



JOSSANA PEREIRA DE SOUSA

APLICAÇÃO DOS FITOCONSTITUINTES CARVACROL E 1,8-CINEOL COMO SANITIZANTES NATURAIS EM HORTALIÇAS
FOLHOSAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

RECIFE

2012



JOSSANA PEREIRA DE SOUSA

**APLICAÇÃO DOS FITOCONSTITUINTES CARVACROL E 1,8-CINEOL COMO SANITIZANTES NATURAIS EM HORTALIÇAS
FOLHOSAS MINIMAMENTE PROCESSADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Nutrição, com área de concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

Co-orientador (a): Prof.^a Dr.^a Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

RECIFE

2012

Sousa, Jossana Pereira de

Aplicação dos fitoconstituíntes carvacrol e 1,8-cineol como sanitizantes naturais em hortaliças folhosas minimamente processadas / Jossana Pereira de Sousa. – Recife: O Autor, 2012.

119 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Evandro Leite de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2012.

Inclui bibliografia, anexos e apêndice.

1. Compostos orgânicos. 2. Monoterpenos.
3. Sinergismo farmacológico. 4. Sobrevivência celular. 5. Hortaliças – processamento. I. Souza, Evandro Leite de. II. Título.

JOSSANA PEREIRA DE SOUSA

**APLICAÇÃO DOS FITOCONSTITUINTES CARVACROL E 1,8-CINEOL
COMO SANITIZANTES NATURAIS EM HORTALIÇAS FOLHOSAS
MINIMAMENTE PROCESSADAS**

Dissertação aprovada em: 03 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Tânia Lúcia M. Stamford

Professora Doutora Tânia Lúcia Montenegro Stamford – UFPE

Coordenador da Banca Examinadora

Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

Professora Doutora Margarida Angélica da Silva Vasconcelos – UFPE

Examinador Interno

Roberta Bento

Professora Doutora Roberta Albuquerque Bento – CAV/UFPE

Examinador Externo

RECIFE

2012

*A Deus, a quem devo tudo que tenho e que
sou;*

*Aos meus pais, Freitas e Elba, razão da
minha vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder força e coragem para correr atrás dos meus objetivos, por me proteger, me abençoar e me guiar em todos os momentos da minha vida, principalmente nos de dificuldade;

Aos meus pais João Everaldo Freitas de Sousa e Elba Pereira de Sousa pelo amor incondicional, carinho, dedicação, apoio e por todo o sacrifício despendido para me propiciar uma educação de qualidade;

À minha irmã Jossaria que está sempre ao meu lado, me auxiliando, me incentivando, dizendo que sou seu exemplo de determinação, minha companheira de todas as horas, aquela que aguenta meus estresses e minhas chatices, e ao meu irmão Joeldson que sempre me ajudou quando precisei;

Aos meus avós e padrinhos, José Pereira (*in memorian*) e Edite Bernardo, pelo amor imensurável, carinho, e pelos cuidados, principalmente durante minha infância;

Ao meu namorado Rhavy Maia, pela compreensão, amor, torcida, incentivo, paciência, pelo apoio em todos os momentos em que precisei, e por estar comigo SEMPRE;

Ao Professor Doutor Evandro Leite de Souza, pela oportunidade concedida, pela orientação brilhante, por sua confiança, sendo um orientador sempre presente;

À minha Co-orientadora Professora Doutora Margarida Angélica, pela oportunidade e orientação;

À Professora Maria Lúcia da Conceição, a minha grande incentivadora, amiga, maezona, aquela que vibra a cada vitória minha, aquela que me acolheu durante a graduação e me ensinou o caminho da pesquisa e da docência. Obrigada pela confiança e carinho, obrigada por fazer parte da minha vida;

À Geíza Alves de Azêredo, que me acompanhou no decorrer dos experimentos. Obrigada por sempre me presentear com suas idéias brilhantes em momentos em que tudo dava errado. Obrigada pelos conselhos, pelo apoio, incentivo, pela amizade e carinho;

