstrated, in certain concentrations, an accentuated inhibitory effect on quorum sensing and biofilm formation by the bacterium, as well as a slight inhibition of motility. The pre-exposition of *L. monocytogenes* to a subinhibitory level of the essential oil did not cause an increase in tolerance of acid (pH 2.4), high temperature (55 °C), osmotic stress (12% (m/v) NaCl) and desiccation, an induction of cross-resistance with antibiotics, neither augmented ability to invade intestinal epithelial cells (Caco-2). In food models, the essential oil caused a strong inhibition of *L. monocytogenes* in a simulant of iceberg lettuce and in watermelon juice, such as in the watermelon juice's natural microbiota. The essential oil of *M. officinalis* has shown strong potential to be used as control of *L. monocytogenes* and a preservative in the food industry.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, essential oil, *Melissa officinalis*, antimicrobial activity, food preservation.

## **I. Introdução**

### **I.1. Contaminação biológica de alimentos e doenças de origem alimentar**

Um dos problemas associados aos produtos alimentares é o facto de poderem ser facilmente contaminados com organismos patogénicos. O consumo de alimentos contaminados é um problema global e tem um grande impacto económico e na saúde pública (Gandhi e Chikindas, 2007). Mais de 200 doenças transmitidas através de alimentos e produtos alimentares são conhecidas, sendo que, em 2010, se estimou que aproximadamente 550 milhões de doenças foram causadas por agentes infecciosos de origem alimentar (WHO, 2015).

Muitas das doenças de origem alimentar são resultantes do consumo de alimentos contaminados com bactérias, vírus, parasitas e/ou toxinas (Shamloo *et al.*, 2019). Estas causam sintomas que variam entre moderados e auto-limitados (náuseas, diarreia ou vómitos), a debilitantes (falha dos rins e fígado, distúrbios cerebrais e neuronais, paralisia ou potencialmente cancro) que podem ser fatais e levar a mortes prematuras (Mead *et al.*, 1999; WHO, 2015). Os microrganismos patogénicos de origem alimentar afetam principalmente indivíduos com sistemas imunitários debilitados, sendo as crianças mais jovens, as grávidas, os idosos e os indivíduos imunocomprometidos os mais vulneráveis a estas doenças. Para além disso, também é afetado o desenvolvimento económico dos países, principalmente a nível das indústrias do turismo, agricultura e de exportação alimentar, sendo que o facto de exportar produtos não seguros pode levar a perdas económicas significativas (WHO, 2015). Adicionalmente, a hospitalização por doenças de origem alimentar e o seu tratamento têm também um impacto económico negativo nos países, sendo que, de acordo com as estimativas feitas por Scharff (2012), os Estados Unidos, por si só, gastam entre 51 a 78 biliões de dólares por ano em despesas de saúde, relativas a estas doenças.

#### **I.1.1. *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) é um dos microrganismos patogénicos de origem alimentar de maior relevância na União Europeia (UE), uma vez que a doença associada a esta bactéria se apresenta como a zoonose com as taxas mais altas de hospitalização e mortalidade (EFSA, 2018). Esta bactéria pode ser encontrada em várias fontes, como água, solo e vários tipos de produtos alimentares, assim como em animais e humanos (Shamloo *et al.*, 2019). *L. monocytogenes* faz parte da flora fecal de muitos mamíferos, sendo que 2 a 10% da população geral transporta a bactéria sem quaisquer consequências para a saúde (Buchanan *et al.*, 2017).

*L. monocytogenes* é uma espécie pertencente ao género *Listeria*, o qual inclui atualmente 26 espécies, das quais cinco foram identificadas recentemente por Carlin et al. (2021). *L. monocytogenes* encontra-se entre as seis espécies mais comuns do género, juntamente com *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, e *Listeria grayi* (Abdollahzadeh et al., 2017). Apesar de já terem sido identificadas algumas infeções pontuais em humanos por *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. innocua*, a espécie *L. monocytogenes* é a mais frequentemente associada a doença humana (Chambel et al., 2007). *L. monocytogenes* pode ser classificada em treze serótipos de acordo com o seu antigénio somático. Todos eles podem causar doença, no entanto, os serótipos mais prevalentes são o 1/2b, o 1/2a e 4b (Abdollahzadeh et al., 2017).

*L. monocytogenes* é um dos principais causadores de doenças graves em humanos e animais, associados ao consumo de alimentos como leite e outros produtos lácteos, assim como diversas carnes, aves e refeições prontas-a-comer (Shamloo et al., 2019). A sua transmissão desde o prado ao humano ou animal depende de uma combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos à bactéria. Os fatores intrínsecos referem-se à sua diversidade intraespecífica, o metabolismo e circuitos reguladores. Entre os fatores extrínsecos incluem as práticas agrícolas, diversidade da microbiota e fatores abióticos presentes no ambiente agrícola; a formação de biofilmes e os fatores abióticos no ambiente de processamento alimentar; a presença de carboidratos, ácidos gordos e péptidos de cadeia curta no alimento; a diversidade da microbiota, o tipo de dieta e a capacidade de resposta imune do hospedeiro que é infetado (Kallipolitis, Gahan e Piveteau, 2020).

*L. monocytogenes* é uma bactéria de Gram-positivo, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos, catalase positiva, em forma de bacilo e é um agente patogénico psicrotrófico e mesofílico (Mazaheri et al., 2021). Esta representa um risco para a indústria alimentar, por ser capaz de proliferar num largo espetro de condições ambientais adversas, como baixas temperaturas, baixo pH e alta concentração de sal (Hernandez-Milian e Payeras-Cifre, 2014; Olaimat et al., 2018), apesar de a sua temperatura ótima de crescimento ser entre os 30 e os 37 °C (Jemmi e Stephan, 2006). A capacidade de adaptação ao stress causado pelo frio facilita a sua disseminação, visto que torna ineficaz o uso de baixas temperaturas e refrigeração para o seu controlo (Jemmi e Stephan, 2006). Uma vez que é capaz de se multiplicar a temperaturas tão baixas como 2 a 4 °C, a sua presença em refeições prontas-a-comer, com uma vida útil longa, é particularmente preocupante, ainda que temperaturas de confeção superiores a 65 °C destruam a bactéria (EFSA e ECDC, 2014).

Apesar dos esforços a nível de saúde pública e segurança alimentar e dos avanços feitos a nível de métodos laboratoriais, *L. monocytogenes* continua a ser um dos maiores desafios na indústria alimentar (Shamloo *et al.*, 2019).

#### **1.1.1.1. Listeriose e fatores de virulência**

Infeções por *L. monocytogenes* já foram associadas a episódios esporádicos e surtos de doença humana em várias partes do mundo (Jemmi e Stephan, 2006). A doença causada por *L. monocytogenes* é denominada de listeriose e é maioritariamente originada pela ingestão de produtos alimentares contaminados (Abdollahzadeh *et al.*, 2017). A maioria dos países da UE tem uma incidência anual de listeriose humana entre 2 e 10 casos por milhão de habitantes (Jemmi e Stephan, 2006). Este é um valor baixo, no entanto, a taxa de mortalidade situa-se nos 20-30%, o que é preocupante (Lomonaco, Nucera e Filipello, 2015). De facto, em 2017, esta bactéria causou o número mais alto de mortes por doenças de origem alimentar na Europa, sendo que praticamente todos os casos confirmados resultaram em hospitalização (EFSA e ECDC, 2018). A maioria dos surtos de listeriose a nível mundial nos últimos 30 anos tem estado ligada aos serótipos 1/2a e 4b (Lomonaco, Nucera e Filipello, 2015).

A via oral é o principal mecanismo de exposição, tanto para humanos como animais, e estima-se que 99% dos casos de listeriose humana são de origem alimentar (Ricci *et al.*, 2018). Maioritariamente, uma doença febril moderada é causada por *L. monocytogenes*, no entanto, pode ocorrer doença invasiva, uma listeriose sistémica que apresenta sintomas severos e uma taxa de hospitalização e morte mais elevada (Buchanan *et al.*, 2017). Em indivíduos saudáveis, a ingestão de alimentos contaminados com concentrações altas de *L. monocytogenes* pode levar a gastroenterite febril, uma doença não invasiva que surge de 9 a 32 horas após a ingestão, com um período médio de incubação de 20 horas. Os seus sintomas incluem febre, dor abdominal, diarreia, dor de cabeça, náusea, calafrios, fadiga e mialgias, sendo uma doença auto-limitada e que dura menos de 48 horas, geralmente ultrapassada sem intervenção médica (Dalton *et al.*, 1997; de Noordhout *et al.*, 2014; Ooi e Lorber, 2005).

Em indivíduos imunocomprometidos, como idosos ou pacientes que se encontram a receber tratamento com agentes imunossupressores, pode ocorrer septicemia ou meningoencefalite. Neste caso, estima-se que o período médio de incubação da listeriose seja de três semanas. A meningoencefalite pode ser subaguda ou ser repentina, causando dores de cabeça intensas, febre, náuseas, vômitos e sinais de irritação meníngea (Allerberger e Wagner, 2010). Em grávidas, a infeção pode alastrar-se para o feto através da placenta, levando à

ocorrência de um aborto, nascimento de um feto morto ou com infecção generalizada, ou problemas no recém-nascido como septicemia ou meningite (Allerberger e Wagner, 2010).

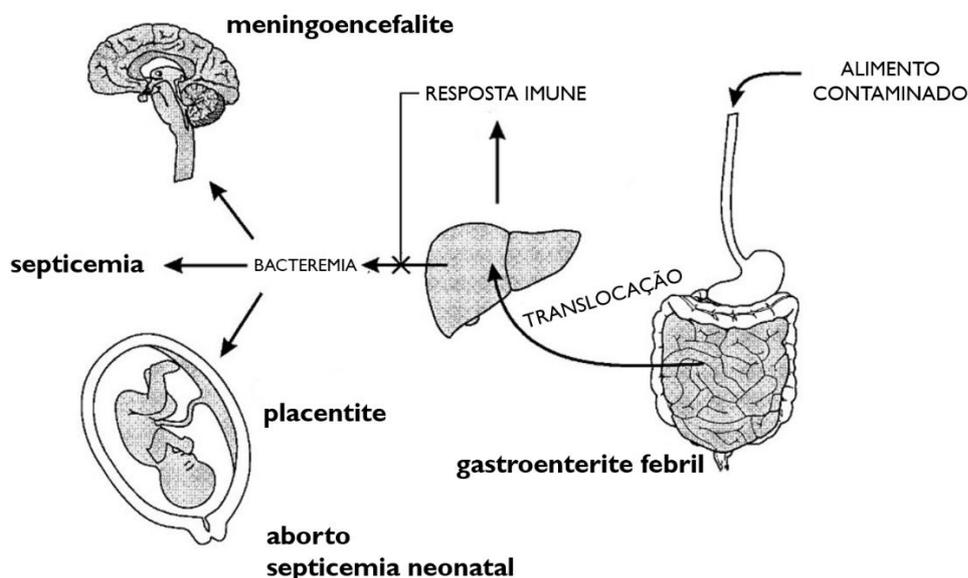
A virulência de *L. monocytogenes* reside em mecanismos altamente eficientes de invasão e propagação, que permitem um ciclo de vida intracelular (Marini *et al.*, 2018). Essa virulência começa com a invasão das células do hospedeiro, sendo InlA (internalina A) e InlB (internalina B) as duas proteínas de *L. monocytogenes* maioritariamente responsáveis por essa invasão, pertencentes à família das internalinas (Pizarro-Cerda, Kuhbacher e Cossart, 2012). A E-caderina é uma molécula de adesão localizada na superfície de células do hospedeiro e identificada como o recetor celular da proteína InlA, e participa por exemplo na formação de junções apertadas na barreira intestinal, responsáveis por manter o órgão impermeável ao ambiente exterior (Mengaud *et al.*, 1996; Pizarro-Cerda, Kuhbacher e Cossart, 2012). Assim, *L. monocytogenes* é capaz de subverter esses mecanismos, através da interação entre InlA e E-caderina, permitindo a adesão da bactéria e a sua entrada nas células hospedeiras (Pizarro-Cerda, Kuhbacher e Cossart, 2012).

Listeriolisina (LLO), a hemolisina de *Listeria* spp., foi o primeiro fator de virulência de *L. monocytogenes* a ser determinado (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Esta é codificada pelo gene *hly* e é uma toxina que promove a infecção a partir de vários nichos no hospedeiro (Farber e Peterkin, 1991). LLO também auxilia a internalização de *L. monocytogenes*, através de fagossomas, criando perfurações na membrana da célula hospedeira (Matereke e Okoh, 2020). No fagossoma do hospedeiro, a LLO induz a formação de poros, facilitando o escape da bactéria e auxiliando à sua replicação intracelular (Matereke e Okoh, 2020).

Outro fator de virulência de *L. monocytogenes* são as suas fosfolipases C, PI-PLC e PC-PLC, codificadas pelos genes *plcA* e *plcB*, respetivamente. Estas fosfolipases também estão envolvidas no escape da bactéria de vacúolos para o interior da célula hospedeira e promovem a sua propagação célula-a-célula (Smith *et al.*, 1995). Já dentro do citosol das células hospedeiras, uma proteína ActA codificada pelo gene *actA* de *L. monocytogenes*, ativa a polimerização de actina e forma uma cauda, permitindo a motilidade da bactéria no citosol e a formação de protuberâncias na superfície das células hospedeiras, levando à sua difusão célula-a-célula (Kocks *et al.*, 1992). Recentemente, foi identificado outro papel desta proteína, na agregação e persistência de *L. monocytogenes* no intestino, cruciais para a sua persistência e transmissão (Travier e Lecuit, 2014). Outros fatores de virulência já foram identificados, como a FbpA, a proteína ligante de fibronectina, envolvida em processos de colonização do intestino e do fígado, e enzimas como a lecitinase, zinco protease e serina protease (Jemmi e Stephan, 2006). Todos estes processos são regulados maioritariamente pelo regulador transcricional PrfA (*prfA*), que é ativado seletivamente durante a infecção do hospedeiro (de las Heras, de et

al., 2011). Recentemente, foi demonstrado que uma Proteína de Adesão de *Listeria* (LAP) também contribui para a translocação da bactéria para lá do epitélio intestinal, ao induzir a disfunção da barreira epitelial intestinal (Droliá et al., 2018).

Após o atravessamento da barreira intestinal e difusão pelas células do hospedeiro, ocorre o transporte da bactéria através da linfa ou do sangue para os nódulos linfáticos mesentéricos, o baço ou o fígado. Se não existir uma resposta imune capaz no fígado, situação que pode ocorrer em indivíduos imunocomprometidos, pode haver a libertação da bactéria para a circulação, originando os casos de meningoencefalite, septicemia ou passagem através da placenta, ou ocorrerá apenas uma gastroenterite em indivíduos saudáveis (Fig. 1) (Vázquez-Boland et al., 2001).



**Figura 1.** Mecanismo de patogênese de *Listeria monocytogenes*. (Adaptado de Vázquez-Boland et al., 2001)

Estratégias que reduzam a virulência dos microrganismos, em vez de levar à sua morte, têm vindo a ser utilizadas para combater organismos patogénicos de origem alimentar, entre as quais a inibição da adesão a superfícies, da invasão de tecidos, da produção de toxinas e/ou a interferência com a regulação génica de outros fatores de virulência (Rasko e Sperandio, 2010).

#### **1.1.1.1.1. Biofilmes, motilidade e quorum sensing**

*L. monocytogenes* tem a capacidade de colonizar superfícies bióticas e abióticas através da formação de biofilmes (Farber e Peterkin, 1991). Esta adesão confere à bactéria proteção contra stresses físicos e químicos que possam estar presentes (Harvey, Keenan e Gilmour,

2007). De facto, os biofilmes formados por *L. monocytogenes* em superfícies de contacto com alimentos são uma fonte importante de persistência do microrganismo e consequente contaminação de produtos (Mazaheri *et al.*, 2021). As bactérias que formam o biofilme tornam-se mais resistentes a pressões do ambiente como ácidos gordos, metais pesados, antibióticos, entre outros (Kannan, Balakrishnan e Govindasamy, 2020).

Os biofilmes são complexos multicelulares constituídos por microrganismos que se ligam entre si e a uma superfície, rodeados por uma matriz extracelular de material polissacarídeo, contendo também proteínas e ADN extracelular (Kadam *et al.*, 2013). Segundo Jefferson (2004), os pilares da formação de biofilmes pelos microrganismos são: (i) a defesa contra condições de *stress*, prejudiciais à sua proliferação; (ii) a colonização, em que o biofilme funciona como um mecanismo para permanecer num nicho favorável; (iii) a criação de uma comunidade, no sentido de “poupança de recursos” e cooperação que favoreça essa comunidade. A formação de biofilme por *L. monocytogenes* é descrita como variável entre serótipos, entre linhagens e origens, e pode ser influenciada por alguns fatores intrínsecos e extrínsecos, como a quantidade de nutrientes disponíveis e a temperatura (Kadam *et al.*, 2013).

Para além da formação de biofilme, também a motilidade por flagelo foi já relacionada com a virulência de *L. monocytogenes* (Marini *et al.*, 2018). A motilidade dá às bactérias a capacidade de deteção e busca de nutrientes, assim como o alcance e a manutenção dos nichos mais favoráveis para colonização. A forma de motilidade mais conhecida é a associada ao uso de flagelo, um organelo especializado para rotação (Josenhans e Suerbaum, 2002). Em *L. monocytogenes*, a síntese do flagelo é dependente da temperatura, uma vez que a maioria das estirpes apenas produz flagelo e tem motilidade a temperaturas de 30 °C ou inferiores (Peel, Donachie e Shaw, 1988). A motilidade mediada por flagelo nesta espécie está envolvida na formação de biofilmes em superfícies abióticas, tanto na adesão inicial à superfície, como na consequente formação do biofilme (Lemon, Higgins e Kolter, 2007).

As bactérias apresentam mecanismos que lhes permitem aperceber-se do ambiente que as rodeia e incorporar sinais de perigo, adaptando-se para ultrapassar situações adversas (Kannan, Balakrishnan e Govindasamy, 2020). Uma das dinâmicas incorporada nestes mecanismos é a capacidade de trocar informação entre células, tendo esta comunicação célula-a-célula por *quorum sensing* um papel fundamental na formação de biofilmes (Kannan, Balakrishnan e Govindasamy, 2020), regulando a densidade populacional e a atividade metabólica dentro do biofilme, de forma a responder às necessidades nutricionais e disponibilidade de recursos (Skandamis e Nychas, 2012). Em *L. monocytogenes*, este mecanismo de *quorum sensing* foi descrito e é regulado pelo operão *agrBDCA*, estando associado à comunicação célula-a-célula, sobrevivência e competição, formação de biofilme por adesão a

superfícies, invasão de células de mamíferos, infecção em modelo de rato e mudanças na expressão gênica em geral (Kannan, Balakrishnan e Govindasamy, 2020). Os fatores de virulência como toxinas, enzimas, e proteínas de superfície celular são reguladas por este sistema *agr* (Kannan, Balakrishnan e Govindasamy, 2020).

A inibição do *quorum sensing* pode ter um papel importante no controle da expressão gênica relativa à infecção humana, mas também à deterioração alimentar (Skandamis e Nychas, 2012), uma vez que algumas atividades associadas à deterioração de alimentos (proteolítica, lipolítica, quitinolítica e pectinolítica) são reguladas por este mecanismo (Bai e Rai, 2011). Para além disso, as bactérias expressam genes específicos que regulam a densidade populacional, sendo que alguma deterioração alimentar pode ser influenciada por fenótipos regulados pelo *quorum sensing* (Bai e Rai, 2011).

### **1.1.1.2. Resistência a antibióticos e biocidas**

A linha terapêutica mais frequentemente recomendada para tratamento de listeriose em humanos é a administração de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, geralmente penicilina ou ampicilina, sozinhos ou combinados com um aminoglicosídeo como a gentamicina (Olaimat et al., 2018). No entanto, o uso extensivo e incorreto de antibióticos em humanos e animais nas últimas décadas levou à progressão e propagação de resistência a antibióticos em microrganismos patogênicos de origem alimentar, incluindo *L. monocytogenes* (Olaimat et al., 2018; Wai et al., 2015). Ainda que a bactéria seja suscetível a uma larga gama de antibióticos, já foram isoladas de alimentos, do ambiente e de casos esporádicos de listeriose humana várias estirpes resistentes a um ou mais antibióticos (Matle et al., 2019). Num recente surto de listeriose na África do Sul, 74% dos isolados de *L. monocytogenes* provenientes de produtos cárneos demonstrou resistência a gentamicina, 42% a penicilina e 14,4% a ampicilina (Matle et al., 2019). Assim, é de grande importância desenvolver alternativas aos antibióticos, de forma a tentar travar este desenvolvimento crescente de resistência, que pode ter grande impacto na saúde pública.

A forma mais provável de transmissão de estirpes resistentes a antibióticos de animais para humanos é através da cadeia alimentar, pelo seu consumo. Ao longo da cadeia de produção de alimentos, *L. monocytogenes* pode ser exposta a níveis baixos de antibiótico e outros antimicrobianos, levando a uma adaptação por pré-exposição, que poderá induzir uma diminuição da suscetibilidade a estes mesmos compostos ou a outros por resistência cruzada (Olaimat et al., 2018). Este aumento de resistência é preocupante e a presença destas estirpes resistentes em ambiente alimentar torna-se um grave problema, principalmente quando

associada a infecções em populações de risco, por dificultar o tratamento da doença em caso de infecção por ingestão de alimentos contaminados.

