

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELA DA COSTA BINHARA

EFEITOS ISOLADOS E SINÉRGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Syzygium aromaticum* E ISOTIOCINATO DE ALILO FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

MEDIANEIRA

2021

RAFAELA DA COSTA BINHARA

EFEITOS ISOLADOS E SINÉRGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Syzygium aromaticum* E ISOTIOCINATO DE ALILO FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Isolated and synergic effects of *Syzygium aromaticum* essential oil and allyl isothiocinate against pathogenic bacteria

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Flávio Dias Ferreira.

MEDIANEIRA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

RAFAELA DA COSTA BINHARA

EFEITOS ISOLADOS E SINÉRGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Syzygium aromaticum* E ISOTIOCINATO DE ALILO FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 01 / Dezembro / 2021

Flavio Dias Ferreira
Doutorado em Ciência de Alimentos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Medianeira

Rosana Aparecida da Silva Buzanello
Doutorado em Ciência de Alimentos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Medianeira

Valdemar Padilha Feltrin
Doutorado em Ciências dos Alimentos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Medianeira

MEDIANEIRA

2021

Dedico este trabalho à minha família e amigos, pelos
momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

Nenhuma palavra seria suficiente para expressar tamanha gratidão que sinto a todos que participaram da minha jornada acadêmica. Estes parágrafos provavelmente não irão atender a todas as pessoas que participaram dessa importante etapa de minha vida. As que não estão presentes em minhas palavras peço desculpas, mas elas podem estar certas que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

Agradeço primeiramente aos meus pais, por nunca terem medido esforços para me proporcionar a oportunidade de me focar nos estudos. Em especial a minha mãe, por todo o apoio emocional e psicológico, me incentivando nos momentos difíceis e compreendendo a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho. Ao meu namorado Rafael por toda a paciência e apoio, sempre disposto a me auxiliar, a ouvir sobre minha pesquisa, me ajudando emocionalmente nos dias difíceis onde os experimentos não davam certo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Dias Ferreira, que conduziu o trabalho com paciência e dedicação, amizade, sempre disponível a compartilhar todo o seu vasto conhecimento, me guiando com sabedoria. A minha amiga e colega Mellide Zanchettin, que me auxiliou em alguns experimentos, e tornou as manhãs no laboratório mais leves.

A todos os professores que passaram por minha jornada acadêmica, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo do curso. A Universidade Tecnológica Federal do Paraná essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação, e por tudo o que aprendi ao longo dos anos do curso. Aos técnicos de laboratório que sempre estiveram disponíveis em me auxiliar com meus experimentos.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todos os anos de curso. Gostaria de agradecer aos meus amigos Eleomar, Bruna e Eduardo que sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu não acreditava, sendo a minha família e apoio em Medianeira.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Milhares de pessoas são contaminadas todos os anos por meio de doenças transmitidas por alimentos, causando grande impacto na saúde pública e economia global. Na tentativa de garantir a segurança microbiológica, conservantes sintéticos são amplamente utilizados na indústria de alimentos, entretanto, estão ligados à riscos à saúde do consumidor. Extratos naturais e seus compostos isolados tornam-se uma alternativa viável pois geralmente não apresentam risco à saúde humana e animal além de serem seguros ao meio ambiente. Neste trabalho, foi avaliado o efeito antibacteriano do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e do isotiocianato de alilo, composto majoritário do óleo essencial de mostarda, contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*. A atividade antibacteriana foi realizada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) utilizando a técnica de microdiluição em caldo, com modificações. Além disso, os efeitos da combinação entre os compostos foram avaliados utilizando o método de *checkboxboard* através da Concentração Inibitória Fracional (CIF). O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* apresentou CIM variando entre 1000 e 2000 µg/mL, enquanto o isotiocianato de alilo teve a faixa de 625 a 2500 µg/mL. No teste *de checkboxboard*, observou um efeito aditivo entre a combinação dos compostos frente a todas as bactérias avaliadas, apresentando CIM entre 19,53 a 500 µg/mL. Esses achados mostram que a combinação óleo essencial de cravo e isotiocianato de alilio possibilita obter atividade antibacteriana em menores concentrações do que quando utilizados de maneira isolada, aumentando a viabilidade do uso pela redução dos impactos sensoriais.

Palavras-chave: Agentes antiinfeciosos; Bactérias patogênicas; Essências e óleos essenciais.

ABSTRACT

Thousands of people are infected each year through food-borne illnesses, which have a major impact on public health and the global economy. In an attempt to ensure microbiological safety, synthetic preservatives are widely used in the food industry, however, they are linked to consumer health risks. Natural extracts and their isolated compounds become a viable alternative as they generally do not pose a risk to human and animal health, in addition to being safe for the environment. In this work, we evaluated the antibacterial effect of *Syzygium aromaticum* essential oil and allyl isothiocyanate against *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. The antibacterial activity was performed using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) using the microdilution technique in broth, with modifications. Furthermore, the effects of the combination between the compounds were evaluated using the checkerboard method through the Fractional Inhibitory Concentration (FIC). The essential oil of *Syzygium aromaticum* presented MIC ranging between 1,000 and 2,000 µg/mL, while the allyl isothiocyanate ranged from 625 to 2,500 µg/mL. In the checkerboard test, an additive effect was observed between the combination of compounds against all bacteria evaluated, with MIC between 19.53 to 500 µg/mL. These findings show that the combination essential oil of clove and allyl isothiocyanate makes it possible to obtain antibacterial activity at lower concentrations than when used alone, increasing the viability of use by reducing organoleptic impacts.

Keywords: Anti-infective agents; Bacteria, Pathogenic; Essences and essential oils.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Composição química (%) dos compostos identificados no óleo essencial de *Syzygium aromaticum* por CG/EM **Erro! Indicador não definido.**9
- Tabela 2 – Valores de CIM dos compostos naturais frente as bactérias patogênicas avaliadas **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 3 – Valores de CIF da combinação dos compostos naturais frente as bactérias patogênicas avaliadas.....33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	DESENVOLVIMENTO	16
3.1	Revisão bibliográfica	16
3.1.1	Patógenos alimentares	16
3.1.1.1	<i>Bacillus cereus</i>	16
3.1.1.1.1	<i>Patogenicidade</i>	17
3.1.1.2	<i>Escherichia coli</i>	18
3.1.1.2.1	<i>Patogenicidade</i>	18
3.1.1.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	19
3.1.1.3.1	<i>Patogenicidade</i>	19
3.1.1.4	<i>Salmonella enterica</i>	20
3.1.1.4.1	<i>Patogenicidade</i>	21
3.1.2	Antimicrobianos sintéticos	22
3.1.3	Produtos naturais	23
3.1.3.1	Mostarda (<i>Brassica juncea</i>)	24
3.1.3.2	Cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	24
3.2	Materiais e métodos	25
3.2.1	Compostos naturais	25
3.2.1.1	Obtenção das amostras	25
3.2.1.2	Análise do Óleo Essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> e Identificação Química	25
3.2.1.3	Preparação das amostras	26
3.2.2	Micro-organismos	26
3.2.3	Determinação da atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> e Isotiocianato de alilo	26
3.2.3.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	26
3.2.3.2	Interação do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> e isotiocianato de alilo	27
3.3	Resultados	28

3.3.1	Análise do Óleo Essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> e Identificação Química.....	28
3.3.2	Determinação da atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> e Isotiocianato de alilo	29
3.3.2.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	29
3.3.2.2	Interação do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> e isotiocianato de alilo.....	31
4	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos por bactérias patogênicas é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos, essas causam diversas implicações para a saúde pública global e grande consequência econômica. (PISOSCHI *et al.*, 2018). A contaminação bacteriana ganha destaque devido sua alta morbidade e mortalidade. A indústria alimentícia enfrenta diversos desafios em seu cotidiano para controlar o crescimento destes microrganismos, sem interferir drasticamente nos atributos sensoriais, valores nutricionais e custo de produção (BALAGUER *et al.*, 2013).

Para garantir a segurança microbiológica dos alimentos, conservantes sintéticos são amplamente utilizados na indústria alimentícia, entretanto, alguns estão ligados à resistência microbiana e riscos à saúde (PISOSCHI *et al.*, 2018). As possíveis consequências a saúde do consumidor causada pela utilização de conservantes sintéticos cria a necessidade de investigar antimicrobianos obtidos a partir de produtos naturais, pois geralmente não apresentam risco à saúde humana e animal além de serem seguros ao meio ambiente (GYAWALI; HAYEK; IBRAHIM, 2015a). Diversos autores relatam atividades antimicrobiana de óleos essenciais, metabólitos secundários de plantas com características aromáticas, ou de seus compostos majoritários (ATARÉS; CHIRALT, 2016; BEHBAHANI; NOSHAD; FALAH, 2019; NEGI, 2012; PORTER; MOREY; MONU, 2020; SIROLI *et al.*, 2015; YAZGAN, 2020)

Entretanto, a baixa solubilidade e as propriedades sensoriais marcantes dos óleos essenciais dificultam sua utilização como agente antimicrobiano em alimentos, uma possível solução é a combinação com outros compostos antimicrobianos isolados (PORTER; MOREY; MONU, 2020). Estudos relatam possíveis efeitos aditivos ou sinérgicos para estas combinações, tornando uma estratégia eficiente no combate ao desenvolvimento microbiano e indicando uma maior viabilidade na aplicação em alimentos (DELAQUIS *et al.*, 2002; GOÑI *et al.*, 2009).