À Rayanne de Araújo Torres, aluna de iniciação científica, que também me acompanhou durante a condução das análises desde o princípio e que foi fundamental para a realização deste trabalho. Obrigada por ter sido responsável, dedicada e eficiente durante todo o período em que estivemos juntas. Obrigada por tudo, principalmente por ter acordado várias vezes às 4 horas da madrugada para ir ao laboratório me auxiliar nos experimentos;

Aos companheiros de turma da pós (mestrado e doutorado), Daline, Mônica, Andrei, Gabriela, Elania, Leonardo, Georgia, Isabelle, Jenyffer, pela companhia e por todos os momentos vivenciados, bons, ruins, engraçados, estressantes, pela troca de experiências e também pela ajuda e contribuição dada durante os trabalhos e seminários das disciplinas;

À Estefânia, Ilsa e Gabriele, que me acolheram em seu apartamento, e a Carlos Eduardo, por todo o apoio em Recife e durante a realização dos experimentos;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Paraíba, Nereide, Eduardo, Camila, Larissa, Sonálle, Tamires, Cely, Thatyane, Ana Júlia, Helena, Nelson, Vanessa, Adassa, Priscila, Edjeyse, enfim, a todos que fazem parte desse Laboratório, minha segunda casa, pela companhia, pelas brincadeiras do dia a dia, pela ajuda quando necessitei;

Aos amigos da Graduação e agora também Pós-Graduandos, Renata, Geisy, Carol, Nelson, Anna Júlia, Amanda, Janne, Sheilla, Kelly, Simony, Karla Kaligia, Laurycelia, e tantos outros, pelo apoio, incentivo, e pelos momentos de descontração;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Nutrição (PPGN) por todos os ensinamentos repassados durante as disciplinas do curso;

As professoras da banca, Margarida Angélica, Tânia Stamford e Roberta Bento, por terem aceitado o convite e pela contribuição deixada na leitura deste trabalho;

À professora Dr.^a Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo do Laboratório de Biologia Celular e Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) – FIOCRUZ-PE, pela colaboração na realização da Microscopia Confocal;

À professora Dr.^a Christina Alves Peixoto e aos funcionários Gaby, Ceiça, Karina, Josi e Francisco, do Laboratório de Microscopia do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), pela colaboração na realização das análises de Microscopia eletrônica de varredura e transmissão;

As Doutorandas do PPGN, Jenyffer Medeiros e Eduila Maria, pela colaboração na leitura deste trabalho e pelas sugestões dadas a fim de melhorá-lo e enriquecê-lo;

À Neci, Fran e Cecília, pela disponibilidade sempre que precisei dos serviços da Secretaria da Pós-Graduação e principalmente por guardarem minha mala sempre que necessário;

À Pós-Graduação em Nutrição da UFPE pela oportunidade cedida para obtenção do título de Mestre;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsa de mestrado;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Muitíssimo obrigada!

Tudo posso naquele que me fortalece

(Fl 4,13)

RESUMO

O consumo de hortaliças minimamente processadas tem aumentado em âmbito mundial nas últimas décadas, mas quando processadas sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias representam risco microbiológico e por isso a sanitização torna-se etapa crítica do processamento. No entanto, os produtos permitidos para uso em vegetais têm sido citados como responsáveis por efeitos indesejáveis. Como alternativa natural surge os óleos essenciais de plantas, cujo potencial antimicrobiano é atribuído principalmente aos seus compostos terpênicos majoritários. Diante deste contexto, este estudo objetivou avaliar o potencial de aplicação dos fitoconstituíntes carvacrol e 1,8-cineol como sanitizantes naturais em hortaliças folhosas minimamente processadas. Foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos compostos para os micro-organismos teste (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Aeromonas hydrophila* INCQS 7966 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 11253), a Concentração Inibitória Fracional (CIF) e a influência de sua aplicação na inibição do crescimento e sobrevivência de bactérias contaminantes de hortaliças minimamente processadas. Além disso, realizou-se avaliação sensorial das hortaliças tratadas com os compostos e investigação dos possíveis danos causados à célula bacteriana. Em todos os ensaios, frascos isentos dos fitoconstituíntes foram utilizados como controle. Os valores de CIM do carvacrol e do 1,8-cineol variaram de 0,6 a 2,5 e 5 a 20 µL/mL, respectivamente. Os índices de CIF foram 0,25, sugerindo uma interação sinérgica. No ensaio de viabilidade das cepas em caldo vegetal verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o frasco controle ao longo de 24 h. A exposição das hortaliças aos fitoconstituíntes por apenas 5 min provocou redução significativa ($p < 0,05$) nas contagens de micro-organismos pertencentes à microbiota das hortaliças. Estes resultados mostram considerável poder de inibição do crescimento e sobrevivência de bactérias associadas a hortaliças minimamente processadas. Quanto aos aspectos sensoriais, as hortaliças tratadas com a combinação dos fitoconstituíntes, em concentrações subinibitórias, obtiveram notas superiores ($p < 0,05$) para os atributos aparência, sabor e percepção geral, após 48 h de armazenamento refrigerado. As observações da morfologia da célula bacteriana sugerem ainda que os compostos carvacrol e 1,8-cineol, isolados e combinados em concentrações subinibitórias, ocasionam danos à membrana citoplasmática e à parede celular da bactéria, o que pode causar lise e morte celular, inclusive em concentrações subinibitórias. Estes achados reforçam a idéia de que quando aplicados em combinação constituintes de óleos essenciais podem substituir sanitizantes sintéticos clássicos alcançando equilíbrio entre a demanda pela segurança microbiológica e a aceitabilidade organoléptica de hortaliças minimamente processadas.