### **1.1.1.3. Persistência em alimentos e ambiente de processamento alimentar**

A presença de *L. monocytogenes* nos alimentos é regulada por autoridades legais em vários países, incluindo na UE. De acordo com o Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 e suas alterações, é exigida a ausência da bactéria nos produtos alimentares em 25 gramas, ou não pode exceder as 100 unidades formadoras de colónias por grama de alimento ao longo da sua vida útil, dependendo das propriedades do mesmo. *L. monocytogenes* está distribuída em ambientes de processamento alimentar, e pode entrar neles, por exemplo, a partir de alimentos crus ou do movimento de pessoas ou equipamentos. Esta é capaz de persistir devido a uma limpeza e higienização ineficazes, fraco design ou condição de equipamentos e ambientes ou um controlo insuficiente do movimento de pessoas e equipamentos (Buchanan *et al.*, 2017). *L. monocytogenes* pode persistir em pavimentos, equipamentos ou saneamento em instalações de processamento alimentar durante meses ou até anos (Rodríguez-López *et al.*, 2018). A presença desta bactéria pode levar à contaminação dos produtos alimentares e ter efeitos negativos na saúde humana (Duze, Marimani e Patel, 2021). As características mais associadas à persistência de *L. monocytogenes* em ambiente alimentar são a sua capacidade de formar biofilmes e a resistência ou tolerância a desinfetantes (Forauer, Wu e Etter, 2021). A limpeza e desinfecção podem ser ineficazes na remoção e eliminação de microrganismos quando se encontram sob a forma de biofilmes, uma vez que, como referido anteriormente, estes são mais resistentes a stresses como temperaturas altas, pH baixo, dessecação, radiação UV e salinidade, tornando-se uma fonte contínua de contaminação (Mazaheri *et al.*, 2021). A formação de biofilme também confere à bactéria uma maior tolerância aos próprios desinfetantes, uma vez que estes não conseguem penetrar totalmente a matriz de microrganismos (Mazaheri *et al.*, 2021). Existem vários desinfetantes utilizados em instalações de processamento alimentar para controlar a presença de microrganismos patogénicos, sendo os mais comuns soluções à base de cloro e compostos quaternários de amónio, como o cloreto de benzalcónio (Duze, Marimani e Patel, 2021). Uma desinfecção incorreta, através de lavagem insuficiente com água após aplicação do desinfetante ou de dosagem incorreta do mesmo, pode levar a uma pressão seletiva por exposição prolongada da bactéria a concentrações subletais do biocida (Rodríguez-López *et al.*, 2018). Esta exposição gera uma pressão seletiva para adaptação ou aquisição de genes de resistência

de estirpes mais tolerantes, dificultando a erradicação da bactéria (Duze, Marimani e Patel, 2021).

## **1.2. Conservação dos alimentos**

Para evitar a contaminação de alimentos por microrganismos patogênicos, o crescimento no alimento de microrganismos patogênicos ou de degradação, e aumentar o tempo de vida útil do produto, são necessárias estratégias de preservação alimentar. Estratégias como a refrigeração, congelação, secagem, cura, conservas, fermentação ou acidificação, pasteurização, esterilização e adição de conservantes são já utilizadas há muito tempo na indústria alimentar (Gould, 1995). Algumas tecnologias mais recentes e inovadoras foram entretanto introduzidas, tais como a utilização de embalagens de atmosfera modificada, películas ativas, tratamentos não termais, irradiação, entre outras (Negi, 2012). Entre todas as estratégias continua a encontrar-se a aplicação de conservantes alimentares, sendo que, uma variedade cada vez maior de aditivos químicos é usada para preservar os alimentos. Hoje em dia, sabe-se que o uso de químicos sintéticos é limitado devido a aspetos indesejáveis dos mesmos, que incluem carcinogenicidade, toxicidade aguda, teratogenicidade, para além de períodos de degradação lentos que podem levar a problemas ambientais, como a poluição (Faleiro, 2011). Os consumidores preocupam-se com estes efeitos adversos associados ao uso de antimicrobianos sintéticos e têm vindo a preferir alimentos conservados com agentes antimicrobianos naturais e seguros, e com menores níveis de processamento. Assim, o desenvolvimento destes tem vindo a tornar-se cada vez mais importante (Moghimi *et al.*, 2016).

### **1.2.1. Óleos essenciais como agentes antimicrobianos**

Ao longo dos tempos, tem vindo a ser estudada a utilização de plantas aromáticas e os seus extratos para conservação alimentar, devido aos seus óleos essenciais e outros metabolitos secundários (Calo *et al.*, 2015). Estes óleos essenciais são produzidos pelas plantas como uma proteção contra bactérias, vírus, fungos, insetos e parasitas, reduzindo a atração destes por essas plantas (Bakkali *et al.*, 2008). Os óleos essenciais são misturas naturais complexas que podem ter até 300 compostos em diferentes concentrações (Kawacka *et al.*, 2021). Normalmente, possuem dois ou três componentes principais com concentrações altas (20-70%) e outros componentes em quantidades inferiores ou vestigiais (Bakkali *et al.*, 2008). Os componentes dos óleos essenciais são, geralmente, terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), compostos aromáticos (fenol, aldeído, álcool, derivados metoxi, entre outros) e terpenóides (isoprenóides) (Bakkali *et al.*, 2008). Os terpenos ocorrem naturalmente

nas plantas e são os componentes principais da maioria dos óleos essenciais, sendo a sua estrutura básica constituída por uma unidade de isopreno com cinco carbonos (Bakkali *et al.*, 2008). Existem vários tipos de terpenos, sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os principais, ainda que existam hemiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos; os terpenóides são um tipo de terpeno, que contém oxigénio (Bhavaniramy *et al.*, 2019). Os compostos aromáticos ocorrem nas plantas com menos frequência do que os terpenos, no entanto, a atividade antimicrobiana depende do conteúdo em compostos fenólicos, pertencentes a este grupo (Mihai e Popa, 2013). Estes óleos naturais podem ser extraídos de várias partes da planta, tal como as folhas, cascas, pedúnculos, raízes, flores e frutas; por técnicas como destilação (incluindo destilação por vapor), prensagem a frio, ou extração (maceração) (Calo *et al.*, 2015). Os óleos essenciais são líquidos, voláteis, límpidos e são solúveis em lípidos e em solventes orgânicos com densidades inferiores à da água (Nazzaro *et al.*, 2013). Na Europa, o principal uso destes óleos tem sido na alimentação, como condimento, na perfumaria em fragâncias e *aftershaves* e na indústria farmacêutica pelas suas propriedades funcionais (Burt, 2004). Para além disso, os óleos essenciais e seus componentes têm demonstrado propriedades antibacterianas, antiparasitas, inseticidas, antivirais, antifúngicas e antioxidantes (Hyldgaard, Mygind e Meyer, 2012). Estas atividades variam com a planta, a composição química, métodos de extração, entre outros (Tongnuanchan e Benjakul, 2014).

Já foram propostos vários mecanismos aos quais se poderá dever a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. No entanto, essa atividade não se pode atribuir à ação de apenas um composto, sendo que diferentes óleos e diferentes componentes podem exercer modos de ação distintos, em diferentes alvos celulares (Calo *et al.*, 2015). Alguns autores sugerem que a atividade antimicrobiana se deve à sua capacidade de penetrar as membranas das bactérias e inibir as propriedades funcionais da célula (Bajpai, Baek e Kang, 2012; Fisher e Phillips, 2009). Os seus compostos fenólicos parecem ter um papel importante na atividade antimicrobiana, uma vez que rompem a membrana da célula bacteriana, alterando a sua funcionalidade e causando a libertação do conteúdo celular (Bajpai, Baek e Kang, 2012; Fisher e Phillips, 2009; Guinoiseau *et al.*, 2010). Esses compostos podem interferir com o transporte de eletrões, a absorção de nutrientes, proteínas, síntese de ácidos nucleicos e atividade enzimática (Mihai e Popa, 2013). A hidrofobicidade é outra característica importante dos óleos essenciais, que lhes permite interagir com os lípidos da membrana celular bacteriana e mitocondrial, tornando a célula mais permeável (Burt, 2004), e potencialmente levando à sua morte (Calo *et al.*, 2015; Yousefi, Khorshidian e Hosseini, 2020).

As bactérias de Gram-positivo são geralmente mais sensíveis aos óleos essenciais do que as de Gram-negativo (Burt, 2004; Hyldgaard, Mygind e Meyer, 2012; Kim *et al.*, 2011;

Okoh, Sadimenko e Afolayan, 2010). Isto deve-se ao facto de as bactérias de Gram-negativo terem uma membrana externa que contém lipopolissacarídeos hidrofílicos (LPS), que constituem uma barreira à passagem de macromoléculas e compostos hidrofóbicos, tornando-as mais resistentes à ação disruptiva destes compostos (Hyltdgaard, Mygind e Meyer, 2012). Para além disso, as bactérias de Gram-negativo demonstram maior resistência a compostos antimicrobianos devido a uma sobre-expressão de determinadas bombas de efluxo (Garvey et al., 2011).

### **1.2.1.1. Uso alimentar**

Devido à atenção crescente dada aos aditivos naturais, os óleos essenciais de várias plantas têm vindo a ser estudados com o objetivo da sua aplicação em alimentos, especialmente conjugados com outras técnicas de preservação alimentar (Tongnuanchan e Benjakul, 2014). A FDA já classificou alguns óleos essenciais como “geralmente reconhecidos como seguros”, encontrando-se mesmo na lista de aditivos alimentares permitidos para utilização nos Estados Unidos da América (FDA, 2019). Na UE, vários componentes de óleos essenciais foram já autorizados para uso alimentar (como o eugenol, carcravol, citral, entre outros), sendo considerados como seguros para a saúde do consumidor (Hyltdgaard, Mygind e Meyer, 2012). No entanto, o uso de óleos essenciais como conservantes alimentares requer conhecimento detalhado sobre as suas propriedades, como a atividade antimicrobiana, o espectro de organismos alvo, o modo de ação e o efeito dos componentes de matrizes alimentares nas suas propriedades bioativas (Hyltdgaard, Mygind e Meyer, 2012). Uma vez que no alimento podem existir nutrientes suficientes para as bactérias se multiplicarem a um alto ritmo e ainda conseguirem reparar possíveis danos celulares, estas podem tornar-se mais resistentes a diferentes stresses que possam estar presentes (Gill et al., 2002). Para além disso, alguns componentes presentes nos alimentos podem reduzir a atividade dos óleos essenciais, como lípidos, carboidratos, proteínas, aditivos, entre outros (Perricone et al., 2015). A fração lipídica dos alimentos pode absorver o óleo essencial, que é um composto lipofílico, baixando a sua concentração na fase aquosa e diminuindo a sua ação antimicrobiana (Smith-Palmer, Stewart e Fyfe, 2001). Essa atividade também pode depender do pH do alimento, da temperatura ou do nível de contaminação microbiana (Hyltdgaard, Mygind e Meyer, 2012). Ademais, uma vez que os óleos essenciais são compostos voláteis, podem ser facilmente degradados por exposição ao calor, pressão, luz e oxigénio (Martín et al., 2010). Por esses motivos, concentrações mais altas de óleo podem ser necessárias no alimento para atingir a atividade antimicrobiana desejada.

Para ultrapassar este problema, várias tecnologias têm vindo a ser implementadas, como o encapsulamento dos óleos essenciais em embalagens inteligentes, como revestimentos comestíveis e biodegradáveis, que permitem uma libertação lenta do agente antimicrobiano para a superfície do alimento. Isto permite que altas concentrações se mantenham na superfície ou próximo dela por longos períodos, prolongando a atividade do óleo no produto (Sánchez-González *et al.*, 2011). O encapsulamento do óleo essencial em micro ou nanoemulsões é outra estratégia que permite diminuir os efeitos organoléticos no alimento, aumenta a estabilidade do composto ativo e protege-o das interações com os componentes do alimento, assim como da degradação ou evaporação (Donsì *et al.*, 2011). Outra opção que permite diminuir a concentração necessária do composto pode ser o uso de sinergia, combinando o efeito de vários óleos essenciais, de óleos com outros agentes antimicrobianos ou com outras tecnologias de preservação (Kawacka *et al.*, 2021).

Os compostos derivados de plantas com atividade antimicrobiana também podem ter a capacidade de atenuar fatores de virulência, tal como de reduzir biofilme já formado, ou inibir a sua formação, pelo que têm potencial para ser utilizados na limpeza em ambiente de processamento alimentar (Kawacka *et al.*, 2021).

### **1.3. *Melissa officinalis***

*Melissa officinalis* L. (*M. officinalis*), também conhecida como cidreira, é uma planta medicinal que pertence à família Lamiaceae (Shakeri, Sahebkar e Javadi, 2016a). Esta família contém cerca de 236 géneros, com aproximadamente 6900-7200 espécies (Okoh, Sadimenko e Afolayan, 2010). O género *Melissa* inclui cinco espécies de plantas perenes, nativas da Ásia Central, Europa e Irão (Miraj, Rafieian-Kopaei e Kiani, 2017). Em inglês, o nome comum da planta, *lemon balm* (bálsamo de limão), deve-se ao seu forte aroma e sabor semelhantes aos do limão (Moradkhani *et al.*, 2010).

Considera-se que as áreas de origem de *M. officinalis* sejam a região oriental mediterrânica, o Sul da Europa, a Ásia Ocidental, Cáucaso e o Norte do Irão, no entanto, hoje em dia, a planta está dispersa mundialmente (Shakeri, Sahebkar e Javadi, 2016a). Normalmente, a planta cresce em áreas arenosas, todavia, já foi encontrada em altitudes desde o nível do mar até montanhas, ou em terreno baldio húmido (Miraj, Rafieian-Kopaei e Kiani, 2017).

*M. officinalis* é uma espécie de polinização cruzada (Moradkhani *et al.*, 2010), sendo uma planta com normalmente 30 a 125 centímetros de altura e tem flores brancas ou cor-de-rosa e folhas ovais com pecíolo com 6 centímetros de comprimento e 3 de largura. As suas sementes são pequenas (1 a 1,5 milímetros) e castanho-escuras ou pretas (Shakeri, Sahebkar

e Javadi, 2016a). O seu sistema radicular piloso com um grande número de raízes laterais permite à planta adaptar-se a diferentes condições ambientais. No início do inverno, as partes superiores da planta morrem e novos rebentos emergem no início da primavera (Moradkhani *et al.*, 2010; Shakeri, Sahebkar e Javadi, 2016a).

### **1.3.1. Usos tradicionais**

A cidreira é utilizada na medicina, na cosmética e como ingrediente alimentar (Salamon *et al.*, 2019). É comum a sua infusão ser consumida após as refeições para reduzir gases e indigestão. Na Europa, costuma ser usada como tratamento para constipações, febre e tosse, e como sedativo leve para tratar dores de cabeça, enxaquecas, tensão nervosa ou insónias (Stefanović e Comic, 2012). A planta também já foi referida como benéfica em diferentes aplicações, como melhoria da memória, associada a efeitos favoráveis em problemas gastrointestinais, doenças da tiroide, náuseas, tonturas, anemia, doença de Graves, Alzheimer, síncope, asma, gripe, bronquite, amenorreia, problemas cardíacos, epilepsia, nervosismo, indisposição, depressão, psicose, histeria, feridas, entre outros (Papoti *et al.*, 2019).

As folhas de *M. officinalis* têm vindo a ser utilizadas na culinária para adicionar sabor a vários pratos nos últimos 2000 anos (Shakeri, Sahebkar e Javadi, 2016a). Podem ser utilizadas como especiaria em saladas de verão ou sopas de vegetais, quando frescas, ou nas mesmas refeições no inverno, quando secas (Salamon *et al.*, 2019). O seu sabor combina bem com outras especiarias em pratos vegetais e o pó das suas folhas pode ser utilizado também para temperar carne ou peixe (Salamon *et al.*, 2019).

### **1.3.2. Composição química**

*M. officinalis* contém um grande número de compostos bioativos, sendo os compostos voláteis, triterpenos, ácidos fenólicos e flavonóides os principais (Mencherini *et al.*, 2007). Os ácidos fenólicos foram divididos em duas classes: derivados de ácido benzóico, como o ácido gálico, e derivados de ácido cinâmico, como ácido cafeico (D'Archivio *et al.*, 2007).

A planta tem 0,02 a 0,3% de óleo essencial, com inúmeros compostos, dos quais mais de 60% são monoterpenos, como o citronelal, neral e geranial. Mais de 35% são sesquiterpenos, como o  $\beta$ -cariofileno e óxido de  $\beta$ -cariofileno, e álcoois monoterpenos, como o nerol, geraniol e citronelol (Mabrouki, Duarte e Akretche, 2018). O óleo pode ser extraído da flor, folha ou ramos por extração química ou destilação a vapor (Moradkhani *et al.*, 2010). O conteúdo de óleo essencial parece ser superior no terço superior da planta (Mrlianová *et al.*, 2002). A composição do seu óleo varia com as condições climáticas, sazonais e geográficas,

o período de colheita e os procedimentos da técnica de destilação usada (Shakeri, Sahebkar e Javadi, 2016b).

O potencial do óleo essencial de *M. officinalis* tem vindo a ser demonstrado, sendo que já foi relatado o seu efeito antimicrobiano numa gama de bactérias, tanto de Gram-positivo como Gram-negativo (Babapour S., Angaji e Angaji, 2009; Czerwińska e Szparaga, 2015), assim como uma ação anti-biofilme (Budzyńska *et al.*, 2011). Extratos desta planta também já mostraram capacidade de inibir a comunicação por *quorum sensing* (Cosa *et al.*, 2019).

## 2. Objetivos do estudo

A contaminação de alimentos por organismos patogênicos é, cada vez mais, uma preocupação a nível de segurança alimentar. Assim, é pertinente a procura por novos métodos de conservação alimentar, mais seguros e naturais, sendo que a utilização de extratos de plantas, ricas em compostos bioativos, poderá ser uma boa alternativa. Tendo em conta o risco associado à ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* e o potencial da utilização de óleos essenciais como agentes antimicrobianos, este trabalho teve como objetivo global avaliar a possível utilização do óleo essencial de *M. officinalis* em conservação alimentar.

Assim, os objetivos específicos deste estudo foram:

- i. Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *M. officinalis* e o seu efeito em *L. monocytogenes*;
- ii. Estudar o efeito do óleo essencial na virulência do patógeno e se a exposição de *L. monocytogenes* ao óleo essencial induz resistência ou tolerância a condições adversas;
- iii. Avaliar a aplicação e atividade antimicrobiana do óleo essencial em modelos alimentares, com vista à sua utilização na conservação alimentar.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Óleo essencial de *Melissa officinalis*

Neste trabalho, avaliou-se a atividade antimicrobiana do óleo essencial da planta *Melissa officinalis* obtido na *Pharmaplant*, cuja composição está descrita na Tabela I, tendo sido determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

**Tabela I.** Composição do óleo essencial de *Melissa officinalis*, determinada por GC-MS.

Área (%)	Compostos
0,52	(E)-3,3-dimetil-1,5-heptadieno
0,77	$\beta$ -Linalol
0,83	(E)-metil geranato
0,99	Fotocitral A
1,03	$\beta$ -citronelol
1,55	Não identificado
1,64	Citronelal
1,98	Geranil acetato
2,01	Óxido de cariofileno
2,03	cis-1,2-dihidroperilaldeído
6,50	$\beta$ -cariofileno
28,36	Z-citral (neral)
42,70	Citral (geranial)

#### 3.2. Microrganismos e meios de cultura utilizados

A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi avaliada para três estirpes da bactéria *Listeria monocytogenes*. As estirpes utilizadas foram *L. monocytogenes* LMG 13305, LMG 16779 e LMG 16780, com os serotipos 4b, 1/2a e 1/2b, respetivamente, provenientes da coleção BCCM/LMG (Bélgica).

O meio de cultura sólido *Tryptic Soy Agar* (TSA) utilizado foi preparado dissolvendo meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) (VWR Chemicals) com agar (HiMedia) a 15 g/L. Antes de cada ensaio, as estirpes foram repicadas para meio sólido em placas de Petri e incubadas em estufa a 37 °C durante aproximadamente 24 horas. O meio de cultura líquido utilizado para *L. monocytogenes* foi *Tryptic Soy Broth* (TSB).

### **3.3. Avaliação da suscetibilidade de *Listeria monocytogenes* ao óleo essencial de *Melissa officinalis***

#### **3.3.1. Método da difusão em disco**

Neste ensaio, avaliou-se a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. officinalis*, utilizando o método de difusão em disco descrito por Zhang *et al.* (2017). Algumas colónias de cada estirpe de *L. monocytogenes* foram recolhidas da cultura em meio sólido e transferidas para um tubo com solução salina NaCl a 0,85% (m/v), acertando-se o inóculo para uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland, medida num densitómetro, de forma a obter uma densidade de aproximadamente  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colónias (UFC)/mL.

A suspensão celular correspondente a cada estirpe foi inoculada em placas de meio TSA, com o auxílio de uma zaragatoa estéril que foi mergulhada na suspensão e utilizada para a espalhar a suspensão celular uniformemente na superfície do agar.