A *Syzygium aromaticum*, popularmente conhecido como cravo-da-índia, é uma das especiarias mais comercializadas no mundo e o botão da flor na forma desidratada é a forma usualmente consumida. Seu óleo essencial é utilizado devido as atividades antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014; FROHLICH *et al.*, 2019; ÖZCAN; ARSLAN, 2011). A

Brassica campestris, popularmente conhecida como mostarda, é amplamente utilizada como condimento. O composto majoritário do óleo essencial, isotiocianato de alilo, tem diversas atividades relatadas na literatura científica, tais como benefícios a saúde humana e alta atividade antimicrobiana em diversos tipos de microrganismos (CLEMENTE *et al.*, 2016; LUCIANO; HOLLEY, 2009; NAZARETH *et al.*, 2020).

Essa premissa possibilita a investigação do óleo essencial de cravo-da-índia e isotiocianato de alilo, composto majoritário do óleo essencial de mostarda, como conservantes naturais. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antibacteriano do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e o isotiocianato de alilo isolados e combinados frente a bactérias patogênicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antibacteriano do óleo essencial de cravo e do isotiocianato de alilo de forma isolada e combinados entre si frente a bactérias patogênicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar quimicamente o óleo essencial de cravo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- Avaliar o efeito antibacteriano do óleo essencial de cravo e do isotiocianato de alilo de forma isolada frente a *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*;
- Avaliar o efeito antibacteriano do óleo essencial de cravo e do isotiocianato de alilo combinados frente a *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*;
- Avaliar o efeito sinérgico, aditivo, antagonista ou ainda sem efeito interativo do óleo essencial com isotiocianato de alilo.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Revisão bibliográfica

3.1.1 *Patógenos alimentares*

Doenças de origem alimentar são usualmente infecciosas ou tóxicas, causadas por agentes que penetram o hospedeiro pela ingestão de alimentos contaminados (YOUSEF; ABDELHAMID, 2019). Em 2015, a Organização Mundial da Saúde estimou que 1 em cada 10 pessoas adquire uma doença transmitida através dos alimentos por ano, esse valor representa cerca de 600 milhões de casos e 420.000 mortes (WHO, 2015).

Evitar a presença de patógenos em toda a cadeia produtiva é um dos principais desafios da segurança de alimentos, tendo em vista o fornecimento de alimentos seguros para o consumo (FRANZ *et al.*, 2019). O espectro de patógenos de origem alimentar é amplo, sendo constituído de uma variedade de bactérias entéricas, aeróbios e anaeróbios, patógenos virais e parasitas (TAUXE, 2002). No Brasil, com a vasta dimensão do país, a qualidade dos alimentos oscila, dificultando o conhecimento sobre a real extensão da disseminação de microrganismos patogênicos (ANVISA, 2012).

3.1. 1.1 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é um patógeno em formato de bastonete, Gram-positivo, aeróbio e anaeróbio facultativo, móvel, produtor de esporos, amplamente distribuído pelo ambiente, sendo constantemente isolado do solo, poeira, plantas e ambientes de produção de alimentos. Seus esporos são resistentes a condições ambientais extremas, como pasteurização e radiação gama, tornando a eliminação desta bactéria um desafio para a indústria alimentícia (CHANG *et al.*, 2018). Essa bactéria exerce uma influência significativa na segurança alimentar e saúde pública por causa de sua capacidade de causar doenças e deterioração de alimentos por meio da produção de várias toxinas (OWUSU-KWARTENG *et al.*, 2017).

O reservatório natural do *B. cereus* no ambiente consiste em matéria orgânica em decomposição, água fresca e o intestino dos invertebrados, dos quais solo e alimentos podem ser contaminados, levando à colonização do trato entérico humano (ARNESEN; FAGERLUND; GRANUM, 2008). A contaminação da água, sugere pode se o principal meio pelo qual *B. cereus* é inserido na cadeia de processamento de alimentos. Passivamente os esporos são espalhados, sendo comumente encontrados fora de seus reservatórios naturais (MARROLLO, 2016). O ciclo de vida do *B. cereus* mostra um saprofito no qual os esporos germinam em solo, produzem de bacilos vegetativos, que podem então esporular, continuando assim o próprio ciclo de vida (MARROLLO, 2016).

3.1.1.1 Patogenicidade

B. cereus é um dos principais patógenos de origem alimentar em humanos, produz uma diversidade de fatores virulentos, que podem acarretar desde uma intoxicação alimentar até à morte (DENG et al., 2019). Apesar de geralmente associada a infecções entéricas, as manifestações da doença podem ser bastante variadas e incluir infecções de pele, bacteremia, pneumonia e meningite, essas se manifestam normalmente em pessoas imunocomprometidas (CHANG et al., 2018).

A patogenicidade de *B. cereus* é causada por diferentes toxinas produzidas por esse patógeno (GAO et al., 2018). As doenças podem ser causadas de duas maneiras por esse microrganismo, através do consumo do alimento inadequadamente manipulados contaminados com a toxina pré-formada ou quando ocorre a ingestão da bactéria ou de seu esporo que produzem toxinas dentro do trato gastrointestinal após o consumo de um alimento contaminado (PEXERA; GOVARIS, 2010). *B. cereus* pode produzir uma série de toxinas, como citotoxina K (CytK), enterotoxina não hemolítica (Nhe), hemolisina BL (Hbl) e outras toxinas patogênicas (ZHAO et al., 2020).

Atualmente, o tratamento da infecção por *B. cereus* é realizado por terapia antibiótica, mas alguns *B. cereus* desenvolveram resistência a alguns antibióticos (GAO et al., 2018).

3.1.1.2 Escherichia coli

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa em forma de bastonete, anaeróbica facultativa da família *Enterobacteriaceae*, que geralmente reside no intestino e no trato intestinal de animais de sangue quente e humanos (ROHATGI; GUPTA, 2021; JANG *et al.*, 2017; ODKOR; AMPOFO, 2013). A maior parte das cepas de *E. coli* são inofensivas, essas auxiliam na produção de vitamina K e no condicionamento do sistema digestivo (ROHATGI; GUPTA, 2021).

A *E. coli*, que é um organismo simbiote dos humanos, desenvolveu algumas cepas patogênicas devido a evolução para o subtipo toxigênico em resposta da virulência mediada por plasmídeo obtido por bacteriófagos (ROHATGI; GUPTA, 2021). Alguns grupos evoluídos de *E. coli* acumularam perfis de patogenicidade se tornando patogênicos para humanos, dentre elas a *E. coli* O157: H7 que é produtora de toxina Shiga, essa é responsável por 20% de todas as doenças de origem alimentar em todo o mundo (RANI *et al.*, 2021).

As cepas patogênicas de *E. coli* podem sobreviver em ambientes abertos devido a sua capacidade de usar nutrientes e de se fixar em superfícies (CHEKABAB *et al.*, 2013). Os biofilmes formados pela *E. coli* O157: H7 também bloqueiam seletivamente as moléculas que são antimicrobianas por natureza, aumentando assim os desafios de combater esse microrganismo (ROHATGI; GUPTA, 2021).

Devido ao habitat principal de *E. coli* O157: H7 ser intestinos de animais de sangue quente, esse patógeno é transmitido principalmente pela via fecal-oral (RANI *et al.*, 2021). Esse microrganismo pode ser encontrado no solo, esterco e água de irrigação ou sementes contaminadas, pode se inserir na cadeia produtiva de alimentos pela irrigação e também pela transferência para outros produtos durante o processamento e embalagem dos alimentos (CHEKABAB *et al.*, 2013).

3.1.1.2.1 Patogenicidade

Os grupos patogênicos associados a doenças transmitidas por alimentos ou água incluem *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (FENG; WEAGANT;

JINNEMAN, 2020). As cepas patogênicas desse microrganismo são classificadas de acordo com as propriedades de virulência e mecanismos de patogenicidade que causam doenças gastrointestinais (JANG *et al.*, 2017).

A EHEC se destaca por ser a principal causa de colite hemorrágica, que pode progredir para a síndrome hemolítico urêmica (SHU), principalmente em crianças e idosos, potencialmente fatal (WHO, 2018a). EHEC são caracterizados pela produção de verotoxina ou toxinas Shiga, sendo a dose infecciosa estimada em 10 a 100 células (FENG; WEAGANT; JINNEMAN, 2020). Segundo a Organização mundial da saúde (2018) estima-se que até 10% dos pacientes com infecção por EHEC podem desenvolver SHU, com taxa de letalidade variando de 3 a 5%.

A *E. coli* produtora de toxina Shiga, *E. coli* O157: H7 está relacionada a graves doenças de origem alimentar, sendo transmitido através da ingestão de alimentos contaminados, como produtos de carne moída crus ou malcozidos, leite cru e vegetais crus contaminados (WHO, 2018a).

3.1.1.3 Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes é uma bactéria psicrotrófica gram-positiva de enorme preocupação para a indústria alimentícia, pois pode estar presente em uma ampla variedade de alimentos devido sua capacidade de resistir a condições extremas como, temperaturas de refrigeração, pH ácido e altas concentrações de sal, além disso, apresenta alta taxa de mortalidade (ROHANI *et al.*, 2011). Sua alta resistência a grande parte dos processos industriais, quando comparada a outras bactérias patogênicas, tornou-se um bom indicador para examinar a eficiência das tecnologias de processamento de alimentos (BAHRAMI *et al.*, 2020).