Palavras-chave: Compostos orgânicos. Monoterpenos. Sinergismo farmacológico. Sobrevivência celular. Hortaliças – processamento.

ABSTRACT

The consumption of minimally processed vegetables has increased worldwide in recent decades. But when processed under unsatisfactory sanitary conditions represent microbiological risk and so the sanitation becomes a critical step of the processing. However the products allowed for use in vegetables have been cited as responsible for undesirable effects. As a natural alternative, come the essential oils from plants, whose antimicrobial mechanism of action is attributed to its major terpene compounds. Given this context, this study aimed to evaluate the potential application of carvacrol and 1,8-cineole as natural sanitizers of minimally processed leafy vegetables. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the compounds for the test microorganisms (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Aeromonas hydrophila* INCQS 7966 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 11253), the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) and the influence of their application in inhibiting the growth and survival of bacteria in minimally processed vegetables were determined. Was also performed a sensory evaluation of the vegetables treated with the compounds and an investigation of possible damages caused to the bacterial cell. In all assays flasks without addition of phytocompounds were used as controls. MIC values of carvacrol and 1,8-cineole ranged from 0.6 to 2.5 and 5 to 20 μ L/mL, respectively. FIC indices were 0.25, suggesting a synergic interaction. In assay of viability of the strains in vegetable broth, there was significant difference ($p < 0.05$) between the treatments and control flask over 24 h. Exposure to the phytocompounds for only 5 min caused a significant reduction ($p < 0.05$) in counts of naturally occurring microorganisms. These results show the considerable capacity of these compounds in inhibiting the growth and survival of bacteria associated with minimally processed vegetables. For the sensory aspects, the vegetables treated with the combination of phytocompounds in subinhibitory concentrations obtained the highest scores ($p < 0.05$) for the attributes for appearance, taste and perception, after 48 h of cold storage. The observations of bacterial cell morphology suggest that the compounds carvacrol and 1,8-cineole, alone or in combination, cause damage to the cytoplasm membrane and cell wall of bacteria, which can cause cell lysis and death, even at subinhibitory concentrations. These findings reinforce the idea that when applied in combination constituents of essential oils can replace traditional synthetic sanitizing achieving balance between the demand for microbiological safety and sensory acceptability of minimally processed vegetables.

Key words: Organic compounds. Monoterpenes. Pharmacological synergism. Cell survival. Vegetables - processing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da literatura

Figura 1 – Estrutura química de uma molécula de carvacrol	40
Figura 2 – Estrutura química de uma molécula de 1,8-cineol	41
Figura 3 – Representação esquemática da célula bacteriana (bacilo com flagelo apolar)	43
Figura 4 – Representação dos locais e mecanismos da célula bacteriana que parecem ser sítios de ação para os compostos presentes em óleos essenciais	45