De seguida, aplicou-se 10 µL do óleo essencial a discos estéreis de celulose com 6 mm de diâmetro e colocou-se um disco na superfície do meio inoculado. Para avaliação da suscetibilidade da bactéria aos compostos voláteis do óleo essencial, colocou-se um disco com o óleo no centro da tampa da placa de Petri. Como controlo positivo do ensaio usou-se o antibiótico ampicilina, para tal, usou-se um disco com 10 µg do antibiótico.

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Após incubação, mediram-se os halos de inibição em milímetros, utilizando um paquímetro e considerando como halo de inibição o diâmetro em que não houve crescimento visível a olho nu. Para cada estirpe de *L. monocytogenes*, realizaram-se, pelo menos, três ensaios independentes.

#### **3.3.2. Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI)**

A determinação da concentração mínima inibitória do óleo essencial foi realizada pelo método de microdiluição em meio líquido, tal como descrito por Coimbra *et al.* (2020). Para isso, preparou-se uma solução de óleo essencial e dimetilsulfóxido (DMSO) em meio TSB e fizeram-se diluições sucessivas (1:2), em microplaca de 96 poços, de forma a obter uma gama de concentrações de 4 a 0,015 µL/mL de óleo essencial, com uma concentração máxima de 2% (v/v) de DMSO. Da mesma forma, preparou-se uma solução de ampicilina (NzyTech) e diluiu-se, de forma a testar concentrações no intervalo de 32 a 0,25 µg/mL.

O inóculo correspondente a cada estirpe foi ajustado para uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland em NaCl a 0,85% (m/v), de forma a obter uma densidade celular de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. O inóculo foi diluído em meio TSB, e adicionado a cada poço, de forma a obter uma concentração de cerca de  $5 \times 10^5$  UFC/mL, num volume final de 100 µL.

Também foi realizado um controlo de crescimento, adicionando 50 µL do inóculo de cada estirpe a 50 µL de meio TSB, e um controlo de esterilidade do meio de cultura, com apenas 100 µL de meio TSB, ambos em triplicado. Fez-se ainda um controlo de turbidez do óleo, com a solução de óleo e DMSO diluídas sucessivamente, sem adição do inóculo.

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante aproximadamente 24 horas e, após incubação, analisaram-se os resultados, considerando como CMI a concentração mais baixa para a qual se verificou ausência de crescimento a olho nu.

Os ensaios realizaram-se em duplicado para cada estirpe e em três ensaios independentes.

### **3.4. Determinação de curvas de morte**

Neste ensaio, seguiu-se o protocolo de Ferreira e Domingues (2016), de forma a determinar o efeito do óleo essencial de *M. officinalis* sobre *L. monocytogenes*.

Primeiramente, fez-se uma cultura *overnight*, retirando uma colónia isolada de TSA com 24 horas de incubação e suspendendo-a em 10 mL de meio TSB num *erlenmeyer* de 50 mL. A cultura foi incubada durante 16 horas a 37 °C, com uma agitação de 250 rotações por minuto (rpm). Após incubação, mediu-se a densidade ótica da cultura a 600 nm ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) e acertou-se a suspensão celular em meio TSB para obter uma  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,1, correspondente a  $2 \times 10^8$  UFC/mL. Soluções de óleo essencial e DMSO diluídos em TSB foram preparadas, para obter concentrações finais de óleo essencial correspondentes a 4xCMI, 2xCMI, 1xCMI, 0,5xCMI e 0,25xCMI e uma concentração máxima de DMSO de 0,25% (v/v). Adicionou-se o inóculo a cada solução, de forma a obter uma concentração final de células de  $2 \times 10^7$  UFC/mL num volume final de 1 mL. Como controlo de crescimento, utilizou-se 1 mL de meio TSB e como controlo de toxicidade do solvente utilizou-se 1 mL de meio TSB com DMSO dissolvido à concentração máxima utilizada (0,25%).

Os tubos foram incubados a 37 °C, sendo recolhidas amostras aos 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos de incubação. A contagem de células cultiváveis foi efetuada pelo método “*drop-plate*”, assim, fizeram-se diluições sucessivas decimais de cada amostra em NaCl a 0,85% (m/v) em microplaca de 96 poços, e aplicou-se 10 µL de cada diluição em triplicado em placas de TSA e incubaram-se as mesmas a 37 °C durante 24 horas. Após incubação, contaram-se as colónias nas placas, considerando as diluições com 20 a 60 colónias, e calculou-se o número correspondente de UFC/mL.

Para cada estirpe, realizaram-se, pelo menos, três ensaios independentes.

### 3.5. Avaliação do efeito do óleo essencial no *quorum sensing*

De forma a perceber o papel do óleo essencial de *Melissa officinalis* na inibição do *quorum sensing*, utilizou-se a bactéria biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, proveniente da coleção ATTC (EUA), para avaliar a produção de violaceína, de acordo com o método descrito por Asensio *et al.* (2020). Para isso, fez-se uma cultura *overnight* de *C. violaceum*, utilizando o mesmo método do ponto 3.4., com meio *Luria-Bertani* (LB) (Liofilchem) e a 30 °C.

Em microplaca estéril de 48 poços, adicionaram-se soluções de óleo essencial de forma a obter concentrações finais de 0,125 a 0,015 µL/mL (DMSO a uma concentração máxima de 0,125%), e de DMSO num intervalo de 0,125% a 0,015% (v/v), como controlo de solvente. Como controlo positivo de inibição de *quorum sensing*, usou-se resveratrol num intervalo de concentrações finais de 10 a 2,5 µg/mL, num volume final de 1 mL por poço.

A  $DO_{600\text{ nm}}$  foi medida e acertou-se o inóculo em meio LB para uma  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,02. A cultura foi adicionada a todos os poços do ensaio, de forma a obter uma concentração final no poço de cerca de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Para controlo de crescimento, adicionou-se 500 µL do inóculo a 500 µL de meio LB, em triplicado.

A placa foi incubada a 30 °C durante 48 horas e, após incubação, avaliou-se a produção de violaceína. Para isso, centrifugou-se a 5000 g (RCF) 750 µL de cada poço durante 3 minutos. De seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 750 µL de DMSO, vortexando até dissolver a violaceína. Procedeu-se a uma centrifugação a 8000 g durante 5 minutos e retirou-se 200 µL de cada sobrenadante em triplicado para microplaca de 96 poços, descartando o restante. Por fim, mediu-se a absorvância em espectrofotómetro a um comprimento de onda de 585 nm.

Para avaliar se a inibição do *quorum sensing* ocorreu sem a morte do microrganismo, suspenderam-se células depositadas em água destilada e retirou-se 200 µL em triplicado para a placa de 96 poços, medindo a  $DO_{600\text{ nm}}$  em espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad).

Foram realizados, pelo menos, três ensaios independentes.

A partir das medições de absorvância, calculou-se a percentagem de inibição do *quorum sensing* para cada tratamento, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição da violaceína (\%)} = 100 - \left( \frac{DO_{585\text{ nm}} \text{ da amostra}}{DO_{585\text{ nm}} \text{ do controlo de crescimento}} \right) * 100$$

### 3.6. Determinação do efeito do óleo essencial na formação de biofilme

Para avaliar se o óleo essencial em estudo tem efeito na formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, seguiu-se o protocolo realizado por Stepanović *et al.* (2004), com modificações, começando por uma cultura *overnight*, como indicado no ponto 3.4.

Em placa de 96 poços de poliestireno, fizeram-se diluições sucessivas (1:2) a partir de soluções de óleo essencial e DMSO ou de DMSO, em meio TSB, de forma a obter concentrações de óleo finais de 4xCMi a 0,125xCMi e uma concentração máxima de DMSO de 0,25% (v/v).

A partir da cultura *overnight*, acertou-se o inóculo para uma  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,2 em meio TSB. Por fim, adicionou-se o inóculo a todos os poços, de forma obter uma concentração final de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL, num volume final de 200  $\mu$ L por poço. Para controlo de crescimento, adicionou-se 100  $\mu$ L de inóculo a 100 $\mu$ L de meio TSB e para controlo negativo colocou-se apenas 200  $\mu$ L de meio TSB nos poços.

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Após incubação, removeu-se o conteúdo dos poços e fizeram-se duas lavagens com 200  $\mu$ L de água destilada. Os biofilmes foram fixados com 200  $\mu$ L de metanol durante 20 minutos. Após a fixação, coraram-se os biofilmes com 200  $\mu$ L de violeta de cristal a 0,1% (m/v) durante 10 minutos. De seguida, fizeram-se três lavagens com 400  $\mu$ L de água destilada, de forma a remover o violeta de cristal em excesso. O corante foi dissolvido com 200  $\mu$ L de ácido acético a 33% (v/v) durante 1 hora e transferiu-se 150  $\mu$ L de cada poço para nova microplaca de 96 poços. Por fim, leu-se a absorvância a 570 nm e calculou-se a percentagem de inibição de biofilmes para cada amostra.

Através das absorvâncias obtidas, calculou-se a percentagem de inibição de biofilme relativamente ao controlo de solvente, através da fórmula:

$$\text{Inibição de biofilme (\%)} = \left( \frac{DO_{585\text{ nm}} \text{ do controlo de solvente} - DO_{570\text{ nm}} \text{ da amostra}}{DO_{585\text{ nm}} \text{ do controlo de solvente}} \right) * 100$$

Para cada estirpe realizaram-se, pelo menos, três ensaios independentes.

### 3.7. Ensaio de motilidade

De forma a avaliar o efeito do óleo essencial de *M. officinalis* na motilidade de *L. monocytogenes* utilizou-se o procedimento descrito por Marini *et al.* (2018), com algumas alterações. Para este ensaio e todos os posteriores, selecionou-se apenas uma estirpe de *L.*

*monocytogenes*, utilizando a LMG 13305, uma vez que o seu serótipo (4b) está entre os mais associados a casos de listeriose nas últimas décadas (Lomonaco, Nucera e Filipello, 2015). A partir de uma cultura *overnight* de *L. monocytogenes* LMG 13305, prepararam-se tubos adicionando 2700 µL de meio TSB a 300 µL da suspensão bacteriana com uma  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,1, obtendo uma concentração de aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/mL, e procedeu-se a uma incubação durante 18 horas a 37 °C. Após a incubação, pipetou-se 5 µL da suspensão bacteriana em placas de TSA com 0,3% (m/v) de agar e com óleo essencial em concentrações de 0,5x CMI, 0,25x CMI e 0,125x CMI, incluindo uma placa de controlo sem óleo essencial. As placas foram incubadas a 30 °C e mediram-se os halos de motilidade, em milímetros, ao fim de 24, 48 e 72 horas.

Pelo menos três ensaios independentes foram realizados.

### **3.8. Avaliação da tolerância a condições adversas**

Para avaliar a influência do óleo de *M. officinalis* na tolerância de *L. monocytogenes* LMG 13305 ao calor, pH ácido, *stress* osmótico e dessecação, foi feita uma pré-incubação de acordo com o protocolo de Oliveira *et al.* (2017), com modificações. A partir de uma cultura *overnight*, prepararam-se tubos com 2700 µL de meio TSB com óleo essencial na concentração subinibitória de 0,25x MIC e DMSO a 0,016% (v/v), e adicionaram-se 300 µL de suspensão bacteriana correspondente a uma  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,1, de forma a obter uma concentração final de aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/mL. Como controlo, inocularam-se tubos com apenas meio TSB e tubos com apenas DMSO diluído em TSB à concentração utilizada no ensaio. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 18 horas. Após incubação, fez-se uma centrifugação a 8000 g, 4 °C, durante 5 minutos. As células recolhidas foram lavadas com meio TSB e suspendidas de forma a obter uma concentração de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL.

#### **3.8.1. Calor**

Para avaliar a tolerância de *L. monocytogenes* a temperaturas altas, adicionou-se 30 µL da suspensão obtida no ponto anterior a 2970 µL de meio TSB em tubos de ensaio. Os tubos foram incubados a 55 °C em banho termostaticado (Nahita 601/12) durante 1 hora. Aos 0 e 60 minutos retiraram-se amostras para contagem de células, de acordo com o procedimento descrito no ponto 3.4, para o método “*drop-plate*”.

### 3.8.2. Ácido

No ensaio de tolerância a níveis baixos de pH, 30 µL da suspensão bacteriana foram adicionados a 2970 µL de meio TSB acidificado com ácido clorídrico para um pH de 2,4 e procedeu-se a incubação por 8 horas à temperatura ambiente. Às 0, 2, 4, 6 e 8 horas foram retiradas amostras e procedeu-se à contagem de células como descrito no ponto 3.4, realizando as diluições decimais em tampão fosfato salino a 10 mmol/L e pH 7,2.

### 3.8.3. Stress osmótico

Neste ensaio, adicionaram-se 30 µL de suspensão a 2970 µL de meio TSB com 12% (m/v) de cloreto de sódio e incubaram-se os tubos durante 24 horas em estufa a 37 °C. Às 0 e 24 horas retiraram-se amostras e fez-se a contagem de células de acordo com o procedimento do ponto 3.4.

### 3.8.4. Dessecação

Para o ensaio de tolerância à dessecação, foi seguido o protocolo de Chen *et al.* (2020) com algumas modificações. As suspensões obtidas no ponto 3.8 foram diluídas em meio TSB e pipetou-se 100 µL para placas de 6 poços, de forma a obter uma concentração final de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/mL por poço. As placas foram incubadas durante 4 horas a 40 °C. No final do tempo de incubação, foram secas em câmara de fluxo e transferidas para uma estufa a 25 °C, onde permaneceram durante 7 dias. Após a incubação de 4 horas e o período de 7 dias, o poço foi lavado repetidamente com 1 mL de meio TSB, de forma a suspender as células aderidas ao fundo. O conteúdo de cada poço foi recolhido e foram feitas diluições e contagens de acordo com o descrito no ponto 3.4.

Os resultados relativos aos ensaios de tolerância a condições adversas foram apresentados sob a forma do  $\text{Log}_{10} (N_t/N_0)$ , através da seguinte fórmula:

$$\text{Log}_{10} (N_t/N_0) = \text{Log}_{10} \left( \frac{\text{n}^\circ \text{ de UFC finais}}{\text{n}^\circ \text{ de UFC iniciais}} \right)$$

Os ensaios foram realizados em duplicado, em pelo menos três dias independentes.

## 3.9. Resistência cruzada

De forma a verificar se a incubação com o óleo essencial de *M. officinalis* induz em *L. monocytogenes* resistência a antibióticos, determinou-se a CMI, seguindo o mesmo procedimento realizado no ponto 3.3.2, para os antibióticos tetraciclina (Sigma-Aldrich),

vancomicina (Sigma-Aldrich), cefotaxima (Acros organics), eritromicina (Sigma-Aldrich), gentamicina (Sigma-Aldrich) e ampicilina, utilizando suspensões bacterianas provenientes da exposição a concentração subinibitória de óleo essencial e respectivos controlos referidos no ponto 3.8, lavadas e suspensas de forma a obter-se uma concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL em cada poço.

### **3.10. Capacidade de invasão por *L. monocytogenes* em células epiteliais Caco-2**

Neste ensaio foi avaliada a capacidade de *L. monocytogenes* de invadir células epiteliais intestinais humanas Caco-2, utilizando o método descrito por Su et al. (2019). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Sigma-Aldrich) com 10% (v/v) de soro FBS (*fetal bovine serum*), 1% de aminoácidos não essenciais, 100 µg/mL de streptomomicina e 100 µg/mL de penicilina em frascos de cultura de células de 75 cm<sup>2</sup>. O meio foi mudado de dois em dois dias, e as células mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Antes de cada ensaio, as células foram semeadas em placas de 24 poços a partir de cultura celular com aproximadamente 80% de confluência. Uma concentração de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/mL foi suspensa em meio DMEM e semeou-se placa de cultura de 24 poços com 0,5 mL por poço, obtendo uma concentração de aproximadamente  $2,6 \times 10^5$  células/poço após 48 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após exposição de *L. monocytogenes* LMG 13305 a óleo essencial de acordo com o ponto 3.8, as células foram recolhidas por centrifugação a 8000 g, 5 minutos, sendo lavadas e suspensas em meio DMEM, de forma a obter uma concentração de aproximadamente  $2,6 \times 10^7$  UFC/poço. Os poços da placa de cultura com Caco-2 foram lavados duas vezes com tampão fosfato salino a 10 mmol/L com um pH de 7,2 e inoculados com 500 µL da suspensão bacteriana preparada anteriormente, com uma multiplicidade de infecção de *L. monocytogenes* para Caco-2 de 100:1. A placa foi incubada durante uma hora à temperatura de 37 °C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, foram feitas três lavagens com tampão fosfato salino e adicionado a cada poço 500 µL de uma solução de gentamicina a 150 µg/mL em DMEM e procedeu-se a nova incubação de 90 minutos, sob as mesmas condições. Após três lavagens dos poços com tampão fosfato salino, para lise das células Caco-2, adicionou-se Triton-X100 (Fisher Chemical) a 1% (v/v) em tampão fosfato salino e, passados 5 minutos, recolheu-se o conteúdo de cada poço e quantificaram-se as células bacterianas que invadiram as células epiteliais Caco-2, através do método “*drop-plate*”, como referido no ponto 3.4.

O ensaio foi realizado em triplicado, em três dias independentes.

### **3.1.1. Aplicação do óleo essencial de *Melissa officinalis* em modelos alimentares**

#### **3.1.1.1. Alface, leite e suco de frango**

As diferentes matrizes alimentares utilizadas para estudar o efeito do óleo essencial foram preparadas de acordo com Ferreira & Domingues (2016). No caso da alface, foram homogeneizadas 50 g de alface com 100 mL de água destilada em Stomacher® 80 microBiomaster (Seward), durante 2 minutos. De seguida, fez-se uma filtração com filtro *Whatman* e ajustou-se o pH da solução resultante para 7,2, juntando duas partes da mesma com uma parte de tampão de fosfato de potássio a 0,3 mol/L. A mistura foi esterilizada a 121 °C durante 15 minutos para ser utilizada nos ensaios. Relativamente aos ensaios na matriz alimentar do leite, utilizaram-se dois tipos de leite UHT (magro e gordo). Para o frango, o suco proveniente da descongelação de vários frangos foi misturado e armazenado a -80 °C. O suco foi posteriormente descongelado durante a noite, a 4 °C, e procedeu-se a uma centrifugação a 3900 g durante 20 minutos. O sobrenadante foi então filtrado com filtro de 0,45 µm e o suco de frango resultante foi armazenado a -20 °C até à sua utilização.

Para o ensaio, prepararam-se soluções de cada modelo alimentar com óleo essencial a concentrações de 2xCMI, 1xCMI e 0,5xCMI e uma concentração de DMSO máxima de 0,125% (v/v). Em todos os tubos foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana de *L. monocytogenes* LMG 13305 proveniente de cultura *overnight*, de forma a obter uma concentração final de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/mL, num volume final de 1 mL. Como controlos, utilizou-se apenas o modelo alimentar com inóculo, e o modelo alimentar com inóculo e DMSO na concentração mais alta utilizada em ensaio. Os ensaios foram incubados a 4 °C durante 14 dias. Aos 0, 2, 4, 7, 10 e 14 dias recolheram-se amostras e realizaram-se contagens de acordo com o procedimento descrito no ponto 3.4.

#### **3.1.1.2. Sumo de melancia**

A preparação do sumo de melancia utilizado neste ensaio foi feita de acordo com o método de Jo *et al.* (2015). As sementes e a casca da melancia foram removidas e o interior foi triturado e homogeneizado durante 10 minutos numa liquidificadora (Hoffen). O sumo obtido foi filtrado com compressas de gaze estéreis e utilizado no próprio dia. Para verificar o efeito do óleo essencial de *M. officinalis* sobre *L. monocytogenes* LMG 13305 no sumo de melancia, preparou-se sumo com 2 µL/mL de óleo essencial e adicionou-se o inóculo, após cultura *overnight*, de forma a obter uma concentração de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/mL, num volume final de 50 mL em frascos de 65 mL. Como controlo de crescimento, utilizou-se sumo apenas com inóculo. Os frascos foram incubados a 4 °C e nos dias 0, 2, 4, 7, 10 e 14

retiraram-se amostras para contagem de *L. monocytogenes*. Para tal, retirou-se de cada frasco 1 mL e fizeram-se diluições sucessivas decimais com 9 mL de água peptonada tamponada. De cada diluição retiraram-se 100 µL para placas de meio seletivo *Polymyxin acriflavine lithium chloride ceftazidime aesculin mannitol* (PALCAM) (Biolife) e utilizou-se o método do espalhamento. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas para posterior contagem, considerando as placas com cerca de 15 a 150 colónias e calculando o número de UFC/mL.

Para verificar o efeito do óleo essencial na microbiota naturalmente presente no sumo, preparou-se 50 mL de sumo com óleo essencial à concentração de 2 µL/mL e utilizou-se apenas sumo de melancia como controlo. Os frascos foram incubados a 4 °C e 1 mL foi retirado nos dias 0, 2, 4, 7, 10 e 14, realizando-se diluições sucessivas decimais com 9 mL de água peptonada tamponada (Oxoid). O meio *Plate Count Agar* (PCA constituído por 2,5 g/L de extrato de levedura (Merck), 5 g/L de triptona (Conda), 12 g/L de agar e 1 g/L de glucose (Fisher Chemical), com um pH de  $7,0 \pm 0,2$ ) foi utilizado para enumeração das bactérias psicrotróficas aeróbicas e bactérias mesofílicas totais aeróbicas. O método da incorporação foi utilizado, sendo que foi colocado 1 mL de cada diluição em placas e adicionados 15 mL de meio, arrefecido a 45 °C, homogeneizando posteriormente. Após solidificação, as placas foram incubadas a 4 °C durante 7 a 10 dias, para contagem das bactérias psicrotróficas aeróbicas e a 30 °C durante 72 horas, para contagem das mesofílicas totais aeróbicas. Para contagem de bolores e leveduras, utilizou-se o meio *Yeast Extract Glucose Chloramphenicol agar* (YCGA, constituído por 20 g/L de glucose, 5 g/L de extrato de levedura, 15 g/L de agar com um pH de  $6,6 \pm 0,2$  e 0,1 g/L do antibiótico cloranfenicol (Fluka), adicionado após esterilização). Neste caso foi também utilizado o método da incorporação, como descrito acima. As placas foram incubadas, após solidificação, a 25 °C durante 3 a 5 dias.