Outra importante preocupação causada pela *L. monocytogenes* para a indústria alimentícia, é sua capacidade se manter fixada às superfícies de processamento de alimentos e formar biofilmes em diferentes locais inacessíveis da instalação de processamento (KOCOT; OLSZEWSKA, 2017).

3.1.1.3.1 Patogenicidade

A listeriose é uma doença causada principalmente pela *L. monocytogenes* (WHO, 2018b; BRITANNICA ACADEMIC, 2008a). É uma zoonose que foi reconhecida em 1980 como infecção de origem alimentar, apesar de caracterizada por casos esporádicos é considerada um grande problema de saúde pública, devido estar associada a altas taxas de hospitalização e mortalidade (LEPE, 2020). Segundo o Relatório resumido da União Europeia sobre tendências e fontes de zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de origem alimentar de 2017, a listeriose indica uma taxa de hospitalização de 98,6% e uma taxa de letalidade de 13,8% relatada apenas por países constituintes da União Europeia (EFSA; ECDC, 2018).

A listeriose é caracterizada por duas formas de manifestação clínica, a forma não invasiva e a forma invasiva (HALBEDEL *et al.*, 2019; WHO, 2018b). A listeriose não invasiva, também denominada de gastroenterite febril listerial, possui uma manifestação mais leve quando comparada com a forma invasiva. A forma não invasiva tem como principal manifestação clínica a gastroenterite, mas pode manifestar febre, dor de cabeça, diarreia e mialgia (HALBEDEL *et al.*, 2019; WHO, 2018b).

A manifestação da forma invasiva é mais preocupante e afeta essencialmente populações de alto risco, que incluem idosos, mulheres grávidas e imunocomprometidos, o tempo de incubação do microrganismo varia de poucos dias a 90 dias, é caracterizada por sintomas graves e alta taxa de mortalidade (EFSA; ECDC, 2018; WHO, 2018b). Essa forma de manifestação representada por bacteremia, neurolisteriose, infecções materno-neonatais e infecções focais em vários órgãos e tecidos (CHARLIER *et al.*, 2017; OOI; LORBER, 2005).

Os alimentos representam a principal fonte de *L. monocytogenes*, o trato gastrointestinal é o acesso para o organismo do hospedeiro. A capacidade do organismo de invadir o tecido e evitar as defesas imunológicas do corpo depende da integridade do sistema imunológico do hospedeiro e da virulência do patógeno (LEPE 2020; MCNEILL *et al.*, 2017).

3.1.1.4 Salmonella enterica

O gênero *Salmonella* refere-se a bactérias anaeróbicas facultativas em forma de bastonete gram-negativas geralmente com 2–5 microns de comprimento

por 0,5–1,5 microns de largura e móveis por flagelos, pertencente à família Enterobacteriaceae (ANDINO; HAMMING, 2015; ANTONELLI *et al.*, 2019; BAO *et al.*, 2020).

A *Salmonella* é amplamente distribuída pelo ambiente e altamente resistente, podendo sobreviver várias semanas em ambientes secos e vários meses na água (WHO, 2018c). O trato gastrointestinal dos animais são os principais reservatórios dessa bactéria, sendo excretada pelas fezes. A transmissão pode ser pelos insetos ou outros animais, podendo assim contaminar produtos alimentícios de origem animal e vegetal, direta ou indiretamente (ANDINO; HAMMING, 2015; GUILLÉN *et al.*, 2020).

A subespécie *S. enterica* é considerada um patógeno entérico de seres humanos e animais, sendo uma das principais causa de intoxicação alimentar em todo o mundo (HAN *et al.*, 2020; MÜLLER *et al.*, 2019). Os sorogrupos de *S. enterica* são separados de acordo com a estrutura do antígeno somático O, um polissacarídeo estável ao calor localizado na superfície do lipopolissacarídeo da bactéria (AGASAN *et al.*, 2002).

A *S. enterica* pode passar por toda a cadeia alimentar, desde a alimentação animal, produção primária e até as residências ou estabelecimentos e instituições de serviços alimentícios. Esse microrganismo é responsável por índices significativos de morbidade e mortalidade, causando grandes e pequenos surtos, tanto nos países emergentes como desenvolvidos, associados, principalmente, o consumo de alimentos de origem animal como ovos, aves, carnes e produtos lácteos (ANVISA, 2012). Isto ocorre devido sobrevirem em condições naturalmente estressantes, como alta osmolaridade, temperaturas extremas e baixos potenciais hidrogeniônicos (pHs) (FANG *et al.*, 2016).

3.1.1.4.1 Patogenicidade

A *S. enterica* são as principais bactérias enteropatogênicas causadoras de doenças pela ingestão de alimentos no mundo, causando desde intoxicação leve até risco de vida por uma infecção sistêmica (GALÁN 2001; SPECTOR; KENYON, 2012).

A salmonelose vem sendo associada a dois tipos principais de doenças gastrointestinais, febre entérica e gastroenterites (BRITANNICA ACADEMIC, 2008b). Em 2017 apenas na União Europeia foram confirmados 91.661 casos de Salmonelose em humanos (EFSA; ECDC, 2018). Comumente a dose infectante apresenta-se em torno de 10^5 a 10^8 células, entretanto hospedeiros imunocomprometidos podem desencadear sintomas com doses inferiores (ANVISA, 2012).

A infecção causada pela *Salmonella* pode avançar por meio de dois estágios principais, invasão e infecção (AZCARATE-PERIL *et al.*, 2018). No decorrer do estágio de invasão o microrganismo adere e coloniza o intestino, adquirindo acesso a células epiteliais, em seguida pode atravessar as células epiteliais e é internalizada pelos macrófagos, onde se multiplica, se espalha no hospedeiro causando infecção sistêmica (AZCARATE-PERIL *et al.*, 2018). O início apresenta-se uma febre aguda, dor abdominal, diarreia, náuseas e às vezes vômitos, sendo estes sintomas considerados leves e os pacientes na maioria das vezes se recuperam sem tratamento específico, 60–80% de todos os casos de Salmonelose não são reconhecidos (WHO, 2018c). Entretanto, para crianças e indivíduos imunocomprometidos podem infectar diversos tecidos resultando em significativa imunopatologia, morbidade e mortalidade (HAN *et al.*, 2020).

3.1.2 Antimicrobianos sintéticos

Várias técnicas de conservação de alimentos vêm sendo tradicionalmente aplicadas para garantir a qualidade microbiológica, a fim de evitar riscos de doenças aos consumidores. O controle de patógenos alimentares evoluiu ao decorrer da história, permitindo aumentar a vida útil dos alimentos e produzir alimentos mais seguros e nutritivos (ABDELHAMID; EL-DOUGGDOUG, 2020).

Processos de conservação utilizando antimicrobianos químicos tradicionais são usados há muitas décadas e são aprovados em diversos países, entretanto, a utilização destes conservantes sintéticos vem sendo associados a resistência microbiana e danos à saúde do consumidor (ABDELHAMID; EL-DOUGGDOUG, 2020; PISOSCHI *et al.*, 2018).

A resistência antimicrobiana é capacidade da bactéria de resistir aos efeitos dos agentes antimicrobianos (WANG *et al.*, 2020). O uso indevido e abuso de antibióticos na agricultura e na clínica são consideradas as notáveis causas da disseminação de resistência aos antimicrobianos (ANDERSSON; HUGHES, 2014). Além disso, a utilização destes conservantes estão associados a reações alérgicas, efeitos carcinogênicos, dificuldades respiratórias, danos ao coração e outras implicações para a saúde (PISOSCHI *et al.*, 2018)

3.1.3 *Produtos naturais*

Atender a demanda por alimentos mais naturais e manter a segurança alimentar são definitivamente grandes desafios da indústria alimentícia. A utilização de produtos naturais pode satisfazer esta demanda, pois são ricos em compostos com diversas propriedades biológicas (ROHANI *et al.*, 2011).

A utilização de extratos naturais e compostos isolados a partir de fontes naturais, como ervas, especiarias e frutas pode ser utilizado como substituto de alguns aditivos tradicionalmente usados pois além das propriedades biológicas possuem menores efeitos tóxicos em comparação aos aditivos sintéticos (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015; SHAH; BOSCO; MIR, 2014; PISOSCHI *et al.*, 2018; WEISS *et al.* 2010). Ainda, a utilização de produtos derivados de plantas apresenta menor probabilidade de resistência antimicrobiana (GYAWALI; HAYEK; IBRAHIM, 2015b).

Extratos naturais são extraídos a partir de materiais vegetais. O método de extração influencia diretamente a composição do extrato (BREWER, 2011; SCHWARZ *et al.*, 2001; SHAH; BOSCO; MIR, 2014).

Os óleos essenciais (OE) são compostos aromáticos voláteis extraídos da matriz vegetal (flores, botões, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes) normalmente por hidrodestilação (NEGI, 2012; FORNARI *et al.*, 2012). A composição é principalmente terpenos e seus derivados oxigenados, como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, éteres e ésteres (FORNARI *et al.*, 2012). Entretanto, o rendimento e a composição estão interligados com fatores bióticos e abióticos, podendo destacar a genética vegetal e alguns fatores estressantes como,

estresse hídrico, excesso de luz, ataque de predadores e pragas (SILVESTRE *et al.*, 2019).