Artigo 1

Fig. 1. Viable cell counts of *L. monocytogenes* ATCC 7644 in vegetable broth at 37 °C as a function of antimicrobial concentration: (+): control (0 µL/mL); (●): Carvacrol (MIC: 0.6 µL/mL); (○): 1,8-cineole (MIC: 20 µL/mL); (■): Carvacrol (1/8 MIC: 0.075 µL/mL) + 1,8-cineole (1/8 MIC: 2.5 µL/mL); (□): Carvacrol (1/4 MIC: 0.15 µL/mL) + 1,8-cineole (1/4 MIC: 5 µL/mL). Detection limit of the test: 2.0 log cfu/mL 65

Fig. 2. Viable cell counts of *A. hydrophila* INCQS 7966 in vegetable broth at 28 °C as a function of antimicrobial concentration: (+): control (0 µL/mL); (●): Carvacrol (MIC: 0.6 µL/mL); (○): 1,8-cineole (MIC: 5 µL/mL); (■): Carvacrol (1/8 MIC: 0.075 µL/mL) + 1,8-cineole (1/8 MIC: 0.6 µL/mL); (□): Carvacrol (1/4 MIC: 0.15 µL/mL) + 1,8-cineole (1/4 MIC: 1.25 µL/mL). Detection limit of the test: 2.0 log cfu/mL 65

Fig. 3. Viable cell counts of *P. fluorescens* ATCC 11253 in vegetable broth at 28 °C as a function of antimicrobial concentration: (+): control (0 µL/mL); (●): Carvacrol (MIC: 2.5 µL/mL); (○): 1,8-cineole (MIC: 10 µL/mL); (■): Carvacrol (1/8 MIC: 0.3 µL/mL) + 1,8-cineole (1/8 MIC: 1.25 µL/mL); (□): Carvacrol (1/4 MIC: 0.6 µL/mL) + 1,8-cineole (1/4 MIC: 2.5 µL/mL). Detection limit of the test: 2.0 log cfu/mL 66

Artigo 2

Fig. 1. Scanning electron microscopy of *P. fluorescens* ATCC 11253 exposed to CAR and CIN alone and in combination for 1 h in a vegetable-based broth. (A, B) Control cells (0 µL/mL); (C, D) CAR: 2.5 µL/mL; (E, F) CIN: 10 µL/mL; (G, H) CAR: 0.3 µL/mL + CIN: 1.25 µL/mL; (I, J) CAR: 0.6 µL/mL + CIN: 2.5 µL/mL 88

Fig. 2. Transmission electron microscopy of *P. fluorescens* ATCC 11253 exposed to CAR and CIN alone and in combination for 1 h in a vegetable-based broth. (A, B) Control cells (0 μ L/mL); (C, D) CAR: 2.5 μ L/mL; (E, F) CIN: 10 μ L/mL; (G, H) CAR: 0.3 μ L/mL + CIN: 1.25 μ L/mL; (I, J) CAR: 0.6 μ L/mL + CIN: 2.5 μ L/mL 89

Fig. 3. Fluorescence microscopy of *P. fluorescens* ATCC 11253 exposed to CAR and CIN alone and in combination for 15 min (left column) and 30 min (right column) in a vegetable-based broth. (A, B) Control cells (0 μ L/mL); (C, D) CAR: 2.5 μ L/mL; (E, F) CIN: 10 μ L/mL; (G, H) CAR: 0.3 μ L/mL + CIN: 1.25 μ L/mL; (I, J) CAR: 0.6 μ L/mL + CIN: 2.5 μ L/mL 90