Após incubação, contaram-se as colónias, considerando as placas com 30 a 300 colónias, e calculou-se o número correspondente de UFC/mL.

Em cada momento de recolha de amostras foram tiradas fotografias a alíquotas do sumo, com e sem óleo essencial, de forma a avaliar a progressão do seu aspeto. Foram realizados duplicados em dois dias independentes.

### **3.12. Análise estatística**

A análise estatística dos resultados foi realizada através do *software* GraphPad Prism v8.02, utilizando o teste estatístico *one-way ANOVA* e, no caso dos dados relativos à avaliação da microbiota do sumo de melancia, o teste *t-student*, com um intervalo de confiança de 95% e considerando como estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados e Discussão

A importância e percepção da segurança alimentar tem vindo a aumentar ao longo dos anos. A contaminação de alimentos por organismos patogénicos é um problema crescente e que tem um forte impacto na saúde pública, em todo o mundo. Novos agentes de conservação dos alimentos são necessários, para substituir as alternativas consideradas prejudiciais à saúde que existem atualmente e combater a resistência emergente a antibióticos e biocidas. Os compostos extraídos de plantas, nomeadamente óleos essenciais, são fortes candidatos à sua utilização em segurança alimentar, no entanto, são necessários estudos que garantam a sua eficácia e a segurança do seu uso. Assim, a presente dissertação teve como objetivo o estudo do efeito antimicrobiano do óleo essencial de *M. officinalis* sobre *L. monocytogenes*, e aplicá-lo em modelos alimentares, pelo que os resultados obtidos são apresentados e discutidos nesta secção.

### 4.1. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melissa officinalis* sobre *Listeria monocytogenes*

A suscetibilidade de três estirpes de *L. monocytogenes* ao óleo essencial de *M. officinalis* foi avaliada através do método da difusão em disco e da determinação da concentração mínima inibitória. Os resultados relativos aos halos de inibição obtidos por difusão em disco encontram-se na Tabela II. O óleo essencial, tanto diretamente como através da ação dos seus compostos voláteis, demonstrou maior atividade antimicrobiana nas três estirpes do que o antibiótico utilizado como controlo, a ampicilina, produzindo halos de inibição de 35,5 a 54,6 milímetros de diâmetro. A estirpe mais sensível ao óleo essencial foi *L. monocytogenes* LMG 16779, com diâmetros de halo de inibição superiores a 50 milímetros. O valor de CMI do óleo essencial foi de 0,5 µL/mL para as três estirpes estudadas, enquanto para a ampicilina os valores foram 0,125 µg/mL para *L. monocytogenes* LMG 16779 e 0,5 µg/mL para as estirpes *L. monocytogenes* LMG 13305 e 16780 (Tabela II). A ampicilina foi utilizada como controlo positivo no ensaio, uma vez que é um dos antibióticos escolhidos atualmente para tratar infeções por *L. monocytogenes* (Allerberger e Wagner, 2010). As três estirpes de *L. monocytogenes* testadas demonstram ser suscetíveis à ampicilina, uma vez que a espécie apresenta suscetibilidade ao antibiótico quando a CMI é inferior a 1 µg/mL (EUCAST, 2021). Gamboa-Marín *et al.* (2013) determinaram o valor de CMI da ampicilina para 259 isolados de *L. monocytogenes*, obtendo uma gama de valores entre 0,06 e 16 µg/mL, sendo que os resultados de CMI obtidos no presente estudo também se encontram nesse intervalo.

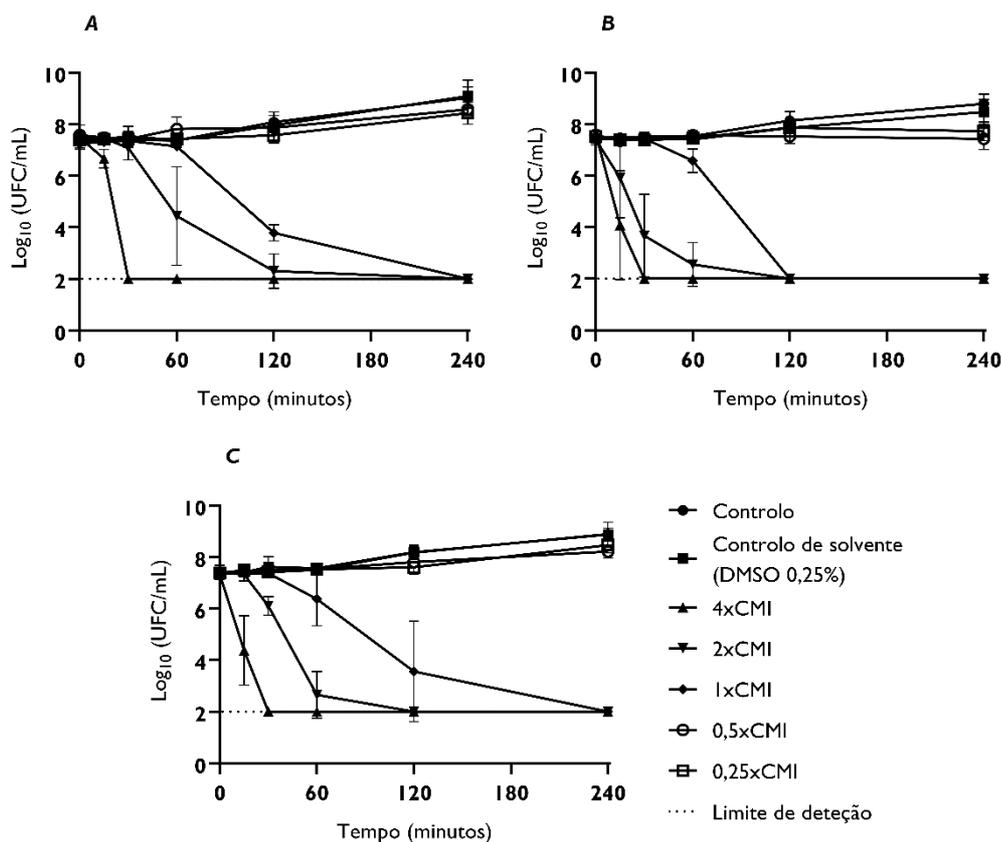
**Tabela II.** Halos de inibição e valores de concentração mínima inibitória para ampicilina e óleo essencial de *Melissa officinalis* para *Listeria monocytogenes* LMG 13305, LMG 16779 e LMG 16780.

Estirpe	Halo de inibição (mm) <sup>a</sup>			Concentração mínima inibitória <sup>b</sup>	
	Ampicilina (10 µg/disco)	Óleo essencial (10 µL/disco)	Compostos voláteis (10 µL de óleo essencial/disco)	Ampicilina (µg/mL)	Óleo essencial (µL/mL)
<b>LMG 13305</b>	34,4 ± 1,4	38,4 ± 4,2	35,5 ± 2,2	0,5	0,5
<b>LMG 16779</b>	40,0 ± 2,0	54,6 ± 1,3	51,1 ± 3,4	0,125	0,5
<b>LMG 16780</b>	32,1 ± 0,9	48,6 ± 1,7	46,1 ± 3,5	0,5	0,5

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão

<sup>b</sup> Valor modal obtido

O ensaio de curvas de morte permite determinar se o efeito de um agente antimicrobiano é dependente da sua concentração e do tempo, permitindo ainda inferir acerca da ação bacteriostática ou bactericida de um agente (Balouiri, Sadiki e Ibensouda, 2016). Assim, procedemos à avaliação do efeito do óleo essencial de *M. officinalis* em *L. monocytogenes* LMG 13305, 16779 e 16780 ao longo de 4 horas de incubação com diferentes concentrações do mesmo. O óleo essencial demonstrou em efeito bactericida para as três estirpes de *L. monocytogenes* estudadas (Figura 2), sendo que a partir dos 30 minutos, com a concentração 4xCMI, ocorreu uma diminuição da contagem de células cultiváveis abaixo do limite de detecção do método, da mesma forma que para momentos subsequentes com 2xCMI e 1xCMI. As concentrações 0,5xCMI e 0,25xCMI, concentrações subinibitórias, exibem um perfil semelhante ao do controlo, mantendo-se o ritmo de multiplicação normal do organismo. Portanto, é possível observar que o efeito inibitório do óleo essencial aumenta com a concentração e é dependente do tempo, sendo que o controlo de solvente (DMSO 0,25%) não demonstra qualquer efeito na multiplicação da população bacteriana.



**Figura 2.** Curvas de morte para *Listeria monocytogenes* (A) LMG 13305, (B) LMG 16779 e (C) LMG 16780 incubadas com concentrações de óleo essencial de *Melissa officinalis* de 4xCMI a 0,25xCMI e respectivos controles. Cada ponto representa a média do log<sub>10</sub> (UFC/mL) e o respectivo desvio padrão.

Alguns autores, como Hussain *et al.* (2011) e Czerwińska e Szparaga (2015) também já demonstraram um efeito antimicrobiano do óleo essencial de *M. officinalis* em bactérias de Gram-positivo, reportando valores de diâmetro de inibição superiores em bactérias clinicamente importantes (entre os 9,5 e 28,1 milímetros) como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, entre outras, relativamente a bactérias de Gram-negativo testadas. Já é conhecido que os óleos essenciais atuam na parede celular das bactérias, afetando a sua permeabilidade e, conseqüentemente, causando a libertação do conteúdo interno da célula ou afetando diferentes funções celulares (Cox *et al.*, 2001). Geralmente, as bactérias de Gram-positivo são mais suscetíveis à ação de óleos essenciais, devido a diferenças na parede celular, sendo que possuem apenas uma camada externa de peptidoglicano, enquanto as de Gram-negativo têm uma membrana fosfolipídica externa ao peptidoglicano, contendo lipopolissacarídeos que tornam a célula mais impermeável (Ravikumar *et al.*, 2010). Essa membrana externa tem carga e é de natureza hidrofílica, limitando assim a difusão destes compostos hidrofóbicos através dos lipopolissacarídeos (Nazzaro *et al.*, 2013; Yousefi, Khorshidian e Hosseini, 2020).

O óleo essencial em estudo contém uma grande quantidade de dois compostos terpenos oxigenados (terpenóides), o neral e o geranial (Tabela I). Já foi demonstrado que óleos essenciais com alto conteúdo de compostos terpenóides possuem um forte efeito antibacteriano (Hussain *et al.*, 2008). De facto, Shi *et al.* (2016) e Gao *et al.* (2020) reportaram um forte efeito antibacteriano do composto citral, que se encontra normalmente sob a forma de uma mistura dos dois terpenóides referidos. Segundo Shi *et al.* (2016), o citral afeta a membrana bacteriana, reduzindo a concentração de ATP intracelular e o pH da célula e levando à hiperpolarização da membrana. Assim, é provável que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. officinalis* em *L. monocytogenes* se deva aos seus compostos principais, neral e geranial, estando os resultados da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. officinalis* de acordo com estudos prévios feitos com óleo da mesma planta ou compostos isolados presentes no mesmo. O óleo essencial demonstrou, assim, ter uma boa atividade antimicrobiana em *L. monocytogenes*, um agente patogénico de origem alimentar nocivo, o que salienta o seu potencial para ser utilizado como agente antimicrobiano.

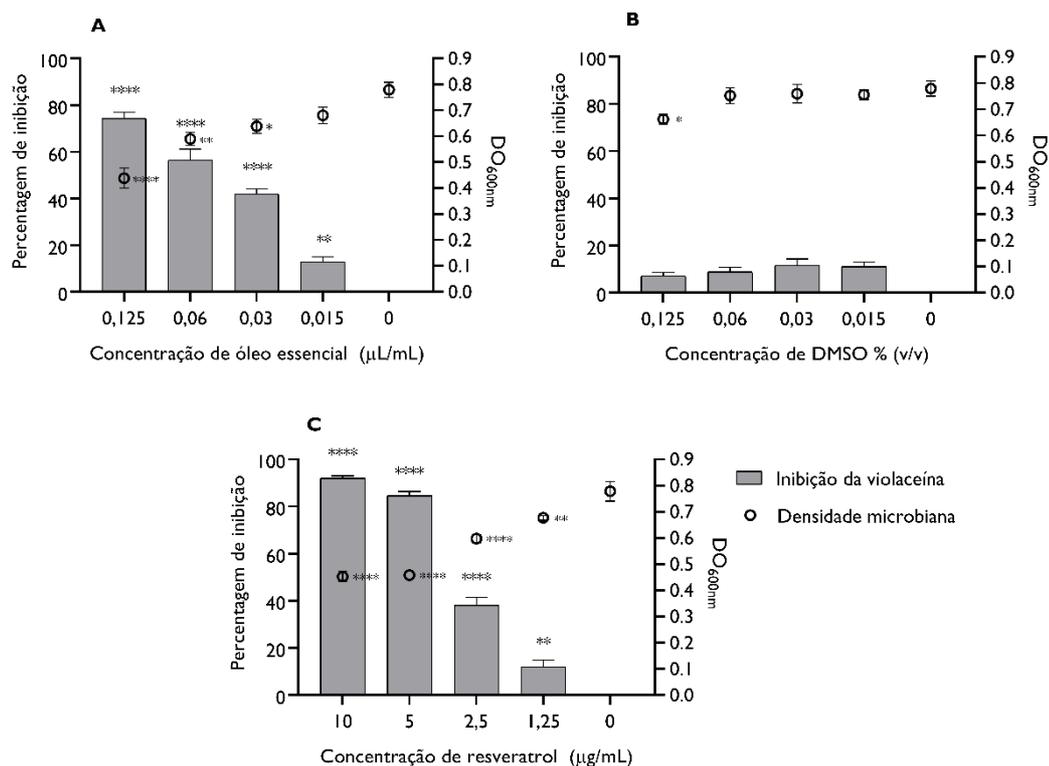
## **4.2. Efeito do óleo essencial na virulência de *Listeria monocytogenes***

### **4.2.1. Quorum sensing, biofilmes e motilidade**

Recentemente, tem vindo a ser estudada a utilização dos óleos essenciais como substâncias antipatógenicas, ou seja, ao invés de matar a bactéria ou inibir o seu crescimento, estes compostos podem agir pelo controlo ou atenuação de fatores relacionados com a virulência, como a comunicação através de *quorum sensing* e a formação de biofilmes (Luciardi *et al.*, 2016). A inibição destes fatores poderá também permitir uma resposta do sistema imune do hospedeiro, aquando da infeção, podendo este prevenir a colonização pelas bactérias ou atenuar a infeção (Rasko e Sperandio, 2010). Entre os fatores de virulência que podem ser controlados pelas substâncias antipatógenicas está o *quorum sensing*, um sistema de comunicação que as bactérias utilizam para controlar processos importantes para a sua virulência, como a secreção de fatores de virulência e a formação de biofilmes (Zhang *et al.*, 2018).

Para avaliar o efeito do óleo essencial de *M. officinalis* sobre o mecanismo de *quorum sensing*, utilizou-se a bactéria *Chromobacterium violaceum*. A inibição da produção do pigmento violaceína por esta bactéria é frequentemente usada como um indicador de inibição de *quorum sensing* (Zhang *et al.*, 2018). Assim, foram testadas concentrações subinibitórias do óleo essencial e verificou-se que todas elas levaram a uma inibição da produção de violaceína, sendo que a percentagem de inibição aumentou com a concentração de óleo essencial. Com as

concentrações de 0,03 a 0,125  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de óleo essencial, foram obtidas percentagens de inibição de 41,9 a 74,3%, havendo uma diminuição estatisticamente significativa na produção de violaceína ( $p > 0,0001$ ), sendo que a concentração de 0,016  $\mu\text{L}/\text{mL}$  levou a uma inibição da produção de violaceína de 12,8% ( $p = 0,003$ ) (Figura 3-A). Assim, houve inibição de produção de violaceína por todas as concentrações de óleo essencial, relativamente ao controlo. O solvente utilizado (DMSO) não mostrou inibição estatisticamente significativa da produção de violaceína, comparativamente com o controlo, em nenhuma das concentrações testadas (Figura 3-B). Como controlo positivo, foi utilizado o resveratrol, tendo-se verificado que as concentrações de 10 a 1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  levaram a uma inibição estatisticamente significativa da produção de violaceína, com percentagens de inibição de 92 a 12,1% ( $p < 0,01$ ) (Figura 3-C). Sheng *et al.* (2015) demonstrou resultados semelhantes, relatando uma inibição da produção de violaceína que aumenta com a concentração de resveratrol. No caso do resveratrol, parte da inibição da produção de violaceína pode ter-se devido à morte ou inibição do crescimento do microrganismo, uma vez que existem diferenças significativas na densidade microbiana em todas as concentrações de resveratrol, quando comparadas com o controlo ( $p < 0,01$ ). Relativamente ao óleo essencial, pode verificar-se alguma diminuição na densidade microbiana nas concentrações mais altas ( $p < 0,05$ ), no entanto, na concentração de 0,015  $\mu\text{L}/\text{mL}$  não existe diferença significativa relativamente ao controlo e foi possível verificar uma diminuição na produção de violaceína, atribuindo-se, assim, a mesma, à ação do óleo.

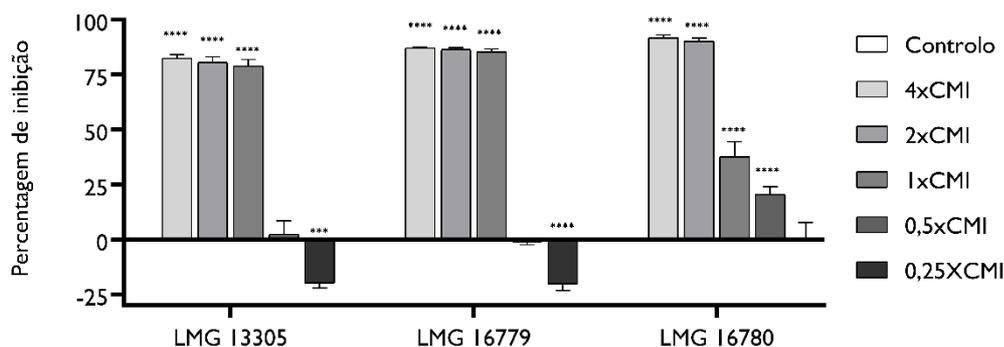


**Figura 3.** Inibição de *quorum sensing* pelo óleo essencial de *Melissa officinalis*, representado pela percentagem de inibição da violaceína por diferentes concentrações de (A) óleo essencial de *Melissa officinalis*, (B) DMSO e (C) resveratrol e avaliação da densidade microbiana ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) após 48 horas de incubação. Os resultados são apresentados como média±erro padrão das médias. Os asteriscos representam diferenças significativas relativamente ao controlo. \* ( $p<0,05$ ); \*\* ( $p<0,01$ ); \*\*\* ( $p<0,0001$ ).

O efeito de óleos essenciais e outros extratos de plantas no *quorum sensing* das bactérias tem vindo a ser estudado. Asensio *et al.* (2020), por exemplo, demonstrou percentagens de inibição de produção de violaceína de 94,3 e 66,7% com concentrações de 0,078 e 0,039 mg/mL, respetivamente, de óleo essencial de orégão. Inclusive, um estudo já testou diferentes extratos de *M. officinalis* (aquoso, metanólico, diclorometano e etil acetato) como inibidores da produção de violaceína em *C. violaceum*, obtendo valores de inibição superiores a 74% para todos os extratos testados (Cosa *et al.*, 2019). Assim, o potencial de *M. officinalis* como inibidor de *quorum sensing* pode ser visto como uma boa alternativa para ajudar a controlar a deterioração dos alimentos.

Os biofilmes bacterianos são um grande problema a nível da indústria alimentar, devido à sua resistência a agentes microbianos e desinfetantes, sendo que vários surtos alimentares já foram associados a estes (Srey, Jahid e Ha, 2013). Quando se avaliou o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *M. officinalis* na formação de biofilme por *L. monocytogenes*, o mesmo demonstrou inibição da formação de biofilme pelas três estirpes de *L. monocytogenes* testadas (Figura 4), sendo que os melhores resultados foram obtidos para a estirpe LMG

16780, com inibição estatisticamente significativa da formação de biofilme nas concentrações de 4 a 0,5x CMI ( $p < 0,05$ ) e percentagens de inibição superiores a 90% nas duas concentrações mais altas. Em *L. monocytogenes* LMG 13305 e 16779, houve inibição significativa pelas três concentrações mais altas ( $p < 0,0001$ ) de óleo, enquanto com 0,5x CMI não houve diferença significativa relativamente ao controlo e com 0,25x CMI obteve-se uma percentagem negativa de inibição, indicando que pode ter havido um ligeiro potenciamento da formação de biofilme.