Muitos estudos vêm sendo realizado em relação ao uso de óleos essenciais e seus componentes no controle de microrganismos, controle de pragas agrícolas, aditivo em filmes biodegradáveis e na preservação de alimentos (ATARÉS; CHIRALT, 2016; KHORSHIDIAN *et al.*, 2018; KORDALI; KESDEK; CAKIR, 2007; SILVESTRE *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2017).

3.1.3.1 Mostarda (*Brassica juncea*)

A *Brassica juncea* pertence à família das Brassicaceae, popularmente é conhecida com mostarda marrom. É cultivada em safras anuais semeadas na primavera, apresentam altura de 1,5 a 2 metros, cultivo simples, barato com grande tolerância a condições climáticas extremas (BRITANNICA ACADEMIC, 2020). Após suas flores murchar, surgem várias vagens verdes em seus ramos, cada vagem pode conter até 20 sementes, sendo as sementes secas a principal parte do processamento alimentar (BRITANNICA ACADEMIC, 2020).

O composto majoritário da mostarda, isotiocianato de alilo, é amplamente conhecido devido sua característica pungente, característico da mostarda. Além disso, o isotiocianato de alilo tem forte atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de micro-organismo patogênicos e deteriorantes em baixa concentração (ISSHIKI, *et al.* 2014).

3.1.3.2 Cravo (*Syzygium aromaticum*)

O *Syzygium aromaticum*, popularmente conhecida como cravo da Índia, pertence à família Mirtaceae e é uma das especiarias mais comercializada no mundo através do botão da flor desidratado. A árvore apresenta cerca de 8 a 12 metros de altura e uma árvore pode produzir anualmente até 34 kg de botões (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012; BRITANNICA ACADEMIC, 2019).

Devido a sabor picante e aroma forte, o cravo é utilizado para agregar sabor em diversos alimentos, entretanto, suas potentes atividades antisséptica,

antibacteriana, antifúngica e anestésica têm atraído bastante atenção (FROHLICH *et al.*, 2016). Os botões de cravo apresentam em torno de 14 a 20 por cento de óleo essencial na sua composição, sendo uma mistura de terpenos voláteis alifáticos e cíclicos e fenilpropanóides (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Dentre os compostos presente no óleo essencial do cravo, o eugenol ganha destaque devido as atividades biológicas, como atividades antioxidante, antimicrobiana, efeito analgésico, antiviral (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014).

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Compostos naturais

3.2.1.1 Obtenção das amostras

O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* foi adquirido da Biossência®, São Paulo, Brasil. O isotiocianato de alilo foi adquirido da Sigma Aldrich®, Saint Louis, Estados Unidos.

3.2.1.2 Análise do Óleo Essencial de *Syzygium aromaticum* e Identificação Química

A caracterização da composição química do óleo essencial foi realizada na Central Analítica da Universidade de São Paulo através da técnica de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG-EM) em equipamento Shimadzu CG-MS QP2020 e coluna RTX 5 ms de 30 metros por 0,25 mm e 0,25 µm. A temperatura inicial foi de 50 °C, sendo programada para atingir a temperatura máxima de 280 °C em 3 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 280 °C. A identificação dos picos foi realizada pela comparação dos espectros de massas com os espectros existentes na literatura (ADAMS, 2007) e com espectros do banco de dados do cromatógrafo.

3.2.1.3 Preparação das amostras

A concentração de uso do óleo essencial de cravo-da-índia foi ajustada através da diluição em solução estéril de Tween 80 a 0,01% conforme preconizado por Nguefack *et al.*, (2009) e o isotiocianato de alilo foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) 2% conforme Meira *et al.*, (2017). As amostras foram preparadas a fim de obter a concentração de 8000 µg/mL para o óleo essencial de cravo e 5000 µg/mL para o isotiocianato de alilo.

3.2.2 *Micro-organismos*

As bactérias, incluindo bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas, são causadoras de importantes patologias alimentares. Assim, utilizou-se duas cepas Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) e duas cepas Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*) para avaliar as atividades antibacterianas do óleo essencial de cravo-da-índia e isotiocianato de alilo. As cepas bacterianas foram cultivadas por 24 horas, e a suspensão bacteriana foi diluída a fim de atingir 0,5 de turbidez pela escala de McFarland (NCCLS, 2003).

3.2.3 *Determinação da atividade antibacteriana do óleo essencial de Syzygium aromaticum e Isotiocianato de alilo*

3.2.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e isotiocianato de alilo foi determinada usando a técnica de microdiluição em caldo baseado no método CLSI M2-A8 (NCCLS, 2003) com modificações. Em uma microplaca de esterilizada de 96 poços foi depositado 100 µL de caldo Brain Heart Infusion (BHI), 100 µL do óleo essencial ou da solução de Isotiocianato de alilo previamente preparados (item 3.2.1.3) e distribuídos em diluição seriada de modo a obter as concentrações desejadas, 8000 a 15,63 µg/mL para o óleo essencial de cravo e 5000 a 9,77 µg/mL para o isotiocianato de alilo, em sequência adicionou 5 µL de suspensão bacteriana com 0,5 de turbidez McFarland. Além disso, foi utilizado o controle de crescimento

(caldo BHI e suspensão bacteriana) e controle negativo (somente caldo BHI). Em seguida, as placas foram incubadas por 24h.

O crescimento bacteriano foi determinado pela presença de turbidez. A menor concentração do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e Isotiocianato de alilo necessária para inibir o crescimento de cada bactéria foi considerada o valor de CIM. A CBM foi determinada pela subcultura (100 µL) da amostra do poço transparente na placa de BHI ágar (apenas para *L. monocytogenes*) ou ágar nutriente. O valor da CBM foi estimado como a menor concentração que nenhum crescimento foi observado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.3.2 Interação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e isotiocianato de alilo

Para avaliar a ação combinada do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e Isotiocianato de alilo utilizou o método de *Checkboard* através da concentração inibitória fracional (CIF) (DAVIDSON; PARISH, 1989). Realizou o método bidimensional em placa de 96 poços, com combinações duplas do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e Isotiocianato de alilo, compreendendo: Óleo essencial de *Syzygium aromaticum*/Isotiocianato de alilo. Também foram incluídos poços de controle negativo (apenas o caldo BHI) e controle de crescimento (meio de cultura e suspensão bacteriana). As microplacas foram incubadas por 24 horas. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visual bacteriano.

O valor de CIM foi calculado da seguinte forma: CIF do composto A (CIF A) = CIM (A) em combinação / CIM (A) sozinho, CIF do composto B (CIF B) = CIM (B) em combinação / CIM (B) sozinho, onde A e B correspondem ao óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e Isotiocianato de alilo, respectivamente. O CIF da combinação (CIFI) foi calculado como a soma de cada CIF (CIF A+CIF B). Os resultados do *Checkboard* foram interpretados da seguinte forma: efeito sinérgico (CIFI ≤ 0.5); efeito aditivo (0.5 < CIFI ≤ 1); sem efeito interativo (1 < CIFI ≤ 4) e efeito antagônico (CIFI > 4) (NIKKHAH *et al.*, 2017).

3.3 Resultados

3.3.1 Composição química do Óleo Essencial de *Syzygium aromaticum*

Ao analisar a composição do óleo de *Syzygium aromaticum* por CG-EM foi possível observar 4 compostos (Tabela 1), sendo o composto majoritário o eugenol, corroborando com estudos anteriores (MA *et al.*, 2019; SANTAMARINA *et al.*, 2016; BUDRI *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Composição química (%) dos compostos identificados no óleo essencial de *Syzygium aromaticum* por CG/EM.

Composto	Tempo de retenção*	Área relativa (%)
Eugenol	25,182	91,28
Cariofileno	27,500	7,62
α -cariofileno	28,859	0,89
Patchoulano	33,940	0,21

*Tempo de retenção expresso em minutos.

Fonte: Autoria própria (2021).

Os principais compostos detectados foram o eugenol (91,28%) e o cariofileno (7,62%). Corroborando com os resultados do presente estudo, Radünz *et al.* (2019) ao analisarem a composição química do óleo essencial obtido a partir dos botões florais extraído utilizando o Clevenger, identificou a presença de três compostos terpênicos, eugenol (56,06%), cariofileno (39,63%) e α -cariofileno (4,31%).

Em seu estudo, Zhang *et al.* (2017) caracterizaram o eugenol como componente básico com um teor de 90,84% do óleo essencial de folha de cravo. Ao analisar a composição do óleo essencial da folha de cravo em várias fases de desenvolvimento Razafimamonjison *et al.* (2016) observaram diferentes quantidades de eugenol dependendo da fase de desenvolvimento que a folha se encontrava, variando entre 25,43 a 90,48%.

A variabilidade na quantidade de eugenol contido em diferentes óleos essenciais de cravo está associada a diferentes áreas de crescimento, clima, partes de plantas e métodos de extração (ZHANG *et al.*, 2017). O eugenol é um membro da classe de compostos químicos fenilpropanóides pode ser encontrado na composição

química de várias plantas, incluindo cravo, canela, folhas de tulsi, açafrão, pimenta, gengibre, orégano, tomilho, manjeriço, louro, manjerona, macis e noz-moscada (KHALIL *et al.*, 2017). Esse composto vem apresentando diversas atividades biológicas, como agentes bactericida, fungicida, virucida, inseticida, além de efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, anticancerígenos, antinociceptivos e antiespasmódicos (AHMAD *et al.*, 2021).