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration of carvacrol and 1,8-cineole against bacteria associated to minimally processed vegetables	64
Table 2. Counts (log cfu/g) of <i>L. monocytogenes</i> , <i>A. hydrophila</i> and <i>P. fluorescens</i> in experimentally inoculates fresh-cut vegetables exposed to carvacrol and 1,8-cineole (alone and in mixture) for 5 mim (28 °C)	67
Table 3. Counts (log cfu/g) of the autochthonous microflora of fresh-cut vegetables exposed to carvacrol and 1,8-cineole (alone and in mixture) for 5 min (28 °C)	68
Table 4. Mean sensory scores (n=50) for minimally processed leafy vegetables sanitized with carvacrol and 1,8-cineole alone and in mixture during refrigerated storage	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
CIF	Concentração Inibitória Fracional
CIM	Concentração Inibitória Mínima
EPA	Environmental Protection Agency
FDA	Food and Drug Administration
FEMA	Flavor and Extract Manufacturer's Association
GRAS	Generally Recognized as Safe
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IFPA	International Fresh-Cut Produce Association
MFA	Microcopia de Força Atômica
OMAFRA	Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs
PBS	Phosphate buffered saline
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THM	Trihalometanos
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	Apresentação	16
2	Objetivos	18
2.1	<i>Objetivo geral</i>	18
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	18
3	Revisão da literatura	19
3.1	<i>Hortaliças minimamente processadas</i>	19
3.1.1	Fontes de contaminação	21
3.1.2	Micro-organismos de importância	24
3.1.3	Sanitização	31
3.2	<i>Potencial antimicrobiano de óleos essenciais</i>	36
3.3	<i>Fitoconstituíntes carvacrol e 1,8-cineol</i>	39
3.4	<i>Mecanismos de ação de fitoconstituíntes</i>	43
4	Métodos	47
4.1	<i>Obtenção dos fitoconstituíntes</i>	47
4.2	<i>Obtenção dos micro-organismos teste</i>	47
4.3	<i>Inóculo microbiano</i>	47
4.4	<i>Preparação do caldo vegetal</i>	48
4.5	<i>Ensaios de atividade antimicrobiana</i>	48
4.5.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	48
4.5.2	Avaliação do efeito da ação combinada dos fitoconstituíntes	49
4.5.3	Influência dos fitoconstituíntes sobre a viabilidade das cepas bacterianas	49
4.5.4	Efeito dos fitoconstituíntes sobre a sobrevivência de bactérias potencialmente patogênicas em hortaliças minimamente processadas	50
4.5.5	Efeito dos fitoconstituíntes sobre a microbiota natural de hortaliças minimamente processadas	50
4.6	<i>Avaliação Sensorial</i>	51
4.7	<i>Testes de avaliação de possíveis danos causados à célula bacteriana</i>	52
4.7.1	Microscopia eletrônica de varredura	52
4.7.2	Microscopia eletrônica de transmissão	52
4.7.3	Microscopia confocal	53

4.8	<i>Análises estatísticas</i>	53
5	Resultados – Artigos Originais	55
5.1	<i>Artigo 1: Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables</i>	55
5.2	<i>Artigo 2: Carvacrol and 1,8-cineole applied alone and in combination using subinhibitory amounts cause changes in the morphology and membrane permeability of Pseudomonas fluorescens</i>	77
6	Considerações finais	91
	Referências	92
	Apêndices	107
	APÊNDICE A – Termo do Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	107
	Anexos	109
	ANEXO A – Aceite do Artigo 1	109
	ANEXO B – Submissão do Artigo 2	110
	ANEXO C – Normas para apresentação de dissertações e teses	111

1 Apresentação

Nas últimas décadas os consumidores têm modificado seus hábitos alimentares tornando-se conscientes da relação entre dieta e prevenção de doenças. Neste contexto, as hortaliças minimamente processadas têm ganhado destaque, face às suas características de conveniência, alimento fresco e de boa qualidade nutritiva (MAISTRO, 2001; ZHOU et al., 2004). No entanto, a maioria é consumida crua, representando um potencial problema de segurança microbiológica, principalmente quando processada sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (GLEESON; O'BEIRNE, 2005).

A microbiota natural de vegetais (hortaliças e frutas) depende das condições do ambiente, ou seja, do ar, da água e do solo. O interior pode estar isento de micro-organismos, entretanto deteriorantes e patógenos podem invadir os tecidos do vegetal durante a produção, elaboração, transformação e armazenamento. Particularmente, nas hortaliças minimamente processadas, podem apresentar destacável sobrevivência e multiplicação espécies bacterianas patogênicas e deteriorantes como *Listeria monocytogenes* (GLEESON; O'BEIRNE, 2005), *Aeromonas hydrophila* (UYTTENDAELE et al., 2004) e *Pseudomonas fluorescens* (RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007).