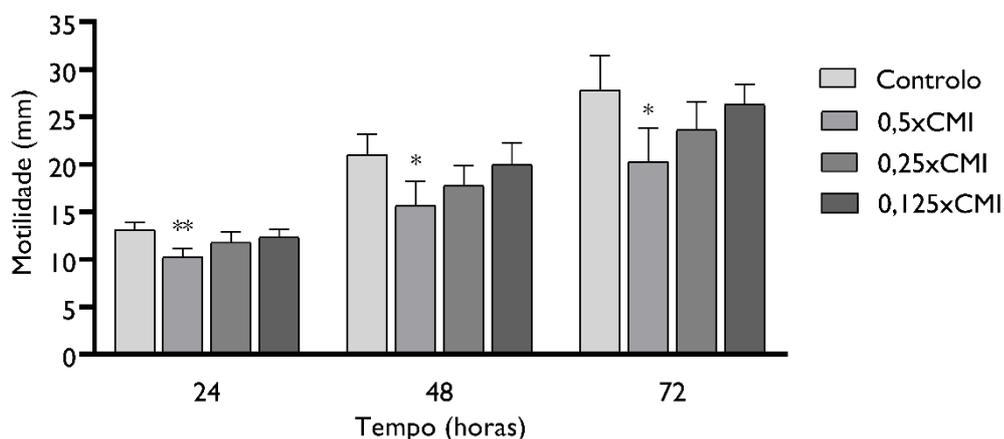


**Figura 4.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Melissa officinalis* na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* LMG 13305, LMG 16779 e LMG 16780. Os resultados são representados pela média da percentagem de inibição em relação ao controlo de solvente e respetivo erro padrão das médias. Os asteriscos representam diferenças significativas relativamente ao controlo de cada estirpe. \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

Anastasaki *et al.* (2017) também relatou a capacidade de *M. officinalis* de inibir a formação de biofilme por bactérias. O estudo demonstrou uma inibição superior a 80% pelo extrato metanólico da planta na formação de biofilme por duas bactérias de Gram-positivo, *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*. A capacidade de algumas estirpes de *L. monocytogenes* persistirem em ambiente alimentar após limpeza e desinfecção pode dever-se à exposição a níveis subinibitórios de desinfetantes, pela existência de nichos ou reservatórios ambientais onde os desinfetantes não chegam e pela formação de biofilmes, criando um ambiente protegido para a bactéria (Martínez-Suárez, Ortiz e López-Alonso, 2016). Assim, pela sua capacidade de inibir a formação de biofilme, o óleo essencial de *Melissa officinalis* pode ser visto como uma promissora alternativa natural aos desinfetantes convencionais, para diminuir a persistência de *L. monocytogenes* em ambiente de processamento alimentar. No entanto, para isso, é necessário o uso de concentrações adequadas e que não permitam uma exposição e adaptação ao composto em níveis residuais, tornando o biofilme mais resistente.

A motilidade tem um papel fundamental na colonização de superfícies pelas bactérias, na sua disseminação pelas superfícies e na formação de biofilmes (Zhang *et al.*, 2018), assim como na infeção do hospedeiro, tendo um papel importante na virulência dos patógenos (Josenhans e Suerbaum, 2002). O efeito de concentrações subinibitórias do óleo essencial em

estudo na motilidade foi testado em *L. monocytogenes* LMG 13305. A concentração 0,5xCMI levou a uma diminuição significativa do diâmetro da zona de motilidade, quando comparada com o controle, em todos os períodos de incubação avaliados ( $p < 0,05$ ). As restantes concentrações (0,25 e 0,125xCMI) não demonstraram diferenças significativas com o controle em nenhum dos momentos (Figura 5).



**Figura 5.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Melissa officinalis* na motilidade de *Listeria monocytogenes* LMG 13305, às 24, 48 e 72 horas. Os resultados representam a média do diâmetro da zona de motilidade em milímetros e respetivo desvio padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas em relação ao controle em cada momento de medição. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ).

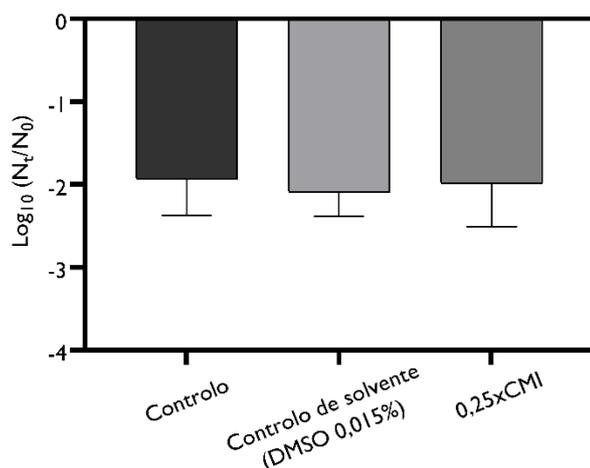
O efeito de *Melissa officinalis* na motilidade de bactérias não foi ainda estudado, no entanto, Marini *et al.* (2018) testou o óleo essencial de *Cannabis sativa* contra a motilidade de diferentes estirpes de *L. monocytogenes* e constatou uma redução significativa na motilidade de todas elas, na presença de uma concentração subinibitória do óleo essencial. Uma diminuição na motilidade de *L. monocytogenes* pelo óleo essencial de *M. officinalis* pode ser útil na prevenção de formação de biofilmes por esta bactéria, ajudando a combater a contaminação de alimentos e ambientes alimentares.

#### 4.2.2. Tolerância a condições adversas, resistência cruzada e capacidade de invasão celular

Ao utilizar óleos essenciais como antimicrobianos pode utilizar-se inadvertidamente concentrações subinibitórias dos compostos ou quando aplicados em alimentos a sua interação com componentes da matriz alimentar pode levar a uma diminuição da concentração disponível. Assim, pode haver facilmente uma exposição dos microrganismos a níveis subletais destes antimicrobianos naturais (Yuan *et al.*, 2018). Essa exposição pode, em alguns casos,

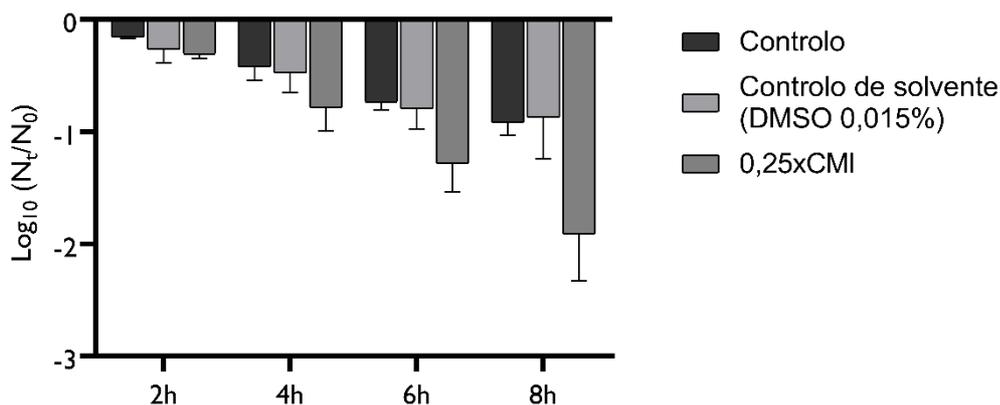
levar a um aumento da resposta ao *stress*, tornando as bactérias mais tolerantes a determinados fatores de *stress* ou levando a resistências cruzadas com outros compostos, nomeadamente antibióticos (Bikels-Goshen *et al.*, 2010). Muitos desses fatores de *stress* estão presentes em ambiente alimentar e os organismos patogénicos de origem alimentar enfrentam-nos durante a produção, armazenamento e confeção dos alimentos, sendo alguns exemplos os tratamentos físicos como o calor e choque osmótico e tratamento químico com ácido (Begley e Hill, 2015), assim como ambientes de dessecação, com baixa atividade de água (Eselin, Santos e Hébraud, 2018). A capacidade de *L. monocytogenes* de sobreviver em ambientes extremos, sob condições de *stress* é conhecida (Ferreira *et al.*, 2014; Gandhi e Chikindas, 2007). Assim, já foi demonstrado que a bactéria tolera altas concentrações de sal, como 10% (m/v); sobrevive e multiplica-se num grande intervalo de temperaturas (2-45 °C); é capaz de tolerar níveis baixos de pH e persiste em ambiente de dessecação a longo prazo, até 91 dias (Gandhi e Chikindas, 2007; McClure, Roberts e Oguru, 1989; O'Driscoll, Gahan e Hill, 1996; Vogel *et al.*, 2010). Por ser preocupante um possível aumento da tolerância de *L. monocytogenes* LMG 13305 a estes stresses, foi então testada essa tolerância, com e sem exposição prévia a uma concentração subinibitória do óleo essencial.

Para avaliar a possível influência de uma pré-exposição da bactéria ao óleo essencial na sua tolerância ao calor, a suspensão bacteriana foi incubada a uma temperatura de 55 °C durante 1 hora, atingindo-se uma redução de aproximadamente 2 log<sub>10</sub> (UFC/mL) após os 60 minutos no controlo, no controlo de solvente e na amostra incubada com o óleo essencial, não existindo diferenças significativas entre os dois últimos e o controlo (Figura 6). À semelhança do presente estudo, Luz *et al.* (2012) mostraram que *L. monocytogenes* não exibe um aumento da tolerância a altas temperaturas (45 °C) após adaptação ao óleo essencial de *Origanum vulgare* num modelo alimentar. Contrariamente, um estudo realizado por Oliveira, Domingues e Ferreira (2017) demonstrou um aumento significativo da sobrevivência de *L. monocytogenes* a altas temperaturas (55 °C durante 60 minutos) após adaptação a concentrações subinibitórias de resveratrol, um composto antimicrobiano natural.



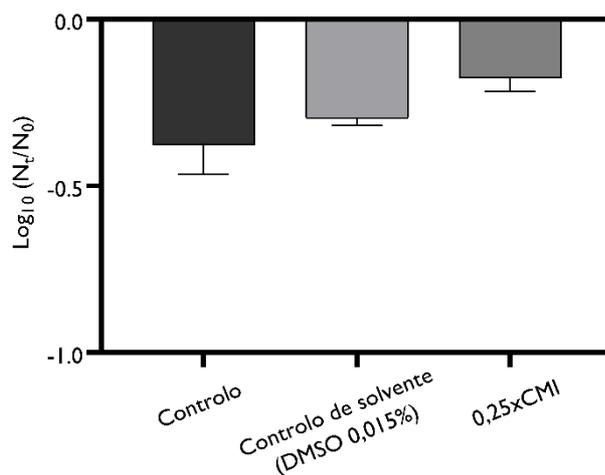
**Figura 6.** Influência de altas temperaturas (55 °C) na sobrevivência de *Listeria monocytogenes* LMG 13305 após incubação sem ou com o óleo essencial de *Melissa officinalis* e respetivos controlos. Os resultados são representados pela média do  $\text{Log}_{10} (N_t/N_0)$ , num período de 60 minutos, e respetivo erro padrão das médias.

Quando exposta a um pH de 2,4 durante 8 horas, *L. monocytogenes* demonstrou uma diminuição gradual do número de células cultiváveis refletido no  $\text{log}_{10} (N_t/N_0)$  ao longo do tempo. Não se observaram diferenças significativas entre o controlo e o controlo de solvente ou a estirpe incubada com óleo essencial, no entanto, é possível verificar, através da figura 7, uma tendência de redução gradual de *L. monocytogenes* no caso de pré-exposição ao óleo essencial, ao longo das 8 horas. Isto poderá indicar que o óleo essencial tem potencial para tornar a estirpe mais suscetível ao ácido, facilitando a sua erradicação quando exposta a este stress, o que seria uma vantagem da aplicação do óleo essencial. Oliveira, Domingues e Ferreira (2017) reportaram aquisição de tolerância ao ácido em *L. monocytogenes* adaptada a concentrações subinibitórias de resveratrol, quando sujeitas a uma incubação de 2 horas com pH de 2,4. Segundo Luz *et al.* (2012), a tolerância a ácido láctico (pH de 5,2) não aumenta após adaptação ao óleo essencial de *Origanum vulgare* em *L. monocytogenes*.



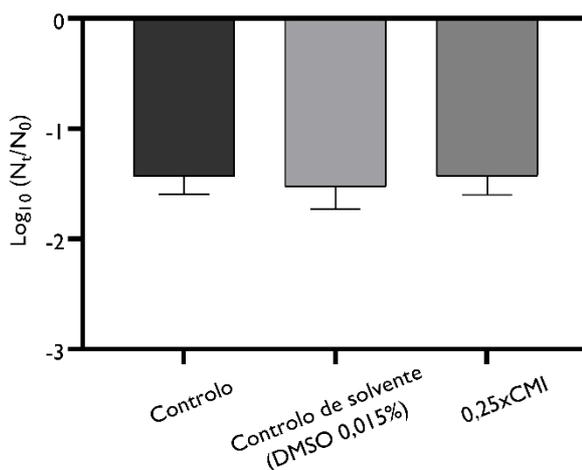
**Figura 7.** Influência de pH ácido (2,4) na sobrevivência de *Listeria monocytogenes* LMG 13305 após incubação sem ou com o óleo essencial de *Melissa officinalis* e respetivos controlos. Os resultados são representados pela média do  $\text{Log}_{10} (N_t/N_0)$ , ao longo de um período de 8 horas, e respetivo erro padrão das médias.

Relativamente ao *stress* osmótico, de modo verificar o comportamento da estirpe sob este *stress* sem ou após exposição ao óleo essencial, realizou-se uma incubação da bactéria em meio de cultura com 12% (m/v) de NaCl, durante 24 horas. Tanto no controlo, como no controlo de solvente e na estirpe adaptada ao óleo essencial, houve uma baixa redução logarítmica, sendo essa redução inferior a 0,5  $\text{log}_{10}$  (UFC/mL) (Figura 8). Não se verificaram diferenças significativas entre os ensaios de controlo e o controlo de solvente ou o ensaio realizado com células previamente expostas a concentração subinibitória de óleo essencial. É possível observar, no entanto, a tendência para uma tolerância ao *stress* ligeiramente mais alta após adaptação ao óleo essencial, relativamente ao controlo. Esta seria uma desvantagem a ter em conta na utilização do óleo como conservante alimentar. Os resultados de Luz *et al.* (2012) vão de encontro a este estudo, tendo demonstrado que a exposição a duas concentrações subletais do óleo essencial de *Origanum vulgare* também não induziu tolerância a uma concentração de NaCl de 10% (m/v) em *L. monocytogenes* num modelo alimentar de carne, no entanto neste caso ocorreu até uma diminuição na população da bactéria adaptada ao óleo essencial, relativamente ao controlo.



**Figura 8.** Influência de altas concentrações de NaCl (12 % (m/v)) na sobrevivência de *Listeria monocytogenes* LMG 13305 após incubação sem ou com o óleo essencial de *Melissa officinalis* e respectivos controlos. Os resultados são representados pela média do  $\text{Log}_{10}(N_t/N_0)$ , num período de 24 horas, e respetivo erro padrão das médias.

Uma vez que *L. monocytogenes* sobrevive facilmente a condições de dessecação em ambiente alimentar, estudou-se a tolerância a este stress com e sem incubação prévia com óleo essencial. Após 7 dias de incubação, houve uma redução de aproximadamente 1,4 a 1,5  $\text{log}_{10}$  UFC/mL de *L. monocytogenes*, sem diferença significativa para os ensaios de controlo de solvente ou com a estirpe adaptada ao óleo essencial, quando comparados com o controlo (Figura 9). Não existem ainda estudos relativamente ao efeito de exposição prévia a antimicrobianos na capacidade de *L. monocytogenes* de sobreviver à dessecação, no entanto, um estudo demonstrou uma diminuição na tolerância à dessecação em *Cronobacter sakazakii* após incubação com timoquinona, um composto natural (Chen *et al.*, 2020).



**Figura 9.** Influência de condições de dessecação na sobrevivência de *Listeria monocytogenes* LMG 13305 após incubação sem ou com o óleo essencial de *Melissa officinalis* e respectivos controlos. Os resultados são representados pela média do  $\text{Log}_{10}(N_t/N_0)$ , num período de 7 dias, e respetivo erro padrão das médias.

A capacidade de tolerância de *L. monocytogenes* a stresses como o calor e o ácido podem influenciar a sobrevivência em superfícies e produtos (Lundén, Tolvanen e Korkeala, 2007). A bactéria é capaz de sobreviver em ambientes extremos, incluindo níveis elevados de sais, até 14% (Burgess *et al.*, 2016). Já foi também demonstrado que *L. monocytogenes* é capaz de sobreviver durante longos períodos de tempo, até meses, à dessecação (Vogel *et al.*, 2010). Esta tolerância torna-se um problema a nível da indústria alimentar, uma vez que pode permitir à bactéria persistir em ambientes de processamento e nos próprios alimentos. Assim, torna-se importante estudar o comportamento da bactéria após exposição a quantidades subinibitórias do agente antimicrobiano, tendo em conta a possibilidade de existir um aumento dessa tolerância (Bikels-Goshen *et al.*, 2010). Neste estudo, foi possível verificar que a exposição a uma concentração subinibitória do óleo essencial de *M. officinalis* não tornou a estirpe mais tolerante a temperaturas elevadas, pH ácido, concentração alta de sal ou em condições de dessecação, observando-se até uma inclinação para o aumento da suscetibilidade da bactéria ao ácido, ao contrário do que já foi registado em estudos com outros compostos naturais. Estes resultados demonstram o potencial deste composto como alternativa mais segura para a preservação dos alimentos.

A possível indução de resistência a diferentes antibióticos foi estudada através da determinação da CMI, cujos valores estão representados na tabela III. Após pré-incubação com o óleo essencial de *M. officinalis*, utilizou-se o método da microdiluição em meio líquido com diferentes antibióticos, sendo que, no caso da ampicilina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina e vancomicina, os valores de CMI obtidos foram iguais após incubação da estirpe com o óleo essencial de *M. officinalis* e no controlo, assim como no controlo de solvente, indicando que não houve aquisição de resistência cruzada com estes antibióticos. No caso da cefotaxima, o valor de CMI obtido para a estirpe após incubação com óleo essencial foi superior (8 µg/mL) relativamente ao controlo e ao controlo de solvente (4 µg/mL). Embora não seja uma diferença muito notória, este ligeiro aumento de resistência à cefotaxima pode dever-se ao modo de ação deste antibiótico, uma vez que atua na parede celular das bactérias (Fu *et al.*, 2017). Um dos modos de ação dos óleos essenciais é também a degradação da parede celular (Gill e Holley, 2006). Segundo Chapman (2003), o facto de diferentes antimicrobianos terem o mesmo alvo na célula, utilizarem a mesma via para a morte celular ou partilharem o percurso até aos seus alvos celulares, pode levar à ocorrência de co-resistência entre eles. Assim, a incubação com o óleo essencial pode tornar a bactéria mais resistente ao antibiótico, por terem o mesmo alvo celular, embora, neste caso, não seja um aumento muito significativo. De acordo com estes resultados, também Apolónio *et al.* (2014), verificou que *L. monocytogenes* não adquiriu resistência aos antibióticos penicilina,

cloranfenicol, canamacina, vancomicina e eritromicina quando previamente exposta a uma concentração subinibitória de citral e eugenol. Tendo em conta que o óleo essencial de *M. officinalis* utilizado neste trabalho tem na sua composição uma alta percentagem de citral (42,70%), os resultados obtidos vão de encontro ao estudo de Apolónio (2014), uma vez que, segundo o autor, o composto não demonstra conferir resistência cruzada com os antibióticos vancomicina e eritromicina, tal como sucedeu no presente estudo.

A aquisição de resistência por *L. monocytogenes* a antibióticos utilizados regularmente é uma ameaça à saúde pública, dificultando o tratamento de infeções (Olaimat *et al.*, 2018). Ultimamente, tem aumentado a preocupação associada à utilização de agentes antimicrobianos na indústria alimentar, uma vez que já foi demonstrado que a exposição a níveis subletais dos mesmos pode induzir resistência a antibióticos (Critzler, D'Souza e Golden, 2008). Neste caso, à exceção de um ligeiro aumento na concentração mínima inibitória da cefotaxima, o óleo essencial de *M. officinalis* não induziu resistência aos antibióticos testados em *L. monocytogenes*, mostrando ser um agente antimicrobiano seguro no que diz respeito ao surgimento de resistências cruzadas entre compostos. No entanto, esta observação foi feita após uma exposição de curta duração ao óleo essencial, não permitindo inferir sobre o efeito após exposições mais prolongadas.

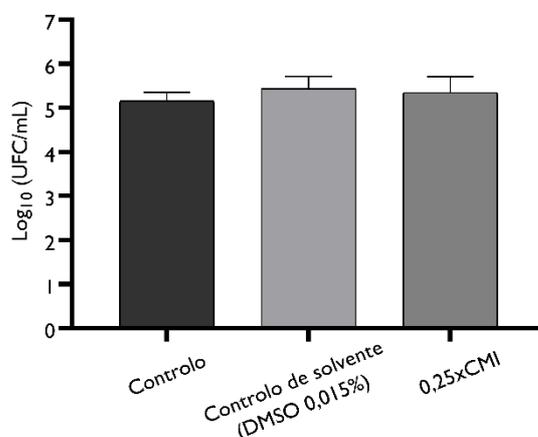
**Tabela III.** Valores de Concentração Mínima Inibitória ( $\mu\text{g/mL}$ ) de diferentes antibióticos para *Listeria monocytogenes* LMG 13305 após incubação sem ou com óleo essencial de *Melissa officinalis*.