3.3.2 *Determinação da atividade antibacteriana do óleo essencial de Syzygium aromaticum e Isotiocianato de alilo*

3.3.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A alta incidência de patógenos na cadeia alimentar contribui para uma taxa de morbidade significativa. Os resultados encontrados neste estudo demonstram que o óleo essencial de cravo e o Isotiocianato de alilo possuem uma potencial atividade antimicrobiana frente as cepas patogênicas avaliadas (Tabela 2). Esses dados sugerem uma eficácia moderada a alta conforme preconizado por Ji *et al.* (2021), onde, os autores classificam a atividade antimicrobiana em três grupos, alta eficiência ($CIM \leq 625 \mu\text{g/mL}$), eficiência média ($625 < CIM \leq 2500 \mu\text{g/mL}$) e baixa eficiência ($CIM > 2500 \mu\text{g/mL}$). Além disso, vale ressaltar que esses dados demonstram que os compostos testados não apresentaram diferenças entre bactérias gram-positivas (*B. cereus* e *L. monocytogenes*) e gram-negativas (*E. coli* e *S. enterica*), demonstrando uma ampla atividade antibacteriana.

Tabela 2 – Valores de CIM dos compostos naturais frente as bactérias patogênicas avaliadas.

Microrganismos	Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>		Isotiocianato de alilo	
	CIM*	CBM*	CIM*	CBM*
<i>B. cereus</i>	1000	1000	625	1250
<i>E. coli</i>	2000	2000	2500	NE
<i>L. monocytogenes</i>	2000	NE	1250	NE
<i>S. enterica</i>	1000	1000	1250	NE

*Resultados expressos em µg/mL. NE: Resultados não encontrados nas concentrações testadas (8000 a 15,63 µg/mL para OEC e 5000 a 9,77 µg/mL para Isotiocianato de alilo); CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima.

Fonte: Autoria própria (2021).

Outros autores relataram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo. Imane *et al.* (2020) ao avaliarem o efeito antimicrobiano de óleo essencial de cravo frente a *S. aureus*, *S. aureus* NCTC 12493, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *E. coli*, observaram que o óleo foi capaz de inibir o crescimento de todas as bactérias testadas na concentração de 210 µg/mL. Budri *et al.* (2015) obtiveram uma variação de CIM de 237 a 390 µg/mL, frente a diferentes cepas de *S. aureus*. Radünz *et al.* (2019) em seus experimentos observou efeito inibitório de óleo essencial de cravo foi a concentração de 304 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*.

Burt (2004) sugere que a atividade antimicrobiana do óleo essencial pode estar relacionada à configuração química dos componentes, às proporções em que estão presentes e às interações entre eles, entretanto, quando avaliamos este efeito do óleo essencial acreditamos que é proveniente do seu composto majoritário (eugenol). Dando suporte a esta afirmação Moon *et al.* (2011) ao investigarem o efeito antibacteriano do óleo essencial de cravo e eugenol relataram nenhuma diferença entre eles, o que justifica a atividade antimicrobiana encontrada no presente estudo. Nazzaro *et al.* (2013) descreve que a atividade antimicrobiana deste composto pode ser atribuída à presença de dupla ligações nas posições α , β da cadeia lateral e a um grupo metil localizado na posição γ . O eugenol altera a membrana, afeta o transporte de íons e ATP e altera o perfil de ácidos graxos de diferentes bactérias. Ainda, atua contra diferentes enzimas bacterianas, incluindo

ATPase, histidina carboxilase, amilase e protease. Os mesmos autores salientam que a atividade antimicrobiana dos OEs depende de sua composição química, os quais diferentes compostos podem afetar sua atividade, por isso, a atividade antimicrobiana não é atribuível a um mecanismo único, mas, em vez disso, é atribuível a um conjunto de reações envolvendo a célula bacteriana.

O isotiocianato de alilo apresentou uma CIM entre 625 a 2500 µg/mL no nosso estudo, ou seja, uma alta variabilidade frente a diferentes bactérias patogênicas. Nos experimentos realizados por Olaimat e Holley (2013), os observaram que o pH interfere na estabilidade de isotiocianato de alilo e, portanto, sua atividade antimicrobiana. Esses mesmos autores avaliaram que o Isotiocianato de alilo foi mais estável e eficaz contra *Salmonella* em pH ácido, entretanto, a degradação do Isotiocianato em pH neutro favoreceu a formação de compostos que possuem atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. Ainda, nos experimentos realizados por Luciano e Holley (2009), os autores observaram uma maior atividade antimicrobiana em baixos valores de pH frente a *E. coli* O157: H7, em pH 8,5 o valor de CIM obtido foi 20 vezes maior que o observado em pH 4,5 e 5,5.

Dufour, Stahl e Baysse (2015) sugerem que os efeitos antimicrobianos dos isotiocianatos é devido se acumularem em algumas bactérias como glutadiona, pequenos grupos de glicosídeos que atacam o centro ativo de enzimas ligando-se ao tiol ou grupos amina, acarretando em impactos em atividades enzimáticas, como respiração, metabolismo e transcrição de genes.

3.3.2.2 Interação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e isotiocianato de alilo

Por meio do ensaio *checkboard* foi possível avaliar o efeito das combinações entre o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e o isotiocianato da alilo. Os resultados demonstram uma ação aditiva (Tabela 3) conforme preconizado por Nikkah *et al.* (2017), valores de CIFI entre 0,5 e 1. Resultados semelhantes foram relatados por Clemente *et al.* (2016) ao avaliar a atividade antibacteriana do isotiocianato de alilo em combinação com óleo essencial de canela frente a nove cepas de bactérias de origem alimentar, onde, observaram na maioria dos casos a

combinação gerou um efeito aditivo frente aos microrganismos avaliados, exceto para *Pseudomonas putida*, para a qual a combinação apresentou efeito sinérgico.

Tabela 3 – Valores de CIF da combinação dos compostos naturais frente as bactérias patogênicas avaliadas.

Microrganismos	CIM A (sozinho)*	CIM B (sozinho)*	CIM A (na presença de B)*	CIM B (na presença de A)*	CIFI
<i>B. cereus</i>	1000	625	500	156,25	0,75
<i>E. coli</i>	2000	2500	500	1250	0,75
<i>L. monocytogenes</i>	2000	1250	500	625	0,75
<i>S. enterica</i>	1000	1250	500	19,53	0,52

*Resultados expressos em µg/mL. CIM: Concentração inibitória mínima; CIFI: Concentração inibitória fracional.

Fonte: Aatoria própria (2021).

Lu *et al.* (2011) avaliaram em seus experimentos a atividade antibacteriana da combinação de óleo essencial de cravo e de óleo essencial de canela pelo método de *checkboard*, os resultados obtidos demonstraram um efeito aditivo da combinação frente a *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, e um efeito indiferente contra *E. coli* e *S. typhimurium*. Goñi *et al.* (2009) ao avaliar a combinação de óleos essenciais de canela e cravo em fase vapor, os autores afirmam que os vapores da combinação de óleos essenciais exerceram um efeito antagônico no crescimento de *E. coli* e apresentaram um efeito sinérgico para a inibição de *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *Yersinia enterocolitica*. O efeito aditivo entre o óleo essencial de cravo e o isotiocianato de alilo provavelmente é atribuído não apenas a um mecanismo específico pois ambos os compostos possuem vários alvos na célula bacteriana, tais como alteração na membrana, afetando transporte de íons e ATP e, ataques aos sítios ativos enzimáticos ocasionando impactos nas suas atividades no processo metabólico e transcrição de genes, pelo Eugenol e Isotiocianato de alilo, respectivamente. Esses efeitos possibilitam obter a atividade antibacteriana em menores concentrações do que quando utilizados sozinhos, aumentando a viabilidade de uso pela redução dos impactos sensoriais e minimização de custos.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram concluir que o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e o isotiocianato de alilo possuem um potencial efeito antimicrobiano, tendo sua eficácia de moderada a alta. Os compostos possivelmente agem por diferentes mecanismos de ação, que quando utilizados em combinação interagiram e apresentaram um efeito aditivo na inibição das cepas patogênicas. Estes resultados demonstram que é possível atingir uma atividade antibacteriana em menores concentrações dos compostos do que quando utilizados sozinhos, aumentando a viabilidade de uso pela indústria alimentícia, devido a redução dos custos e minimização de impactos sensoriais.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMID, A. G.; EL-DOUGGDOUG, N. K. Controlling foodborne pathogens with natural antimicrobials by biological control and antivirulence strategies. **Heliyon**, v. 6, Set. 2020. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2405844020318636?via%3Dihub>. Acesso em: 4 out. 2020.
- ADAMS, R. P. 2007. Identification of essential oil by gas chromatography / mass spectrometry. **Allured Publishing**, Carol Stream, Illinois. 4th Edition, 804.
- AGASAN, A.; KORNBLUM, J.; WILLIAMS, G.; PRATT, C.; FLECKENSTEIN, P.; WONG, M.; RAMON, A. Profile of *Salmonella enterica* subsp. enterica (Subspecies I) Serotype 4,5,12: i – Strains Causing Food-Borne Infections in New York City. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 6 p. 1924, Jun. 2002. Disponível em: <https://jcm.asm.org.ez48.periodicos.capes.gov.br/content/40/6/1924>. Acesso em: 10 out. 2020.
- AHMAD, A.; ELISHA, I. L.; VUUREN, S. V.; VILJOEN, A.; Volatile phenolics: A comprehensive review of the anti-infective properties of an important class of essential oil constituents. **Phytochemistry**, v. 190, Out. 2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942221002132?casa_token=y8-40kOKhccAAAAA:NdoLpAEBQofHdardnYkp5C_v2DFrblcw4mK30bX1nK8xSlq7DUOR3nj0T5pWDDmuJCVEeCgw#bib84. Acesso em: 17 nov. 2021.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 465, Jul. 2014. Disponível em: <https://go-gale.ez48.periodicos.capes.gov.br/ps/i.do?p=AONE&u=capes&id=GALE|A375585506&v=2.1&it=r>. Acesso em: 6 out. 2020.
- ANDINO, A.; HAMMING, I. *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. **The Scientific World Journal**, v. 2015, Jan. 2015. Disponível em: <https://www-ncbi-nlm-nih.ez48.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC4310208/>. Acesso em: 24 set. 2020.
- ANTONELLI, P.; BELLUCO, S.; MANCIN, M.; LOSASSO, C.; RICCI, A. Genes conferring resistance to critically important antimicrobials in *Salmonella enterica* isolated from animals and food: A systematic review of the literature, 2013–2017. **Research in Veterinary Science**, v. 126, p.59, Out. 2019. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0034528819303996?via%3Dihub>. Acesso em: 28 set. 2020
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**. Brasília, 2012. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt->