	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>		
	Controlo	Controlo de solvente (DMSO 0,015%)	0,25xCMI do óleo essencial
<b>Ampicilina</b>	1	1	1
<b>Cefotaxima</b>	4	4	8
<b>Eritromicina</b>	0,06	0,06	0,06
<b>Gentamicina</b>	2	2	2
<b>Tetraciclina</b>	0,125	0,125	0,125
<b>Vancomicina</b>	4	4	4

<sup>a</sup> valor modal obtido

A capacidade de *L. monocytogenes* LMG 13305 de invadir células epiteliais humanas foi também testada após incubação com a concentração de 0,25xCMI de óleo essencial. Tanto no controlo de solvente como na estirpe exposta ao óleo essencial não houve diferenças significativas no logaritmo de UFC/mL relativamente ao controlo (Figura 10). Nos três casos, aproximadamente  $5 \log_{10}$  (UFC/mL) de *L. monocytogenes* foi capaz de invadir as células epiteliais Caco-2. A linha celular Caco-2 é um modelo utilizado regularmente para o estudo da virulência de *L. monocytogenes*, uma vez que parece ser a mais suscetível à infeção pela bactéria (Francis

e Thomas, 1996). A capacidade de *L. monocytogenes* de invadir células epiteliais do intestino e a subsequente translocação para outros órgãos têm um papel fundamental no desenvolvimento de uma infecção sistêmica no hospedeiro (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Até agora, não existem muitos estudos relativos ao efeito da exposição de *L. monocytogenes* a níveis subletais de óleos essenciais na sua capacidade de invasão, no entanto, Yuan e Yuk (2019) reportaram que a percentagem de invasão de *Escherichia coli* também se mantém após adaptação a concentrações subletais de timol, carvacrol e trans-cinamaldeído. Em contraste, um estudo em *L. monocytogenes* demonstrou que a exposição ao óleo essencial de *Cannabis sativa* resulta até numa diminuição da capacidade de invasão da bactéria, relativamente ao controlo, demonstrando capacidade de atenuação da sua virulência (Marini *et al.*, 2018).



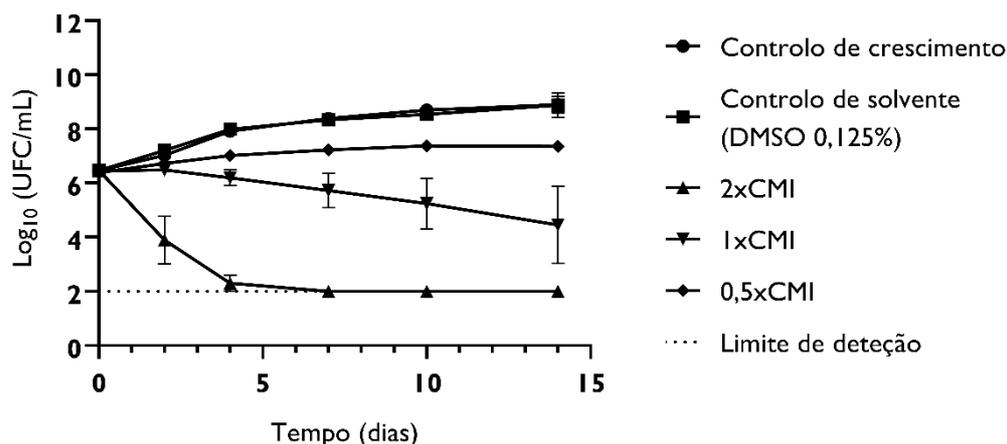
**Figura 10.** Capacidade de invasão de *Listeria monocytogenes* LMG 13305 após incubação sem e com o óleo essencial de *Melissa officinalis* em células epiteliais Caco-2, e respetivos controlos. Os resultados são representados pela média do log<sub>10</sub> (UFC/mL) e respetivo erro padrão das médias.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o óleo essencial de *M. officinalis* é capaz de provocar uma inibição em fatores importantes para a virulência de *L. monocytogenes*, como a comunicação celular, a formação de biofilmes e a sua motilidade. Para além disso, foi demonstrado que a exposição a concentrações baixas do óleo essencial não induz tolerância a condições adversas ambientais ou resistência a antibióticos, assim como não provoca um aumento da capacidade de invasão da bactéria, que poderiam dificultar a sua erradicação em ambiente alimentar e dificultar o tratamento de infeções por ela causadas. Após estes resultados positivos, a última etapa deste estudo foi a aplicação do óleo essencial, tendo em conta a manutenção da sua eficácia, em modelos alimentares.

### 4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melissa officinalis* em modelos alimentares

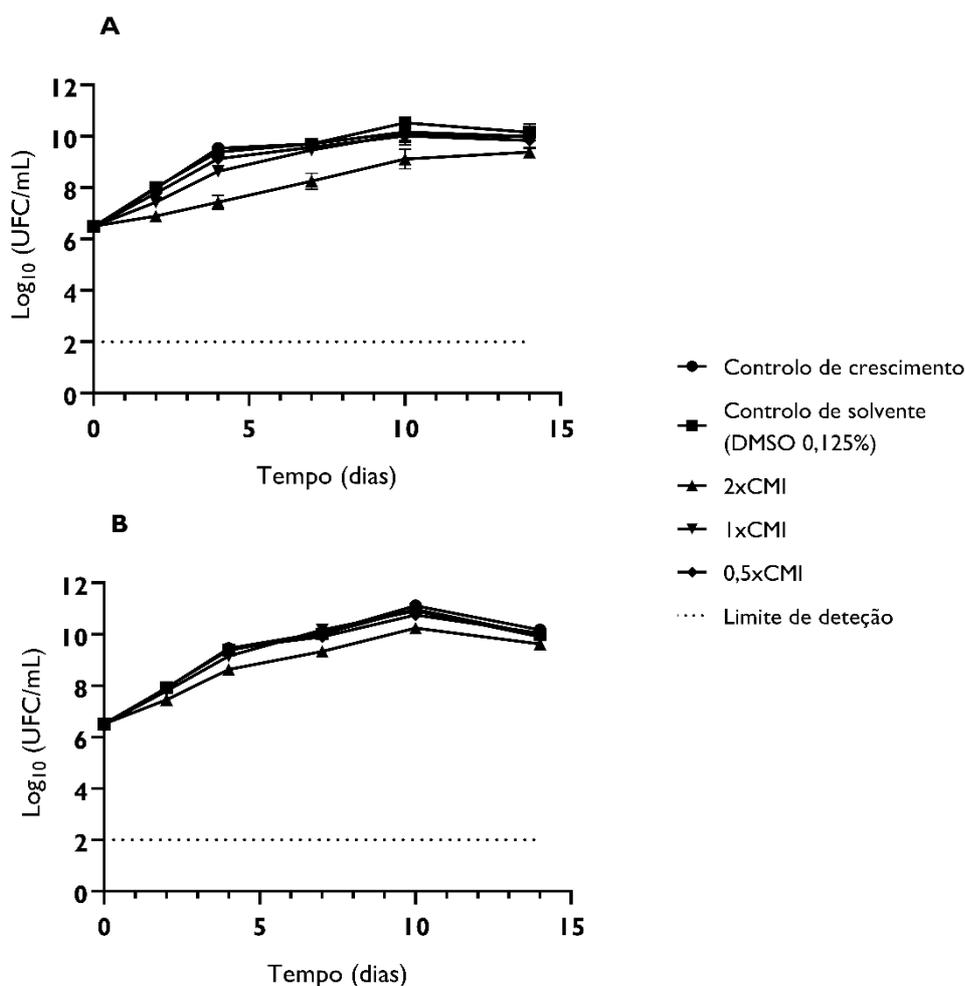
O aumento de resistência bacteriana a antibióticos e a preocupação dos consumidores face ao uso de aditivos alimentares tem vindo a suscitar interesse no uso de óleos essenciais oriundos de plantas como uma alternativa para controlar a deterioração dos alimentos e a sua contaminação por organismos patogénicos (Burt, 2004; Calo *et al.*, 2015). Tendo em conta a sua capacidade antimicrobiana e os resultados obtidos quanto ao seu efeito na virulência de *L. monocytogenes*, testou-se o uso do óleo essencial de *Melissa officinalis* como potencial conservante alimentar em diferentes simulantes ou matrizes alimentares.

As frutas e vegetais são suscetíveis a contaminação microbiana, uma vez que são geralmente consumidos sem tratamento prévio (Son, Kang e Song, 2017). *L. monocytogenes* já foi associada a surtos de infeção relacionados com vegetais minimamente processados, incluindo um surto originado por contaminação em saladas embaladas em 2016, em Ohio (CDC, 2016). O surgimento destes surtos cria a necessidade de um controlo mais eficaz de organismos patogénicos em vegetais como a alface. Tendo isso em conta, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. officinalis* num simulante de alface *iceberg* foi avaliada, sendo que a concentração de 2xCMi diminuiu drasticamente a população de *L. monocytogenes*, levando à sua inibição completa no sétimo dia de ensaio. A concentração de 1xCMi levou também a uma redução gradual da população bacteriana, atingindo uma diminuição de aproximadamente 2 log<sub>10</sub> (UFC/mL) ao 14º dia, sendo que com a concentração de 0,5xCMi houve um ligeiro aumento inicial da população, mantendo os níveis nos restantes dias. Este perfil demonstra o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *M. officinalis* quando aplicado num modelo líquido de alface *iceberg*, uma vez que, comparando com o controlo de crescimento, que atingiu cerca de 9 log<sub>10</sub> (UFC/mL) (Figura 11), a multiplicação da bactéria foi sempre inferior. O controlo de solvente demonstrou uma tendência semelhante ao controlo de crescimento. Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2009) também estudaram o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *M. officinalis* no mesmo simulante, através da determinação da concentração mínima inibitória na matriz alimentar, e obtiveram uma boa eficácia do óleo em *Listeria* spp.. Ferreira e Domingues (2016) testaram o efeito do resveratrol em *L. innocua* e *L. monocytogenes* em suco de alface *iceberg*, demonstrando um efeito inibidor do composto em ambas as espécies, no entanto, inferior ao efeito de *M. officinalis* em *L. monocytogenes* demonstrado neste trabalho.



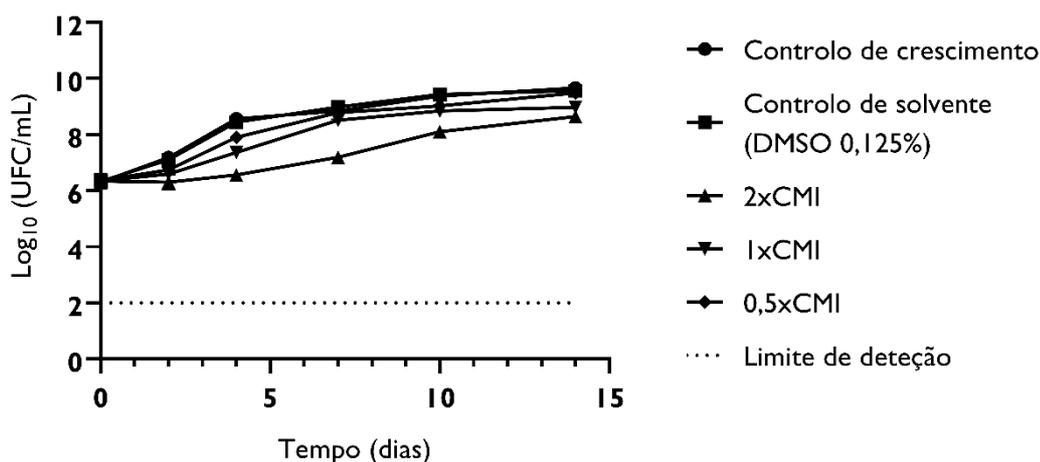
**Figura 11.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Melissa officinalis* sobre *Listeria monocytogenes* LMG 13305 em suco de alface iceberg, durante 14 dias a 4 °C, e respectivos controlos. Cada ponto representa a média do  $\log_{10}$  (UFC/mL) e o respetivo erro padrão das médias.

O leite e produtos derivados de leite fazem parte dos alimentos mais frequentemente associados à transmissão de *L. monocytogenes*, sendo o leite rico em nutrientes e suscetível a contaminação ao longo da cadeia de produção, em fases como a ordenha, transporte e armazenamento (Barancelli *et al.*, 2011). O óleo essencial de *M. officinalis* não levou à redução de *L. monocytogenes*, tanto no leite magro como no leite gordo. No caso das concentrações de 1xCMI e 0,5xCMI houve uma tendência de crescimento semelhante às do controlo de crescimento e de solvente, atingindo um  $\log_{10}$  (UFC/mL) máximo de aproximadamente 10 e 11, no leite magro e gordo, respetivamente, no décimo dia de ensaio. Relativamente à concentração de 2xCMI, houve uma multiplicação menos evidente de *L. monocytogenes* relativamente ao controlo, sendo essa diferença ligeiramente mais acentuada no leite magro, relativamente ao gordo (Figura 12). Contrariamente, já foi documentado um efeito antimicrobiano eficaz dos óleos essenciais de canela e cravinho, em combinação com baunilha, em leite meio-gordo (Cava-Roda *et al.*, 2012).



**Figura 12.** Efeito do óleo essencial de *Melissa officinalis* sobre *Listeria monocytogenes* LMG 13305 em (A) leite magro e (B) leite gordo, durante 14 dias a 4 °C, e respetivos controlos. Cada ponto representa a média de log<sub>10</sub> (UFC/mL) e o respetivo erro padrão das médias.

A presença de *Listeria monocytogenes* em carne e produtos cárneos é um problema na indústria da carne, uma vez que o microrganismo consegue multiplicar-se tanto em carne crua como cozinhada, durante o armazenamento em refrigeração, sendo que, entre os alimentos mais contaminados, as carnes são das principais fontes de infeções por esta bactéria (Gómez *et al.*, 2015). Neste estudo, em líquido de escorrimento proveniente da descongelação de frango, a concentração de óleo essencial 2xCMI demonstrou uma multiplicação da bactéria ligeiramente menos acentuada, enquanto nas outras concentrações essa diferença foi ainda menos notória, relativamente ao controlo de crescimento e controlo de solvente, que atingiram cerca de 9,5 log<sub>10</sub> (UFC/mL) ao 14º dia (Figura 13). Num estudo em frango grelhado, os óleos essenciais de orégão e noz-moscada também não tiveram efeito na redução de *L. monocytogenes* (Firouzi *et al.*, 2007).



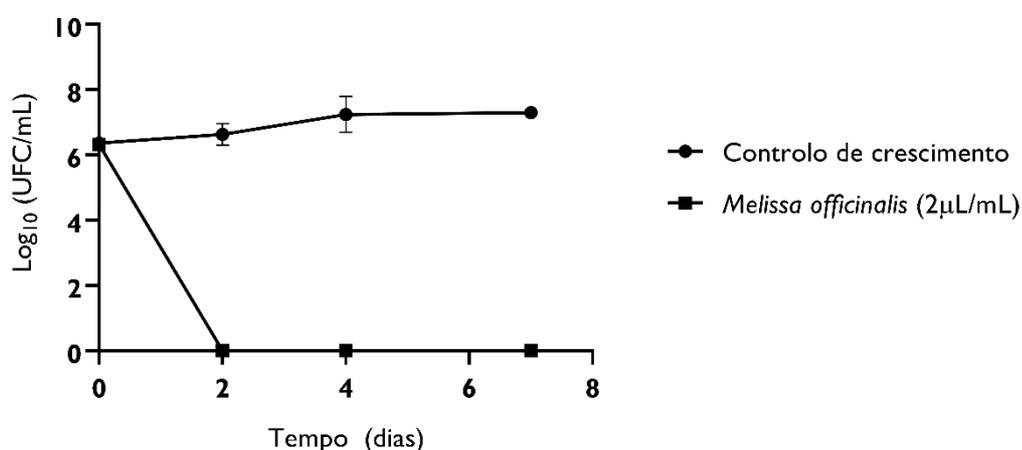
**Figura 13.** Efeito do óleo essencial de *Melissa officinalis* sobre *Listeria monocytogenes* LMG 13305 em suco de frango, durante 14 dias a 4 °C, e respetivos controlos. Cada ponto representa a média de  $\log_{10}$  (UFC/mL) e o respetivo erro padrão das médias.

O efeito antimicrobiano de *M. officinalis* em *L. monocytogenes* foi bastante notório no simulante de alface, no entanto, quase impercetível em ambos os tipos de leite e no frango. Certos componentes presentes nos alimentos, tal como gordura, carboidratos, proteína, sal, entre outros, podem interagir com os óleos essenciais e diminuir a sua atividade antimicrobiana *in vivo* (Perricone *et al.*, 2015). Assim, a atividade dos óleos essenciais pode ser favorecida em vegetais, pelo seu baixo conteúdo em gordura (Burt, 2004). Uma grande atividade de água geralmente aumenta a atividade antimicrobiana, uma vez que a sua presença facilita a difusão dos agentes antimicrobianos até ao alvo na célula bacteriana (Cava *et al.*, 2007). Por outro lado, a gordura e a proteína que se encontram no frango e no leite podem “proteger” a bactéria, criando uma camada protetora que absorve os óleos essenciais, reduzindo a sua concentração e eficácia na fase aquosa dos alimentos, onde as bactérias podem proliferar na ausência do agente antimicrobiano (Smith-Palmer, Stewart e Fyfe, 2001). Cava *et al.* (2007) demonstraram que a atividade antimicrobiana de óleos essenciais em *L. monocytogenes* diminui com o aumento de gordura no leite, o que poderá justificar a ligeira diferença dos resultados obtidos neste trabalho em leite gordo e magro, que têm diferentes teores de gordura. De forma a poder aumentar a eficácia do óleo essencial neste tipo de alimentos ricos em gordura ou em outros componentes que interagem com os compostos antimicrobianos, poderia testar-se a incorporação dos mesmos em sistemas de entrega como películas bioativas ou nanopartículas, ou até mesmo a sua sinergia com outros compostos antimicrobianos.

Os resultados obtidos no caso do modelo alimentar de *alface iceberg* foram promissores, no entanto, uma vez que apenas refletem o comportamento da estirpe numa

simulação do alimento, seguiu-se a escolha de um modelo alimentar vegetal que permitisse avaliar o efeito do óleo em condições reais. Para isso, selecionou-se um sumo de fruta preparado em ambiente doméstico e sem tratamento prévio.

O consumo de sumos como fontes naturais de vitaminas, fibras e outros componentes importantes para a saúde humana tem vindo a aumentar (de Souza, da Cruz Almeida, de Sousa Guedes, de, 2016). A deterioração enzimática microbiana é responsável por diminuir a vida útil dos sumos de fruta não pasteurizados e, para além disso, é frequente a contaminação destes por diferentes organismos patogénicos (Perricone *et al.*, 2015). Tendo em conta a eficácia da concentração de 2  $\mu\text{L/mL}$  de óleo essencial na inibição de *L. monocytogenes*, esta foi testada em sumo de melancia não pasteurizado inoculado com *L. monocytogenes* LMG 13305 e armazenado em refrigeração. Deste modo, foi possível observar uma inibição completa do patógeno ao segundo dia de ensaio, sendo que no controlo sem óleo essencial houve um aumento de aproximadamente 1  $\log_{10}$  (UFC/mL) nas contagens ao final de 7 dias de armazenamento (Figura 14). Um estudo também demonstrou a eficácia antimicrobiana do óleo essencial de erva-limão e de geraniol em *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *Listeria innocua* em sumos de maçã, pera e melão (Raybaudi-massilia, Mosqueda-melgar e Martín-belloso, 2006).



**Figura 14.** Efeito do óleo essencial de *Melissa officinalis* sobre *Listeria monocytogenes* LMG 13305 em sumo de melancia durante 7 dias, a 4 °C, e respetivo controlo. Cada ponto representa a média de  $\log_{10}$  (UFC/mL) e o respetivo erro padrão das médias.

Para verificar a capacidade do óleo essencial de *M. officinalis* no aumento do prazo de validade de sumos de fruta não pasteurizados, adicionou-se a mesma concentração de óleo (2  $\mu\text{L/mL}$ ) ao sumo de melancia sem inoculação, de forma a poder quantificar a microbiota naturalmente presente no sumo, ao longo de 7 dias. Os resultados estão representados na Tabela IV, sendo notável a diferença no nível de microrganismos entre o sumo com e sem óleo essencial. O sumo sem óleo essencial atingiu quantidades de bactérias mesofílicas aeróbicas totais e bactérias psicrotróficas aeróbicas muito elevadas, sendo a concentração

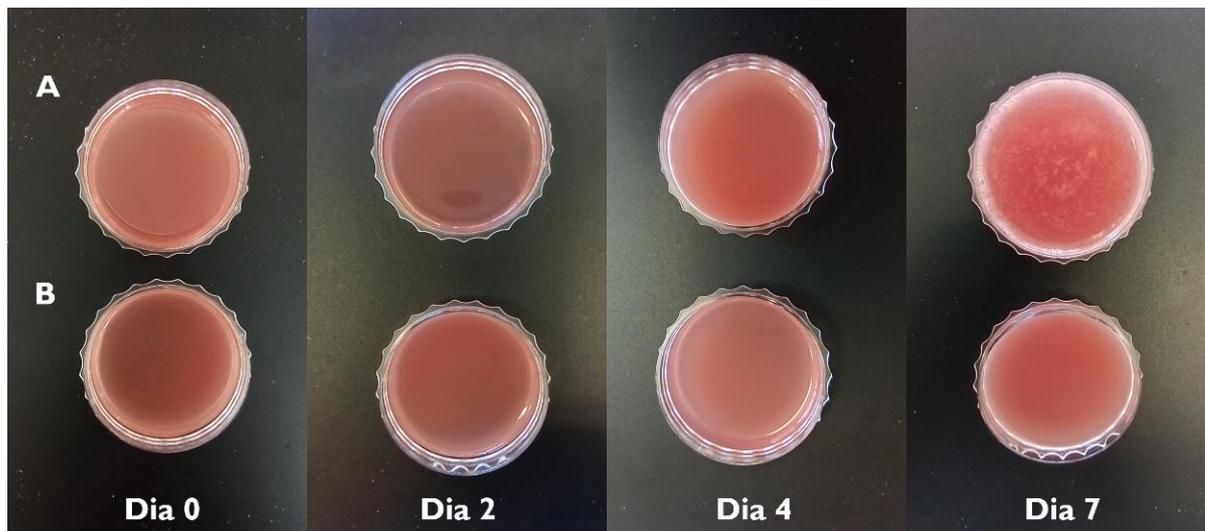
superior a  $12,5 \log_{10}$  (UFC/mL) de sumo ao sétimo dia de ensaio. Por outro lado, nas amostras tratadas com óleo essencial, houve uma diminuição dos mesmos grupos de microrganismos ao segundo dia de ensaio, mais acentuada nas bactérias psicrotróficas, sendo que no final dos 7 dias ambos os grupos de microrganismos não atingiram sequer  $6 \log_{10}$  (UFC/mL). Relativamente aos bolores e leveduras, a multiplicação dos microrganismos não foi muito acentuada no controlo nem no sumo tratado com óleo, no entanto, o óleo essencial levou a uma redução de aproximadamente  $2 \log_{10}$  no segundo dia de ensaio, havendo depois um aumento gradual até aos mesmos níveis que o controlo, ambos atingindo valores de  $5 \log_{10}$  (UFC/mL). É ainda de notar que a carga microbiana do sumo demonstrou uma grande variabilidade entre ensaios, no entanto, manteve-se a tendência de redução dos microrganismos provocada pelo óleo essencial.

**Tabela IV.** Efeito do óleo essencial de *Melissa officinalis* sobre a microbiota natural de sumo de melancia durante 7 dias a  $4^{\circ}\text{C}$ , e respetivo controlo, representado pelo valor médio de  $\log_{10}$  (UFC/mL) e respetivo erro padrão das médias.

Tempo (dias)	$\log_{10}$ UFC/mL de sumo					
	Bactérias mesofílicas aeróbicas totais		Bactérias psicrotróficas aeróbicas		Bolores e leveduras	
	Controlo	<i>M. officinalis</i> (2 $\mu\text{L/mL}$ )	Controlo	<i>M. officinalis</i> (2 $\mu\text{L/mL}$ )	Controlo	<i>M. officinalis</i> (2 $\mu\text{L/mL}$ )
0	$5,5 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,1$
2	$7,0 \pm 0,9$	$4,0 \pm 0,2$	$6,7 \pm 0,9$	$3,0 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,0$	$2,6 \pm 0,8$
4	$9,8 \pm 1,2$	$3,8 \pm 0,7$	$9,0 \pm 1,1$	$3,4 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,8$
7	$>12,5$	$5,6 \pm 0,7^*$	$>12,5$	$5,2 \pm 1,1^*$	$5,1 \pm 0,3$	$5,2 \pm 1,1$

\* ( $p < 0,05$ ); foi utilizado o teste *t-student* emparelhado, comparando a amostra com óleo essencial relativamente ao controlo em cada momento.

Relativamente ao aspeto do sumo, monitorizado através de fotografias, foi possível verificar que ao final de 7 dias o controlo estava visivelmente mais degradado do que a amostra com óleo essencial de *M. officinalis*, que manteve o seu aspeto inicial até ao final do tempo de armazenamento (Figura 15).



**Figura 15.** Aspeto do sumo de melancia não tratado (A) e com uma concentração de 2 µL/mL de óleo essencial de *Melissa officinalis* (B), aos 0, 2, 4 e 7 dias de armazenamento a 4 °C.

O forte efeito inibidor do óleo essencial sobre *L. monocytogenes* foi de encontro ao observado no modelo alimentar de alface *iceberg*, tendo-se verificado ainda uma redução da microbiota da melancia. Tal como já foi referido, uma vez que estes alimentos têm um grande conteúdo de água, é favorecido o efeito antimicrobiano do óleo essencial (Cava *et al.*, 2007). Os resultados obtidos relativamente à determinação da microbiota natural do sumo de melancia foram particularmente interessantes. Uma rápida e elevada multiplicação de microrganismos no sumo de fruta não tratado foi verificada, possivelmente devido ao facto de a melancia ser uma fruta perecível com um pH quase neutro e um grande conteúdo de água, condições ideais para a proliferação dos microrganismos (Bhattacharjee, Saxena e Dutta, 2019). Os resultados obtidos demonstraram que este óleo essencial tem atividade não só contra o microrganismo em estudo, mas também exerce um efeito na microbiota natural de alimentos (para além de manter o seu aspeto fresco), podendo diminuir os efeitos negativos causados pelos agentes de contaminação que surgem naturalmente, aumentando a vida útil do produto. Desta forma, foi demonstrado um efeito antimicrobiano promissor do óleo essencial de *Melissa officinalis*, tanto em *Listeria monocytogenes* como na microbiota naturalmente presente nos alimentos, nomeadamente em matrizes vegetais.

## 5. Conclusão

Os organismos patogênicos de origem alimentar são, atualmente, uma preocupação a nível de segurança alimentar, pelo que são necessários métodos inovadores e eficazes para o seu controlo. Os óleos essenciais são possíveis alternativas, por possuírem compostos que lhes conferem propriedades antimicrobianas. No entanto, para utilizar estes compostos naturais como conservantes em produtos alimentares, é necessário um estudo detalhado dos seus efeitos.

Um dos organismos patogênicos mais preocupantes atualmente é *L. monocytogenes*, bactéria causadora da listeriose, uma zoonose com alta taxa de mortalidade. Neste estudo, o óleo essencial de *M. officinalis* mostrou possuir boa atividade antimicrobiana em *L. monocytogenes*, demonstrando um efeito bactericida. Para além disso, dependendo da concentração utilizada, demonstrou ser capaz de inibir fatores associados à sua virulência, como o *quorum sensing*, a formação de biofilme e a motilidade, mostrando potencial para ser utilizado como um desinfetante em ambiente alimentar ou uma substância antipatogénica. A eficácia do óleo essencial foi comprovada, verificando-se que a exposição de *L. monocytogenes* a baixos níveis do mesmo não induz tolerância da bactéria a stresses presentes em ambiente de processamento alimentar e a antibióticos, nem provoca um aumento na sua capacidade de invadir células humanas e, conseqüentemente, causar infeção. No entanto, é necessário ter atenção a alguns fatores aos quais a bactéria demonstra uma potencial tendência para aquisição de tolerância, nomeadamente o stress osmótico e a ação do antibiótico cefotaxima. Por fim, o agente antimicrobiano demonstra potencial para ser utilizado em matrizes alimentares vegetais inibindo *L. monocytogenes*, e sugerindo ser capaz de aumentar a vida útil de produtos alimentares, nomeadamente sumos de fruta, ao exercer um efeito inibitório na proliferação de microrganismos naturalmente presentes no alimento.

## 6. Perspetivas Futuras

O óleo essencial de *M. officinalis*, demonstrou, neste trabalho, ter potencial para ser utilizado como conservante alimentar. No entanto, o óleo não demonstrou atividade antimicrobiana sob *L. monocytogenes* nos modelos alimentares de frango e leite. Assim, em trabalhos futuros, poderia ser estudada a aplicação deste óleo essencial usando diferentes métodos de entrega do composto, como nanopartículas ou películas bioativas, de forma a poder alargar a sua utilização a estes e outros tipos de alimentos e diminuir a quantidade de composto necessária para obter o efeito conservante desejado. Seria ainda interessante testar o sinergismo do óleo com outros antimicrobianos ou tecnologias de conservação alimentar, assim como estudar o seu possível efeito em outros microrganismos patogénicos de origem alimentar. Por fim, seria relevante fazer um estudo acerca da toxicidade do óleo essencial para o ser humano, de forma a avaliar a segurança da sua utilização na alimentação.

## Referências bibliográficas

ABDOLLAHZADEH, Esmail; OJAGH, Seyed Mahdi; HOSSEINI, Hedayat; IRAJIAN, Gholamreza; GHAEMI, Ezzat Allah - Predictive modeling of survival/death of *Listeria monocytogenes* in liquid media: Bacterial responses to cinnamon essential oil, ZnO nanoparticles, and strain. **Food Control**. ISSN 09567135. 73 (2017) 954–965.

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. - Listeriosis: A resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. ISSN 1198743X. 16:1 (2009) 16–23.

ANASTASAKI, Eirini; ZOUMPOPOULOU, Georgia; ASTRAKA, Konstantina; KAMPOLI, Eleftheria; SKOUMPI, Georgia; PAPADIMITRIOU, Konstantinos; TSAKALIDOU, Effie; POLISSIOU, Moschos - Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant and antimicrobial properties of selected herbs cultivated in Greece. **Industrial Crops and Products**. 108 (2017) 616–628.

APOLÓNIO, Joana; FALEIRO, Maria L.; MIGUEL, Maria G; NETO, Luís - No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. **FEMS Microbiology Letters**. ISSN 03781097. 354:2 (2014) 92–101.

ASENSIO, Claudia Mariana; QUIROGA, Patricia Raquel; AL-GBURI, Ammar; HUANG, Quingron; GROSSO, Nelson Rubén - Rheological Behavior, Antimicrobial and Quorum Sensing Inhibition Study of an Argentinean Oregano Essential Oil Nanoemulsion. **Frontiers in Nutrition**. ISSN 2296861X. 7 (2020) 1–12.

Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA); Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC) - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. **EFSA Journal**. 12(2) (2014) 3547.

Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA); Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC) - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**. 16:12 (2018) 5500.

BABAPOUR S., Ebrahim; ANGAJI, S. Abdolhamid; ANGAJI, S. Mahdi - Antimicrobial effects of four medicinal plants on dental plaque. **Medicinal Plant Research**. ISSN 1996-0875. 3:3 (2009) 132–137.

BAI, A. Jamuna; RAI, V. Ravishankar - Bacterial Quorum Sensing and Food Industry.

**Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.** ISSN 15414337. 10:3 (2011) 183–193.

BAJPAI, Vivek K.; BAEK, Kwang-Hyun; KANG, Sun Chul - Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International.** ISSN 09639969. 45:2 (2012) 722–734.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. - Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology.** ISSN 02786915. 46:2 (2008) 446–475.

BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi - Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis.** ISSN 20951779. 6:2 (2016) 71–79.

BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA C.A.F. - *Listeria Monocytogenes*: Ocorrência Em Produtos Lácteos E Suas Implicações Em Saúde Pública. **Arquivos do Instituto Biológico.** ISSN 0020-3653. 78:1 (2011) 155–168.

BEGLEY, Máire; HILL, Colin - Stress Adaptation in Foodborne pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology.** ISSN 1941-1413. 6:1 (2015) 191–210.

BHATTACHARJEE, Chiranjit; SAXENA, V. K.; DUTTA, Suman - Novel thermal and non-thermal processing of watermelon juice. **Trends in Food Science and Technology.** ISSN 09242244. 93 (2019) 234–243.

BHAVANIRAMYA, Sundaresan; VISHNUPRIYA, Selvaraju; AL-ABOODY, Mohammad; VIJAYAKUMAR, Rajendran; BASKARAN, Dharmar - Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology.** . ISSN 25902598. 2:2 (2019) 49–55.

BIKELS-GOSHEN, Tamar, LANDAU, Elad; SAGUY, Sam; SHAPIRA, Roni - Staphylococcal strains adapted to epigallocatechin gallate (EGCG) show reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin, increased heat tolerance, and altered cell morphology. **International Journal of Food Microbiology.** ISSN 01681605. 138:1–2 (2010) 26–31.

BUCHANAN, Robert L.; GORRIS, Leon G. M.; HAYMAN, Melinda M.; JACKSON, Timothy C. - A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control.** ISSN 09567135. 75 (2017) 1–13.

BUDZYŃSKA, Aleksandra; WIĘCKOWSKA-SZAKIEL, Marzena; SADOWSKA, Beata; KALEMBA, Danuta; RÓŻAŁSKA, Barbara - Antibiofilm Activity of Selected Plant Essential Oils and their Major Components. **Polish Journal of Microbiology.** ISSN 17331331. 60:1 (2011)

35–41.

BURGESS, Catherine M.; GIANOTTI, Andrea; GRUZDEV, Nadia; HOLAH, John; KNØCHEL, Susanne; LEHNER, Angelika; MARGAS, Edyta; ESSER, Stephan Schmitz; SALDINGER, Shlomo Sela; TRESSE, Odile - The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 221 (2016) 37–53.

BURT, Sara - Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 94:3 (2004) 223–253.

CALO, Julianny Rivera; CRANDALL, Philip G.; O'BRYAN, Corliss A.; RICKE, Steven C. - Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**. ISSN 09567135. 54 (2015) 111–119.

CARLIN, Catharine R.; LIAO, Jingqiu; WELLER, Dan; GUO, Xiaodong; ORSI, Renato; WIEDMANN, Martin - *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov. and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 1466-5026. 71:5 (2021).

CAVA-RODA, Rita María; TABOADA-RODRÍGUEZ, Amaury; VALVERDE-FRANCO, María Teresa; MARÍN-INIESTA, Fulgencio - Antimicrobial Activity of Vanillin and Mixtures with Cinnamon and Clove Essential Oils in Controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Milk. **Food and Bioprocess Technology**. ISSN 1935-5130. 5:6 (2012) 2120–2131.

CAVA, R.; NOWAK, E.; TABOADA, A.; MARIN-INIESTA, F. - Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362-028X. 70:12 (2007) 2757–2763.

Centro De Controlo De Doenças E Prevenção (CDC) (2016) - **Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility (Final Update)**. 31 de março de 2016. [Acedido a 23 de julho de 2021] Disponível em <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>

CHAMBEL, Lélia; SOL, Manuela; FERNANDES, Isabel; BARBOSA, Manuela; ZILHÃO, Isabel; BARATA, Belarmino; JORDAN, Suzanne; PERNI, Stefano; SHAMA, Gilbert; ADRIÃO, Andreia; FALEIRO, Leonor; REQUENA, Teresa; PELÁEZ, Carmen; ANDREW, Peter W.;

TENREIRO, Rogério - Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 116:1 (2007) 52–63.

CHAPMAN, John S. - Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration and Biodegradation**. ISSN 09648305. 51:4 (2003) 271–276.

CHEN, Yifei; WEN, Qiwu; CHEN, Shan; GUO, Du; XU, Yunfeng; LIANG, Sen; XIA, Xiaodong; YANG, Baowei; SHI, Chao - Effect of thymoquinone on the resistance of *Cronobacter sakazakii* to environmental stresses and antibiotics. **Food Control**. ISSN 09567135. 109 (2020).

COIMBRA, Alexandra T.; LUÍS, Ângelo F. S.; BATISTA, Maria T.; FERREIRA, Susana M.P.; DUARTE, Ana Paula C. - Phytochemical Characterization, Bioactivities Evaluation and Synergistic Effect of *Arbutus unedo* and *Crataegus monogyna* Extracts with Amphotericin B. **Current Microbiology**. ISSN 0343-8651. 77:9 (2020) 2143–2154.

Comité Européen para o Teste à Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) - Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 11.0. 1 de janeiro de 2021. [Acedido a 17 de agosto de 2021] Disponível em: <http://www.eucast.org>

COSA, Sekelwa; CHAUDHARY, Sushil Kumar; CHEN, Weiyang; COMBRINCK, Sandra; VILJOEN, Alvaro - Exploring Common Culinary Herbs and Spices as Potential Anti-Quorum Sensing Agents. **Nutrients**. 11:4 (2019) 739.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S. G. - The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**. ISSN 13645072. 88:1 (2000) 170–175.

CRITZER, Faith J.; D'SOUZA, Doris H.; GOLDEN, David A. - Transcription analysis of *stxI*, *marA*, and *eaeA* genes in *Escherichia coli* O157:H7 treated with sodium benzoate. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362028X. 71:7 (2008) 1469–1474.

CZERWIŃSKA, Ewa; SZPARAGA, Agnieszka - Antibacterial and Antifungal Activity of Plant Extracts. **Rocznik Ochrona Srodowiska**. ISSN 1506-218X. 17:1 (2015) 209–229.

D'ARCHIVIO, Massimo; FILESI, Carmela; DI BENEDETTO, Roberta; GARGIULO, Raffaella; GIOVANNINI, Claudio; MASELLA, Roberta - Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**. ISSN 00212571. 43:4 (2007) 348–361.

DALTON, Craig B.; AUSTIN, Constante C.; SOBEL, Jeremy; HAYES, Peggy S.; BIBB, William F.; GRAVES, Lewis M.; SWAMINATHAN, Bala; PROCTOR, Mary E.; GRIFFIN, Patricia M. - An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **New England Journal of Medicine**. 336:2 (1997) 100–105.

DE LAS HERAS, Aitor; CAIN, Robert J.; BIELECKA, Magdalena K.; VÁZQUEZ-BOLAND, José A. - Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. **Current Opinion in Microbiology**. ISSN 13695274. 14:2 (2011) 118–127.

DE NOORDHOUT, Charline Maertens; DEVLEESSCHAUWER, Brecht; ANGULO, Frederick J.; HAAGSMA, Juanita; KIRK, Martyn; HAVELAAR, Arie; SPEYBROECK, Niko - The global burden of listeriosis: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**. ISSN 14733099. 14:11 (2014) 1073–1082.

DE SOUZA, Evandro Leite; DA CRUZ ALMEIDA, Erika Tayse; DE SOUSA GUEDES, Jossana Pereira - The Potential of the Incorporation of Essential Oils and Their Individual Constituents to Improve Microbial Safety in Juices: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. ISSN 15414337. 15:4 (2016) 753–772.

DONSÌ, Francesco; ANNUNZIATA, Marianna; SESSA, Mariarenata; FERRARI, Giovanna - Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**. ISSN 00236438. 44:9 (2011) 1908–1914.

DROLIA, Rishi; TENGURIA, Shivendra; DURKES, Abigail C.; TURNER, Jerrold R.; BHUNIA, Arun K. - *Listeria* Adhesion Protein Induces Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction for Bacterial Translocation. **Cell Host and Microbe**. ISSN 19346069. 23:4 (2018) 470-484.e7.

DUZE, Sanelisiwe Thinasonke; MARIMANI, Musa; PATEL, Mrudula - Tolerance of *Listeria monocytogenes* to biocides used in food processing environments. **Food Microbiology**. . ISSN 07400020. 97 (2021) 103758.

ESBELIN, Julia; SANTOS, Tiago; HÉBRAUD, Michel - Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face. **Food Microbiology**. . ISSN 10959998. 69 (2018) 82–88.

FALEIRO, M. L. - The mode of antibacterial action of essential oils. Em: FALEIRO, M.L.. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances** Espanha: FORMATEX, 2011. ISBN-13: 978-84-939843-1-1. p. 1143–1156.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. - *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen.

**Microbiological Reviews.** 55:3 (1991) 476–511.

FERREIRA, Susana; DOMINGUES, Fernanda - The antimicrobial action of resveratrol against *Listeria monocytogenes* in food-based models and its antibiofilm properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** ISSN 00225142. 96:13 (2016) 4531–4535.

FERREIRA, V.; WIEDMANN, M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ, M. J. - *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **Journal of Food Protection.** . ISSN 0362-028X. 77:1 (2014) 150–170.

FIROUZI, R.; SHEKARFOROUSH, S. S.; NAZER, A. H. K.; BORUMAND, Z.; JOOYANDEH, A. R. - Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. **Journal of Food Protection.** ISSN 0362-028X. 70:11 (2007) 2626–2630.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. - The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Microbiology.** . ISSN 13645072. 106:4 (2009) 1343–1349.

Food And Drug Administration (FDA) - **Food Additive Status List.** 24 de outubro de 2019. [Acedido a 25 de maio de 2021] Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list>

FORAUER, Emily; WU, Sophie Tongyu; ETTER, Andrea J. - *Listeria monocytogenes* in the retail deli environment: A review. **Food Control.** . ISSN 09567135. 119 (2021) 107443.

FRANCIS, M. S.; THOMAS, C. J. - Effect of multiplicity of infection on *Listeria monocytogenes* pathogenicity for HeLa and Caco-2 cell lines. **Journal of Medical Microbiology.** . ISSN 0022-2615. 45:5 (1996) 323–330.

FU, Ling; HUANG, Tao; WANG, Shuo; WANG, Xiaohong; SU, Limin; LI, Chao; ZHAO, Yuanhui - Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action. **Chemosphere.** ISSN 00456535. 168 (2017) 217–222.