br/centraisdeconteudo/publicacoes/alimentos/relatorio-prebaf-programa-nacional-de-monitoramento-da-prevalencia-e-da-resistencia-bacteriana-em-frango.pdf/view. Acesso em: 28 set. 2020.

ARAÚJO, M. K., GUMIELA, A. M., BORDIN, K., LUCIANO, F. B., MACEDO, R. E. F., Combination of garlic essential oil, allyl isothiocyanate, and nisin Z as bio-preservatives in fresh sausage. **Meat Science**, v. 143, p. 177, Set. 2018. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0309174018300317?via%3Dihub>. Acesso em: 22 out. 2020.

ARNESEN, L. P. S., FAGERLUND, A., GRANUM, P. E., From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 579, Jul. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>. Acesso em: 25 nov. 2021.

ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in food science & technology**, v. 48, p. 51, Fev. 2016. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0924224415300960?via%3Dihub>. Acesso em: 29 ago. 2020.

AZCARATE-PERIL, M.; BURTZ, N.; CADENAS, M.; KOCI, M.; BALLOU, A.; MENDOZA, M.; ALI, R.; HASSAN, H. An Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain and Galacto-Oligosaccharides Accelerate Clearance of *Salmonella* Infections in Poultry through Modifications to the Gut Microbiome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, Mar 2018. Disponível em: <https://aem.asm.org.ez48.periodicos.capes.gov.br/content/84/5/e02526-17>. Acesso em: 2 out. 2020.

BAHRAMI, A.; BABOLI, Z. M.; SCHIMMEL, K.; JAFARI, S. M.; WILLIAMS, L. Efficiency of novel processing technologies for the control of *Listeria monocytogenes* in food products. **Trends in food science & technology**, v. 96, p. 61, Fev. 2020. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0924224419303929?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jun. 2020.

BALAGUER, M. P.; LOPEZ-CARBALLO, G.; CATALA, R.; GAVARA, R.; HERNANDEZ-MUNOZ, P. Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. **International journal of food microbiology**, v. 166, p. 369, Set. 2013. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160513003863?via%3Dihub>. Acesso em: 19 mai. 2020.

BAO, H.; WANG, S.; ZHAO, J.; LIU, S. *Salmonella* secretion systems: Differential roles in pathogen-host interactions. **Microbiological research**, v. 241, Dez. 2020. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0944501320304596?via%3Dihub>. Acesso em: 24 set. 2020.

BEHBAHANI, A.; NOSHAD, M.; FALAH, F. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. **Microbial pathogenesis**, v. 136, Nov. 2019. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0882401019314020?via%3Dihub>. Acesso em: 29 ago. 2020

BRITANNICA ACADEMIC. Listeriosis. **Encyclopædia Britannica**, Inc., Ago. 2008a. Disponível em: <https://academic-britannica.ez48.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/listeriosis/4850>. Acesso em: 22 out. 2020.

BRITANNICA ACADEMIC. Salmonellosis. **Encyclopædia Britannica**, Inc., Ago. 2008b. Disponível em: <https://academic-britannica.ez48.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/salmonellosis/65110>. Acesso em: 22 out. 2020.

BRITANNICA ACADEMIC. Mustard. **Encyclopædia Britannica**, Inc., Jan. 2020. Disponível em: <https://academic-britannica.ez48.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/mustard/54478>. Acesso em: 22 out. 2020.

BRITANNICA ACADEMIC. Clove. **Encyclopædia Britannica**, Inc., Mai. 2019. Disponível em: <https://academic-britannica.ez48.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/clove/24454>. Acesso em: 22 out. 2020.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 10, p. 221, Jul. 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>. Acesso em: 7 out. 2020.

BUDRI, P. E.; SILVA, N. C. C.; BONSAGLIA, E. C. R.; FERNANDES, A.; ARAÚJO, J. P.; DOYAMA, J. T.; GONÇALVES, J. L.; SANTOS, M. V.; FITZGERALD-HUGHES, D.; RALL, V. L. M. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. **Journal of dairy Science**, v. 98, p. 5899, Set. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215004506>. Acesso em: 22 nov. 2021.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223, Ago. 2004. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504001680?casa_token=2AHhw31HGi0AAAAA:5GQA4uJpBoPj0A9IKmoQ0j4KQlvss3SoC72p9F-Eas50p71MRvAzLbtDgytQloxqzGWFM6Y_#BIB118. Acesso em: 24 nov. 2021.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: Quo vadis?. **Trends in food science & technology**, v. 45, p. 284, Out. 2015. Disponível

em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0924224415001508?via%3Dihub>. Acesso em: 10 out. 2020.

CHANG, T.; ROSCH, J. W.; GU, Z.; HAKIM, H.; HEWITT, C.; GAUR, A.; WU, G.; HAYDEN, R. T. Whole-Genome Characterization of *Bacillus cereus* Associated with Specific Disease Manifestations. **Infection and immunity**, v. 86, Fev. 2018. Disponível em: <https://journals-asm-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1128/IAI.00574-17>. Acesso em: 11 nov. 2021.

CHARLIER, C.; PERRODEAU, É.; LECLERCQ, A.; CAZENAVE, B.; PILMIS, B.; HENRY, B.; LOPES, A.; MAURY, M. M.; MOURA, A.; GOFFINET, F.; DIEYE, H. B.; THOUVENOT, P.; MONALISA STUDY GROUP (Corporate Author). Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, p. 510, Mai. 2017. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1473309916305217?via%3Dihub#!>. Acesso em: 10 out. 2020.

CHEKABAB, S. M.; PAQUIN-VAILLETTE, J.; DOZOIS, C. M.; HAREL, J. The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. **FEMS microbiology letters**, v. 341, p. 1, Abr. 2013. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/341/1/1/498283?login=true>. Acesso em: 14 nov. 2021.

CLEMENTE, I.; AZNAR, M.; SILVA, F.; NERÍN, C. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 36, p. 26, Ago. 2016. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S146685641630100X?via%3Dihub>. Acesso em 19 mai. 2020.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. **Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice**. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, v. 4, p. 90, Fev. 2014. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2221169115301763?via%3Dihub>. Acesso em: 30 ago. 2020.

DAVIDSON P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of antimicrobials. **Food Technology**. v. 52, p. 148-154, 1989

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 101, Mar. 2002. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160501007346?via%3Dihub>. Acesso em: 29 ago. 2020.

DENG, Y.; LIU, Y.; JIANG, Z.; WANG, J.; ZHANG, Q.; QIAN, Y.; YUAN, Y.; ZHOU, X.; FAN, G.; LI, Y. A multiplex loop-mediated isothermal amplification assay for rapid

detection of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. **BioScience Trends**, v. 13, p. 510, Dez. 2019.

DUFOUR, V.; STAHL, M.; BAYSSE, C. The antibacterial properties of isothiocyanates. **Microbiology Society**, v. 161, Fev. 2015. Disponível em: https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.082362-0#metrics_content. Acesso em: 24 nov. 2021.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**, v. 16, Dez. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.ez48.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC7009540/>. Acesso em: 2 out. 2020.

FANG, F. C.; FRAWLEY, E. R.; TAPSCOTT, T.; VÁZQUEZ-TORRES, A. Bacterial Stress Responses during Host Infection. **Cell host & microbe**, v. 20, p. 133, Ago. 2016. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1931312816303080?via%3Dihub>. Acesso em: 24 set. 2020.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. **Laboratory Methods - BAM: Diarrheagenic Escherichia coli**. 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4a-diarrheagenic-escherichia-coli#fn28>. Acesso em: 15 no. 2021.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography**, v. 1250, p. 34, Ago. 2012. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0021967312006437?via%3Dihub>. Acesso em: 8 out 2020.

FRANZ, C. M. A. P.; BESTEN, H. M. W.; BÖHNLEIN, C. GAREIS, M.; ZWIETERING, M. H.; FUSCO, V. Microbial food safety in the 21st century: Emerging challenges and foodborne pathogenic bacteria. **Trends in food science & technology**, v. 81, p. 155, Nov. 2018. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0924224417303801?via%3Dihub>. Acesso em: 14 jun. 2020.