GAMBOA-MARÍN, Andrea; MEJÍA-WAGNER, Diana C.; MORENO-OCAMPO, Paola A.; BUITRAGO, Sonia M.; PÉREZ-PÉREZ, Karol I.; RUIZ-BOLIVAR, Zulema; POUTOU-PIÑALES, Raúl A.; CARRASCAL-CAMACHO, Ana K.; VELASCO-BRICEÑO, Alejandra; OCAMPO-GUERRERO, Martha L. - Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria* species isolated from swine processing facilities in Colombia. **Journal of Swine Health and Production.** 21:1 (2013) 10–21.

GANDHI, Megha; CHIKINDAS, Michael L. - *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 113:1 (2007) 1–15.

GAO, Shanjun; LIU, Guangzhi; LI, Jianguo; CHEN, Jing; LI, Lina; LI, Zhen; ZHANG, Xiulei; ZHANG, Shoumin; THORNE, Rick Francis; ZHANG, Shuzhen - Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (*Cymbopogon flexuosus*) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* Species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. ISSN 2235-2988. 10 (2020) 1–14.

GARVEY, Mark I.; RAHMAN, Mukhlesur; GIBBONS, Simon; PIDDOCK, Laura J. V. - Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**. ISSN 09248579. 37:2 (2011) 145–151.

GILL, A. O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R.A. - Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**. . ISSN 01681605. 73:2002) 83–92.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. - Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 108:1 (2006) 1–9.

GÓMEZ, Diego; IGUÁCEL, Laura Pilar; ROTA, M<sup>a</sup> Carmen; CARRAMIÑANA, Juan José; ARIÑO, Agustín; YANGÜELA - Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products and meat processing plants in Spain. **Foods**. ISSN 2304-8158. 4:4 (2015) 271–282.

GOULD, G. W. - **New Methods of Food Preservation**. 1<sup>a</sup>Ed. Bedford: G.W. Gould, 1995. ISBN 978-1-4613-5876-3.

GUINOISEAU, E.; LUCIANI, A.; ROSSI, P. G.; QUILICHINI, Y.; TERNENGO, S.; BRADESI, P.; BERTI, L. - Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. ISSN 0934-9723. 29:7 (2010) 873–879.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. - Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**. ISSN 07400020. 26:2 (2009) 142–150. doi: 10.1016/j.fm.2008.10.008.

HARVEY, J.; KEENAN, K. P.; GILMOUR, A. - Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**. ISSN 07400020. 24:4 (2007) 380–392.

HERNANDEZ-MILIAN, Almudena; PAYERAS-CIFRE, Antoni - What Is New in Listeriosis?

**BioMed Research International.** ISSN 2314-6133. 2014 (2014) 1-7.

HUSSAIN, Abdullah I.; ANWAR, Farooq; NIGAM, Poonam S.; SARKER, Satyajit D.; MOORE, John E.; RAO, Juluri R. - Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **LWT - Food Science and Technology.** ISSN 00236438. 44:4 (2011) 1199–1206.

HUSSAIN, Abdullah Ijaz; ANWAR, Farooq; SHERAZI, Syed Tufail Hussain; PRZYBYLSKI, Roman - Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry.** ISSN 03088146. 108:3 (2008) 986–995.

HYLDGAARD, Morten; MYGIND, Tina; MEYER, Rikke Louise - Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology.** ISSN 1664-302X. 3:12 (2012).

JEFFERSON, Kimberly K. - What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters.** ISSN 03781097. 236:2 (2004) 163–173. doi: 10.1016/j.femsle.2004.06.005.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. - *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue scientifique et technique.** 25:2 (2006) 571–580.

JO, Yeon-Ji; CHUN, Ji-Yeon; KWON, Yun-Joong; MIN, Sang-Gi; HONG, Geun-Pyo; CHOI, Mi-Jung - Physical and antimicrobial properties of *trans-cinnamaldehyde* nanoemulsions in water melon juice. **LWT - Food Science and Technology.** . ISSN 00236438. 60:1 (2015) 444–451.

JOSEPHANS, Christine; SUERBAUM, Sebastian - The role of motility as a virulence factor in bacteria. **International Journal of Medical Microbiology.** ISSN 14384221. 291 (2002) 605–614.

KADAM, Sachin R.; DEN BESTEN, Heidi M. W.; VAN DER VEEN, Stijn; ZWIETERING, Marcel H.; MOEZELAAR, Roy; ABEE, Tjakko - Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. **International Journal of Food Microbiology.** ISSN 01681605. 165:3 (2013) 259–264. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025.

KALLIPOLITIS, Birgitte; GAHAN, Cormac GM; PIVETEAU, Pascal - Factors contributing to *Listeria monocytogenes* transmission and impact on food safety. **Current Opinion in Food Science.** ISSN 22147993. 36 (2020) 9–17. doi: 10.1016/j.cofs.2020.09.009.

KANNAN, Suganya; BALAKRISHNAN, Jeyakumar; GOVINDASAMY, Ambujam - *Listeria*

*monocytogenes* - Amended understanding of its pathogenesis with a complete picture of its membrane vesicles, quorum sensing, biofilm and invasion. **Microbial Pathogenesis**. ISSN 08824010. 149 (2020) 104575.

KAWACKA, Iwona; OLEJNIK-SCHMIDT, Agnieszka; SCHMIDT, Marcin; SIP, Anna - Natural Plant-Derived Chemical Compounds as *Listeria monocytogenes* Inhibitors In Vitro and in Food Model Systems. **Pathogens**. ISSN 2076-0817. 10:1 (2021) 12.

KIM, Sung-Youn; KANG, Dong-Hyun; KIM, Jin-Ki; HA, Yong-Geun; HWANG, Ju Young; KIM, Taewan; LEE, Seon-Ho - Antimicrobial Activity of Plant Extracts Against *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on Fresh Lettuce. **Journal of Food Science**. ISSN 00221147. 76:1 (2011) 41–46.

KOCKS, C.; GOUIN, E.; TABOURET, M.; BERCHE, P.; OHAYON, H.; COSSART, P. - *L. monocytogenes*-Induced Actin Assembly Requires the actA Gene Product, a Surface Protein. **Cell**. ISSN 00928674. 68:3 (1992) 521–531. doi: 10.1016/0092-8674(92)90188-I.

LEMON, Katherine P.; HIGGINS, Darren E.; KOLTER, Roberto - Flagellar Motility is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**. ISSN 0021-9193. 189:12 (2007) 4418–4424.

LOMONACO, Sara; NUCERA, Daniele; FILIPELLO, Virginia - The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. **Infection, Genetics and Evolution**. ISSN 15671348. 35 (2015) 172–183.

LUCIARDI, María Constanza; BLÁZQUEZ, María Amparo; CARTAGENA, Elena; BARDÓN, Alicia; ARENA, Mario Eduardo - Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. **LWT - Food Science and Technology**. ISSN 00236438. 68 (2016) 373–380.

LUNDÉN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. - Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. **Letters in Applied Microbiology**. ISSN 02668254. 46:2 (2008) 276–280.

LUZ, Isabelle Da Silva; NETO, Nelson Justino Gomes; TAVARES, Adassa Gama; MAGNANI, Marciane; DE SOUZA, Evandro Leite - 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**. ISSN 09639969. 48:2 (2012) 667–672.

MABROUKI, H.; DUARTE, C. M. M.; AKRETICHE, D. E. - Estimation of Total Phenolic Contents and In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Various Solvent Extracts of

*Melissa officinalis* L. **Arabian Journal for Science and Engineering**. ISSN 2193-567X. 43:7 (2018) 3349–3357.

MARINI, Emanuela; MAGI, Gloria; FERRETTI, Gianna; BACCHETTI, Tiziana; GIULIANI, Angelica; PUGNALONI, Armanda; RIPPO, Maria Rita; FACINELLI, Bruna - Attenuation of *Listeria monocytogenes* Virulence by *Cannabis sativa* L. Essential Oil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. ISSN 2235-2988. 8:293 (2018) 1–11.

MARTÍN, Ángel; VARONA, Salima; NAVARRETE, Alexander; COCERO, María José - Encapsulation and Co-Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Applications with Essential Oils. **The Open Chemical Engineering Journal**. ISSN 18741231. 4:2 (2010) 31–41.

MARTÍNEZ-SUÁREZ, Joaquín V.; ORTIZ, Sagrario; LÓPEZ-ALONSO, Victoria - Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664-302X. 7 (2016).

MATEREKE, Lavious Tapiwa; OKOH, Anthony Ifeanyi - *Listeria monocytogenes* Virulence, Antimicrobial Resistance and Environmental Persistence: A Review. **Pathogens**. ISSN 2076-0817. 9:7 (2020).

MATLE, Itumeleng; MBATHA, Khanyisile R.; LENTSOANE, Olivia; MAGWEDERE, Kudakwashe; MOREY, Liesl; MADOROBA, Evelyn - Occurrence, serotypes, and characteristics of *Listeria monocytogenes* in meat and meat products in South Africa between 2014 and 2016. **Journal of Food Safety**. ISSN 0149-6085. 39:4 (2019) e12629.

MAZAHARI, Tina; CERVANTES-HUAMÁN, Brayan R. H.; BERMÚDEZ-CAPDEVILA, Maria; RIPOLES-AVILA, Carolina; RODRÍGUES-JEREZ, José Juan - *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen? **Microorganisms**. ISSN 2076-2607. 9:1 (2021).

MCCLURE, P. J.; ROBERTS, T. A.; OGURU, P. Otto - Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. **Letters in Applied Microbiology**. ISSN 0266-8254. 9:3 (1989) 95–99.

MEAD, Paul S.; SLUTSKER, Laurence; DIETZ, Vance; MCCAIG, Linda F.; BRESEE, Joseph S.; SHAPIRO, Craig; GRIFFIN, Patricia M.; TAUXE, Robert V. - Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**. ISSN 1080-6040. 5:5 (1999) 607–625.

MENCHERINI, Teresa; PICERNO, Patrizia; SCESA, Carla; AQUINO, Rita - Triterpene,

antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. **Journal of Natural Products**. ISSN 0163-3864. 70:12 (2007) 1889–1894.

MENGAUD, Jérôme; OHAYON, Hélène; GOUNON, Pierre; MÈGE, René-Marc; COSSART, Pascale - E-cadherin is the Receptor for Internalin, a Surface Protein Required for Entry of *L. monocytogenes* into Epithelial Cells. **Cell**. ISSN 00928674. 84:6 (1996) 923–932.

MIHAI, Adriana Laura; POPA, Mona Elena - Essential oils utilization in food industry - a literature review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**. ISSN 2285-1364. 17 (2013) 187–192.

MIRAJ, Sepide; RAFIEIAN-KOPAEI; KIANI, Sara - *Melissa officinalis* L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. **Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. ISSN 2156-5872. 22:3 (2017) 385–394.

MOGHIMI, Roya; GHADERI, Lida; RAFATI, Hasan; ALIAHMADI, Atousa; MCCLEMENTS, David Julian - Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 194 (2016) 410–415.

MORADKHANI, H.; SARGSYAN, E.; BIBAK, H.; NASERI, B.; SADAT-HOSSEINI, M.; FAYAZI-BARJIN, A.; MEFTAHIZADE, H. - *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. **Journal of Medicinal Plants Research**. ISSN 19960875. 4:25 (2010) 2753–2759.

MRLIANOVÁ, Mária; TEKEL'OVÁ, Daniela; FELKLOVÁ, Melanie; REINÖHL, Vilém; TÓTH, Jaroslav - The influence of the harvest cut height on the quality of the herbal drugs *Melissae folium* and *Melissae herba*. **Planta Medica**. ISSN 00320943. 68:2 (2002) 178–180.

NAZZARO, Filomena; FRATIANNI, Florinda; DE MARTINO, Laura; COPPOLA, Raffaele; DE FEO, Vincenzo - Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**. ISSN 1424-8247. 6:12 (2013) 1451–1474.

NEGI, Pradeep Singh - Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 156:1 (2012) 7–17.

O'DRISCOLL, Brid; GAHAN, Cormac G. M.; HILL, Colin - Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. **Applied and Environmental Microbiology**. . ISSN 0099-2240. 62:5 (1996) 1693–1698.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. - Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by

hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 120:1 (2010) 308–312.

OLAIMAT, Amin N.; AL-HOLY, Murad A.; SHAHBAZ, Hafiz M.; AL-NABULSI, Anas A.; GHOUSH, Mahmoud H. Abu; OSAILI, Tareq M.; AYYASH, Mutamed M.; HOLLEY, Richard A. - Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. ISSN 15414337. 17:5 (2018) 1277–1292.

OLIVEIRA, Adriana R.; DOMINGUES, Fernanda C.; FERREIRA, Susana - The influence of resveratrol adaptation on resistance to antibiotics, benzalkonium chloride, heat and acid stresses of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. ISSN 09567135. 73 (2017) 1420–1425.

OOI, Say Tat; LORBER, Bennett - Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. **Clinical Infectious Diseases**. ISSN 1058-4838. 40:9 (2005) 1327–1332.

Organização Mundial de Saúde (WHO) - **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. 2015. [Acedido a 19 de dezembro de 2020] Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>

PAPOTI, Vassiliki T.; TOTOMIS, Nikolaos; ATMATZIDOU, Aikaterini; ZINOVIADOU, Kyriaki; ANDROULAKI, Anna; PETRIDIS, Dimitris; RITZOULIS, Christos - Phytochemical Content of *Melissa officinalis* L. Herbal Preparations Appropriate for Consumption. **Processes**. 7:2 (2019) 88.

PEEL, M.; DONACHIE, W.; SHAW, A. - Temperature-dependent Expression of Flagella of *Listeria monocytogenes* Studied by Electron Microscopy, SDS-PAGE and Western Blotting. **Journal of General Microbiology**. . ISSN 1350-0872. 134:8 (1988) 2171–2178.

PERRICONE, Marianne; ARACE, Ersilia; CORBO, Maria R.; SINIGAGLIA, Milena; BEVILACQUA, Antonio - Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664-302X. 6:76 (2015).

PIZARRO-CERDÁ, Javier; KÜHBACHER, Andreas; COSSART, Pascale - Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. ISSN 2157-1422. 2:11 (2012) a010009.

RASKO, David A.; SPERANDIO, Vanessa - Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**. ISSN 1474-1776. 9:2 (2010) 117–128.

- RAVIKUMAR, S.; GNANADESIGAN, M.; SUGANTHI, P.; RAMALAKSHMI, A. - Antibacterial potential of chosen mangrove plants against isolated urinary tract infectious bacterial pathogens. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**. 2:3 (2010) 94–99.
- RAYBAUDI-MASSILIA, Rosa M.; MOSQUEDA-MELGAR, Jonathan; MARTÍN-BELLOSO, Olga - Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362-028X. 69:7 (2006) 1579–1586.
- Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005. Jornal Oficial da União Europeia L 338/1, 15 de novembro de 2005. [Acedido a 18 de maio de 2021] Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>
- RICCI, Antonia *et al.* - *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. **EFSA Journal**. ISSN 18314732. 16:1 (2018).
- RODRÍGUEZ-LÓPEZ, Pedro; RODRÍGUEZ-HERRESA, Juan José; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, Daniel; CABO, Marta López - Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol. **Foods**. ISSN 2304-8158. 7:6 (2018) 85.
- SALAMON, I.; KRYVTSOVA, M. V.; TRUSH, K. I.; FANDALYUK, A. I.; SPIVAK, M. J. - Agro-ecological cultivation, secondary metabolite characteristics and microbiological tests of lemon balm (*Melissa officinalis*) – the variety Citronella. **Regulatory Mechanisms in Biosystems**. 10:2 (2019) 265–269.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, Laura; VARGAS, María; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, Chelo; CHIRALT, Amparo; CHÁFER, Maite - Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings. **Food Engineering Reviews**. ISSN 1866-7910. 3:1 (2011) 1–16.
- SCHARFF, Robert L. - Economic burden from Health Losses Due to Foodborne Illness in the United States. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362-028X. 75:1 (2012) 123–131.
- SHAKERI, Abolfazl; SAHEBKAR, Amirhossein; JAVADI, Behjat - *Melissa officinalis* L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. ISSN 0378-8741. 188 (2016) 204–228.
- SHAMLOO, E.; HOSSEINI, H.; Z., Abdi Moghadam; M., Halberg Larsen; A., Haslberger; M. Alebouyeh - Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. **Iranian Journal of Veterinary Research**. ISSN 17281997. 20:4 (2019) 241–254.

SHENG, Ji Yang; CHEN, Tong-Tong; TAN, Xiao-Juan; CHEN Ting; JIA, Ai-Qun - The quorum-sensing inhibiting effects of stilbenoids and their potential structure-activity relationship. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. ISSN 0960-894X. 25:22 (2015) 5217–5220.

SHI, Chao; SONG, Kaikuo; ZHANG, Xiaorong; SUN, Yi; SUI, Yue; CHEN, Yifei; JIA, Zhenyu; SUN, Huihui; SUN, Zheng; XIA, Xiaodong - Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. **PLOS ONE**. ISSN 1932-6203. 11:7 (2016) e0159006.

SKANDAMIS, Panagiotis N.; NYCHAS, George John E. - Quorum Sensing in the Context of Food Microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 0099-2240. 78:16 (2012) 5473–5482.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. - The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**. ISSN 07400020. 18:4 (2001) 463–470.

SMITH, Greg A.; MARQUIS, Hélène; JONES, Siân; JOHNSTON, Norah C.; PORTNOY, Daniel A.; GOLDFINE, Howard - The Two Distinct Phospholipases C of *Listeria monocytogenes* Have Overlapping Roles in Escape from a Vacuole and Cell-to-Cell Spread. **Infection and Immunity**. ISSN 0019-9567. 63:11 (1995) 4231–4237.

SON, Hyeon Jeong; KANG, Ji Hoon; SONG, Kyung Bin - Antimicrobial activity of safflower seed meal extract and its application as an antimicrobial agent for the inactivation of *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh lettuce. **Lwt – Food Science and Technology**. ISSN 00236438. 85 (2017) 52–57.

SREY, Sokunrotanak; JAHID, Iqbal Kabir; HA, Sang Do - Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**. ISSN 09567135. 31:2 (2013) 572–585.

STEFANOVIĆ, Olgica; COMIC, Ljiljana - Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. ISSN 22313354. 2:1 (2012) 1–5.

STEPANOVIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RANIN, L.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. - Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**. ISSN 0266-8254. 38:5 (2004) 428–432.

SU, Xudong; CAO, Guojie; ZHANG, Jianmin; PAN, Haijan; ZHANG, Daofeng; KUANG, Dai; YANG, Xiaowei; XU, Xuebin; SHI, Xianming; MENG, Jianghong - Characterization of

internalin genes in *Listeria monocytogenes* from food and humans, and their association with the invasion of Caco-2 cells. **Gut Pathogens**. ISSN 17574749. 11:30 (2019).

TONGNUANCHAN, Phakawat; BENJAKUL, Soottawat - Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**. ISSN 00221147. 79:7 (2014) 1231–1249.

TRAVIER, Laetitia; LECUIT, Marc - *Listeria monocytogenes* ActA: A new function for a ‘classic’ virulence factor. **Current Opinion in Microbiology**. ISSN 13695274. 17 (2014) 53–60.

VÁZQUEZ-BOLAND, José A.; KUHN, Michael; BERCHE, Patrick; CHAKRABORTY, Trinad; DOMÍNGUEZ-BERNAL, Gustavo; GOEBEL, Werner; GONZÁLEZ-ZORN, Bruno; WEHLAND, Jürgen; KREFT, Jürgen - *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**. 14:3 (2001) 584–640.

VOGEL, Birte Fonnesbech; HANSEN, Lisbeth Truelstrup; MORDHORST, Hanne; GRAM, Lone - The survival of *Listeria monocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride and organic material. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 140:2–3 (2010) 192–200.

WAI, G. Y.; TANG, J. Y. H.; NEW, C.Y.; SON, R. - A review on *Listeria monocytogenes* in food: prevalence, pathogenicity, survivability and antibiotic resistance. **Food Research**. . ISSN 1345-9961. 4:1 (2020) 20–27.

YOUSEFI, Mojtaba; KHORSHIDIAN, Nasim; HOSSEINI, Hedayat - Potential Application of Essential Oils for Mitigation of *Listeria monocytogenes* in Meat and Poultry Products. **Frontiers in Nutrition**. . ISSN 2296-861X. 7 (2020).

YUAN, Wenqian; SENG, Zi Jing; KOHLI, Gurjeet Singh; YANG, Liang; YUK, Hyun-Gyun - Stress Resistance Development and Genome-Wide Transcriptional Response of *Escherichia coli* O157:H7 Adapted to Sublethal Thymol, Carvacrol, and *trans*-Cinnamaldehyde. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 0099-2240. 84:22 (2018) e01616-18.

YUAN, Wenqian; YUK, Hyun-Gyun - Effects of Sublethal Thymol, Carvacrol, and *trans*-Cinnamaldehyde Adaptation on Virulence Properties of *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 0099-2240. 85:14 (2019).

ZHANG, Jing; YE, Ke-Ping; ZHANG, Xin; PAN, Dao-Dong; SUN, Yang-Yinh; CAO, Jin-Xuan - Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664-302X. 7:2094 (2017) 1–10.

ZHANG, Ying; KONG, Jie; XIE, Yunfei; GUO, Yahui; CHENG, Yuliang; QIAN, He; YAO,

Weirong - Essential oil components inhibit biofilm formation in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* via anti-quorum sensing activity. **LWT - Food Science and Technology**. ISSN 00236438. 92:1800 (2018) 133–139.