FROHLICH, P. C.; SANTOS, K. A.; PALÚ, F.; CARDOZO-FILHO, L.; SILVA, C.; SILVA, E. A. Evaluation of the effects of temperature and pressure on the extraction of eugenol from clove (*Syzygium aromaticum*) leaves using supercritical CO₂. **The Journal of supercritical fluids**, v. 143, p. 313, Jan. 2019. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0896844618304674?via%3Dihub>. Acesso em: 31 ago. 2020.

GALÁN, J. E. SALMONELLA INTERACTIONS WITH HOST CELLS: Type III Secretion at Work. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 171, p. 53, 2001. Disponível em: <http://web-b->

ebscohost.ez48.periodicos.capes.gov.br/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=637b3e5f-ce15-4a8d-8777-56e387e626cc%40pdc-v-sessmgr04. Acesso em: 2 out. 2020.

GAO, T.; DING, Y.; WU, Q.; WANG, J.; ZHANG, J.; YU, S.; YU, P.; LIU, C.; KONG, L.; FENG, Z.; CHEN, M.; WU, S.; ZENG, H.; WU, H. Prevalence, Virulence Genes, Antimicrobial Susceptibility, and Genetic Diversity of *Bacillus cereus* Isolated From Pasteurized Milk in China. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 533, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00533/full>. Acesso em: 11 nov. 2021.

GELBÍČOVÁ, T.; KARPÍŠKOVÁ, R. Occurrence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food from retail market in the Czech Republic. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, p. S23, 2009. Disponível em: https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/210_2009-CJFS.pdf. Acesso em: 29 ago. 2020.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food chemistry**, v. 116, p. 982, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0308814609003689?via%3Dihub>. Acesso em: 30 ago. 2020. 32

GUILLÉN, S.; MARCÉN, M.; MAÑAS, P.; CEBRIÁN, G. Differences in resistance to different environmental stresses and non-thermal food preservation technologies among *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains. **Food research international**, v. 132, Jun. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0963996920300673?via%3Dihub>. Acesso em: 22 set. 2020.

GÜLLÜCE, M., SÖKMEN, M., SAHIM, F., SÖKMEN, A., ADIGÜZEL, A., ÖZER, H. Biological activities of the essential oil and methanolic extract of *Micromeria fruticosa* (L) Druce ssp *serpyllifolia* (Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 735, Mai. 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/jsfa.1728>. Acesso em: 22 out. 2020.

GYAWALI, R.; HAYEK, S. A.; IBRAHIM S.A, Plant extracts as antimicrobials in food products: types. **Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**, 2015a.

GYAWALI, R.; HAYEK, S. A.; IBRAHIM S.A, Plant extracts as antimicrobials in food products: mechanisms of action, extraction methods, and applications. **Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**, 2015b.

HALBEDEL, S.; PRAGER, R.; BANERJI, S.; KLETA, S.; TROST, E.; NISHANTH, G.; ALLES, G.; HÖLZEL, C.; SCHLESIGER, F.; PIETZKA, A.; SCHLÜTER, D.; FLIEGER, A. A *Listeria monocytogenes* ST2 clone lacking chitinase ChiB from an outbreak of non-invasive gastroenteritis. **Emerging microbes & infections**, v. 8, p. 17, Jan. 2019. Disponível em: <https://www->

tandfonline.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1080/22221751.2018.1558960?rbrVersion=2. Acesso em: 22 out. 2020.

HAN, S.; HU, W.; KAN, W.; GE, Z.; SONG, X.; LI, L.; SHANG, Y.; ZENG, Q.; ZHOU, J. Analyses of genetics and pathogenesis of *Salmonella enterica* QH with narrow spectrum of antibiotic resistance isolated from yak. **Infection, genetics and evolution**, v. 82, Ago. 2020. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1567134820301246?via%3Dihub>. Acesso em: 29 set. 2020.

IMANE, N. I.; FOUZIA, H.; AZZAHRA, L. F.; AHMED, E.; ISMAIL, G.; IDRISSE, D.; MOHAMED, K. H.; SIRINE, F.; L'HOUCINE, O.; NOUREDDINE, B. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against multidrug resistant bacteria. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 35, Abr. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876382019314131>. Acesso em: 14 nov. 2021.

ISSHIKI, K.; TOKUOKA, K.; MORI, R.; CHIBA, S. Preliminary Examination of Allyl Isothiocyanate Vapor for Food Preservation. **Bioscience, biotechnology and biochemistry**, v. 56, p. 1476, Jan. 1992. Disponível em: <https://www-tandfonline.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/pdf/10.1271/bbb.56.1476?needAccess=true>. Acesso em: 11 out. 2020.

JANG, J.; HUR, ; H. -G.; SADOWSJY, M. J.; BYAPPANAHALLI, M. N.; YAN, T.; ISHII, S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. **Journal of applied microbiology**, v. 123, p. 570, Set. 2017. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.13468>. Acesso em: 14 nov. 2021.

JI, J.; SHANKAR, S.; FERNANDEZ, J.; JUILLET, E.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. A rapid way of formulation development revealing potential synergic effects on numerous antimicrobial combinations against foodborne pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, Set. 2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401021003193?casa_token=ef-6el9ZulwAAAAA:y1dw5kBihkdPU8ZR9Ch3jFEcrhDqi692OfRLx8ZpLInqCbbrTjxF7tLrtoNjJCuKnImedzE#bib14. Acesso em: 20 nov. 2021.

KAMATOU, G.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. Eugenol-From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. **Molecules**, v. 17, p. 6953, 2012. Disponível em: <https://www-ncbi-nlm-nih.ez48.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC6268661/>. Acesso em: 13 jul. 2020.

KHALIL, A. A.; RAHMAN, U.; KHAN, M. R.; SAHAR, A.; MEHMOOD, T.; KHAN, M. Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. **RSC Advances**, v. 7, p. 32669, 2017.

KHORSHIDIAN, N.; YOUSEFI, M.; KHANNIRI, E.; MORTAZAVIAN, A. M. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Inovative food**

science & emerging technologies, v. 45, p. 62, Fev. 2018. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1466856417303211?via%3Dihub>. Acesso em: 8 out. 2020.

KOCOT, A. M.; OLSZEWSKA, M. A. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. **Food science & technology**, v. 84, p. 47, Out. 2017. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0023643817303572?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jun. 2020.

KORDALI, S.; KESDEK, M.; CAKIR, A. Toxicity of monoterpenes against larvae and adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). **Industrial crops and products**, v. 26, p. 278, 2007. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0926669007000489?via%3Dihub>. Acesso em: 11 out. 2020.

LEPE, J. A. Current aspects of listeriosis. **Medicina clínica**, v. 154, p. 453, Jun. 2020. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0025775320301354?via%3Dihub>. Acesso em: 4 out. 2020.

LU, F.; DING, Y.; YE, X.; DING, Y. Antibacterial Effect of Cinnamon Oil Combined with Thyme or Clove Oil. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, p. 1482, Set. 2011. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1671292711601429>. Acesso em: 23 nov. 2021.

LUCIANO, F. B.; HOLLEY, R. A. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. **International journal of food microbiology**, v. 131, p. 240, 2009. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S016816050900155X?via%3Dihub>. Acesso em: 20 mai. 2020.

MA, Y.; XU, F.; CHEN, C.; LI, Q.; WANG, M.; CHENG, Y.; DONG, X. The beneficial use of essential oils from buds and fruit of *Syzygium aromaticum* to combat pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. **Industrial crops and products**, v. 133, p. 185, Jul. 2019, Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0926669019301864?via%3Dihub>. Acesso em: 22 nov. 2021.

MARROLLO, R. Chapter 1 - Microbiology of *Bacillus cereus*. **The Diverse Faces of Bacillus cereus**, 2016.

MCNEILL, C.; SISSON, W.; JARRETT, A. Listeriosis: A Resurfacing Menace. **Journal for nurse practitioners**, v. 13, p. 647, Nov. 2017. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1555415517307766>. Acesso em: 4 out. 2020.

MEIRA, N. V. B.; HOLLEY, R. A.; BORDIN, K.; MACEDO, R. E. F.; LUCIANO, F. B. Combination of essential oil compounds and phenolic acids against *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and in dry-fermented sausage production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 260, p. 59, Nov. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160517303458?casa_token=yqSaAnN6QCAAAAAA:DZUYOTC_K9XzZ7Vn4wLkVCKUi71qOOilxg_tghYhap1cxUZBi4PNvRi0Gqm1get2s8ANSXlg#!. Acesso em: 14 nov. 2021.

MOON, S., KIM, H., CHA, J. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 56, p. 907, Set. 2011.

MÜLLER, J. SPRIEWALD, S.; STECHER, B.; STADLER, E.; FUCHS, T. M. Evolutionary Stability of Salmonella Competition with the Gut Microbiota: How the Environment Fosters Heterogeneity in Exploitative and Interference Competition. **Journal of molecular biology**, v. 431, p. 4732, Nov. 2019. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0022283619304164?via%3Dihub>. Acesso em: 29 set. 2020.

NAZARETH, T. M.; ALONSO-GARRIDO, M.; STANCIU, O.; MAÑES, J.; MANYES, L.; MECA, G. Effect of allyl isothiocyanate on transcriptional profile, aflatoxin synthesis, and *Aspergillus flavus* growth. **Food research international**, v. 128, Fev. 2020. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0963996919306726?via%3Dihub>. Acesso em: 30 ago. 2020.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., MARTINO, L., COPPOLA, R., FEO, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals (Bassel)**, Dez. 2013.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. **NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International journal of food microbiology**, v. 156, p. 7, Mai. 2012. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160512001250?via%3Dihub>. Acesso em: 29 ago. 2020.

NGUEFACK, J., LEKAGNE DONGMO, J. B., DAKOLE, C. D., LETH, V., VISMER, H. F., TORP, J., GUEMDJOM, E. F. N., MBEFFLO, M., TAMQUE, O., FOTIO, D., AMVAM ZOLLO, P. H., NKENGFACK, A. E. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 151, Mai. 2009. Disponível em: <https://wwwsciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S016816050900107X?via%3Dihub>. Acesso em: 23 nov. 2021

NIKKAH, M., HASHEMI, M., NAJAFI, M. B. H., FARHOOSH, R. Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 294, Set. 2017. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160517302891?via%3Dihub>. Acesso em: 22 out 2020.

ODONKOR, S. T.; AMPOFO, J. K. *Escherichia coli* as An Indicator of Bacteriological Quality of Water: An Overview. **Microbiology research**, v. 4, p. 5, 2013. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2036-7481/4/1/e2>. Acesso em 14 nov. 2021.

OLAIMAT, A. N., HOLLEY, R. A. Effects of changes in pH and temperature on the inhibition of Salmonella and Listeria monocytogenes by Allyl isothiocyanate. **Food Control**, v. 34, Dez. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713513002557>. Acesso em: 25 nov. 2021.

OLIVEIRA, M. S.; COSTA, W. A.; PEREIRA, D. S.; BOTELHO, J. R. S.; MENEZES, T. O. A.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, S. H. M.; SOUZA FILHO, A. P. S.; CAVALHO JUNIOR, R. N.; Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO₂. **The Journal of supercritical fluids**, v. 118, p. 185, Dez. 2016. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0896844616302534?via%3Dihub>. Acesso em: 9 out. 2020.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; ALVEZ, E.; PICCOLI, R. H. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian journal of microbiology**, v. 41, p. 97, Mar. 2010. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822010000100016&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 15 jun. 2020.

OOI, S. T.; LORBER, B. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1327, Mai. 2005. Disponível em: <https://academic-oup-com.ez48.periodicos.capes.gov.br/cid/article/40/9/1327/371654>. Acesso em: 10 out. 2020.

OWUSU-KWARTENG, J.; WUNI, A.; FORTUNE, A.; TANO-DEBRAH, K.; JESPERSEN, L. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from dairy farms and traditional dairy products. **BMC microbiology**, v. 17, p. 65, Mar, 2017. Disponível em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-0975-9>. Acesso em: 11 de nov. de 2021.

ÖZCAN, M. M.; ARSLAN, D. Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. **Food chemistry**, v. 129, p. 171, Nov. 2011. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0308814611001427?via%3Dihub>. Acesso em: 30 ago. 2020.

PEXERA, A.; GOVARIS, A. *Bacillus cereus*: an important foodborne pathogen. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 61, 2010.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; GEORGESCU, C.; TURCUȘ, V.; OLAH, N. K.; MATHE, E. An overview of natural antimicrobials role in food. **European journal of medicinal chemistry**, v. 143, p. 922, Jan. 2018. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0223523417309984?via%3Dihub>. Acesso em: 28 ago. 2020.

PORTER, J. A.; MOREY, A.; MONU, E. A. Antimicrobial efficacy of white mustard essential oil and carvacrol against Salmonella in refrigerated ground chicken. **Poultry science**, v. 99, p. 5091, Out. 2020. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0032579120303898?via%3Dihub>. Acesso em: 29 ago. 2020.

RADÜNZ, M.; TRINDADE, M. L. M.; CAMARGO, T. M.; RADÜNZ, A. L.; BORGES, C. D.; GANDRA, E. A.; HELBIG, E. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food chemistry**, v. 276, p. 180, Mar. 2019. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0308814618317588>. Acesso em: 13 nov. 2021.

RANI, A.; RAVINDRAN, V. B.; SURAPANENI, A.; MANTRI, N.; BALL, A. S. Review: Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water. **International journal of food microbiology**, v. 349, p. 109233, Jul. 2021. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160521001926?via%3Dihub#bb0255>. Acesso em: 14 nov. 2021.

RAZAFIMAMONJISON, G.; BOULANGER, R.; JAHIEL, M.; RAMANOELINA, P.; FAWBUSH, F.; LEBRUN, M.; DANTHU, P. Variations in yield and composition of leaf essential oil from *Syzygium aromaticum* at various phases of development. **International Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, p. 90, 2016.

ROHANI, S. M. R.; MORADI, M.; MEHDIZADEH, T.; SAEI-DEHKORDI, S. S.; GRIFFITHS, M. W. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Food science & technology**, v. 44, p. 2260, Dez. 2011. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0023643811002210?via%3Dihub>. Acesso em: 9 jun. 2020.

ROHATGI, A.; GUPTA, P. Natural and synthetic plant compounds as anti-biofilm agents against *Escherichia coli* O157:H7 biofilm. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 95, Nov. 2021. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1567134821003531?via%3Dihub>. Acesso em: 14 nov. 2021.

SANTAMARINA, M. P.; ROSELLÓ, J.; GIMÉNEZ, S.; BLÁZQUEZ, M. A. Commercial *Laurus nobilis* L. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against post-harvest phytopathogenic fungi on rice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 325, Jan. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815301341?casa_token=sc5wuPIBVMUAAAAA:CvII9bYbxf1P4f2-5jN66BbgelEPcmmgWW-qINvDy6WYR9tQRAXju9b321cH2Xw6sKqUXmJS. Acesso em: 22 de nov. 2021.

SCHWARZ, K.; BERTELSEN, G.; NISSEN, L. R.; GARDNER, P. T.; HEINONEN, M. I.; HOPIA, A.; HUYNH-BA, T.; LAMBELET, P.; MCPHAIL, D.; SKIBSTED, L. H.; TIJBURG, L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. **European Food Research and Technology**, v. 212, p. 319, 2001. Disponível em: <https://link-springer-com.ez48.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s002170000256>. Acesso em: 7 out. 2020.

SHAH, M. A.; BOSCO, S. J. D.; MIR, S. A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat science**, v. 98, p. 21, Set. 2014. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0309174014001089?via%3Dihub>. Acesso em: 7 out. 2020.

SILVESTRE, W. P.; LIVINALI, N. F.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C. Pervaporation in the separation of essential oil components: A review. **Trends in food science & technology**, v. 93, p. 42, Nov. 2019. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0924224419304212?via%3Dihub>. Acesso em: 8 out. 2020.

SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D. I.; GARDINI, F.; LANCIOTTI, R. Innovative strategies based on the use of bio-control agents to improve the safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. **Trends in food science & technology**, v. 46, p. 302, Dez. 2015. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0924224415001211?via%3Dihub>. Acesso em: 29 ago. 2020.

SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of Salmonella enterica to environmental stresses. **Food research international**, v. 45, p. 455, Mar. 2012. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S096399691100439X?via%3Dihub>. Acesso em: 24 set. 2020.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **International journal of food microbiology**, v. 78, p. 31, Set. 2002. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160502002325?via%3Dihub>. Acesso em: 10 out. 2020.

WANG, Y.; GUO, F.; WEI, J.; ZHANG, Y.; LIU, Z.; HUANG, Y. Knowledge, attitudes and practices in relation to antimicrobial resistance amongst Chinese public health undergraduates. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 23, p. 9, Dez 2020. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2213716520301995?via%3Dihub>. Acesso em: 10 out. 2020.

WEISS, J.; GIBIS, M.; SCHUH, V.; SALMINEN, H. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. **Meat science**, v. 86, p. 196, Set. 2010. Disponível em: <https://www->

sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0309174010001853?via%3Dihub. Acesso em: 7 out. 2020

WHO – World Health Organization. **E. coli**. World Health Organization, Fev. 2018a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>. Acesso em: 15 nov. 2021

WHO – World Health Organization. **Listeriosis**. World Health Organization, Fev. 2018b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>. Acesso em 22 out. 2020

WHO – World Health Organization. **Salmonella (non-typhoidal)**. World Health Organization, Fev. 2018c. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: 22 out 2020

WHO – World Health Organization. **Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015**. World Health Organization, Dez. 2015. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1. Acesso em: 5 out. 2020.

XIE, Y.; WANG, Z.; HUANG, Q.; ZHANG, D. Antifungal activity of several essential oils and major components against wood-rot fungi. **Industrial crops and products**, v. 108, p. 278, Dez. 2017. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0926669017304272?via%3Dihub>. Acesso em: 8 out. 2020.

YAZGAN, H. Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. **Food science & technology**, v. 130, Ago. 2020. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0023643820306587?via%3Dihub>. Acesso em: 29 ago. 2020.

YOUSEF, A. E.; ABDELHAMID, A. G. Factors of Special Significance to Food Microbiology. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 5th Ed., 2019.

ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHU, X.; CAO, P.; WEI, S.; LU, Y. Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 396, Dez. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017311956?casa_token=82JcxIcnWtwAAAAA:zVsOUlrgPC6Prkc8NRBELxpqqCkZq6Lafh9BWX920jXCNKtqAQ6t67Z3c7OIWfnp7GKmYJq4e. Acesso em: 13 nov. 2021.

ZHAO, S., CHEN, J., FEI, P., FENG, H. WANG, Y., ALI, M. A., LI, S., JING, H., YANG, W. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from dairy products in China. **Journal of Dairy Science**, v. 103, Mai. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030220301533>. Acesso em: 25 nov. 2021.