A sanitização de vegetais sob o ponto de vista da segurança alimentar é considerada etapa crítica do processamento (SANT'ANA et al., 2002). Entretanto, os produtos permitidos para desinfecção desses alimentos, dentre os quais o cloro, têm sido citados como responsáveis pelo desencadeamento de efeitos carcinogênicos, bem como de toxicidade residual e redução da eficácia antimicrobiana. Além disso, a conservação química limita a condição de “alimento natural” dos vegetais minimamente processados, embora seja reconhecida como um dos elementos necessários à segurança alimentar (BEDIN; GUTKOSKI; WIEST, 1999). Por isso, a demanda por sanitizantes naturais vem aumentando, com incentivo a pesquisas na busca por métodos de sanitização menos danosos ao alimento e a saúde dos consumidores, com efeito similar ou superior aos sanitizantes sintéticos clássicos, como, por exemplo, os óleos essenciais de plantas.

Vários estudos têm confirmado a ação antimicrobiana de óleos essenciais provenientes de diversas espécies vegetais (BARROS et al., 2009; DIMITRIJEVIĆ et al., 2007; SOUZA et al., 2007; TRAJANO et al., 2009; VELLUTI et al., 2003). No entanto, merecem destaque os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (AZERÊDO et al., 2011). Turina et al. (2006) sugerem que o possível mecanismo de ação dos óleos essenciais seria pela presença em sua constituição de compostos terpênicos, os quais

alterariam a bicamada lipídica da membrana celular microbiana, aumentando sua permeabilidade, com posterior liberação de constituintes intracelulares vitais, ou ainda por causar danos em seus sistemas enzimáticos. Os componentes majoritários dos óleos essenciais de *O. vulgare* L. e *R. officinalis* L. são, respectivamente, carvacrol (66,9 g/100 g) e 1,8-cineol (32,2 g/100 g) (AZERÊDO et al., 2011) e atribui-se principalmente a estes compostos a capacidade antimicrobiana dos óleos. De acordo com o Pharmaceutical Codex (1979) e Burt (2004), estes compostos não tem efeitos tóxicos significativos *in vivo* e por isso não há preocupações a respeito dos níveis possíveis de sua utilização em alimentos.

Como os óleos essenciais são compostos Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS), a sua adição pode alcançar um equilíbrio entre a eficácia antimicrobiana, frente a bactérias patogênicas e deteriorantes comumente encontradas em hortaliças minimamente processadas, e a aceitação sensorial (DIMITRIJEVIĆ et al., 2007). A propriedade de alimento fresco deste tipo de produto deve ser garantida, já que aspectos como murchas e cor, sabor e odor diferenciados influenciam diretamente na aceitação do alimento por parte dos consumidores (ARES et al., 2008; ARES; GIMÉNEZ; GÁMBARO, 2008; ZHOU et al., 2004).

Diante dos resultados de estudos que comprovam o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais e da demanda dos consumidores sobre a indústria alimentícia exigindo a adoção de alternativas mais naturais no controle da qualidade sanitária e de vida útil dos alimentos, percebeu-se a necessidade de realizar o presente estudo com enfoque na avaliação da atividade antimicrobiana dos fitoconstituintes majoritários dos óleos essenciais de *O. vulgare* L. e *R. officinalis* L., os quais são, respectivamente, carvacrol e 1,8-cineol. Portanto, espera-se que estes compostos apresentem propriedade antimicrobiana frente a bactérias de importância em hortaliças folhosas minimamente processadas e que tenham influência positiva sobre atributos sensoriais dos vegetais.

2 Objetivos

2.1 *Objetivo geral*

- Avaliar o potencial de aplicação dos fitoconstituintes carvacrol e 1,8-cineol como sanitizantes naturais em hortaliças folhosas minimamente processadas.

2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar o efeito antimicrobiano do carvacrol e 1,8-cineol, isolados e combinados, frente à microbiota natural e bactérias patogênicas de importância em hortaliças folhosas minimamente processadas;
- Verificar a influência da aplicação, isolada e combinada, dos fitoconstituintes sobre os atributos sensoriais das hortaliças;
- Investigar os possíveis danos às células bacterianas causados pelos fitoconstituintes quando aplicados isolados e combinados.

3 Revisão da literatura

3.1 Hortaliças minimamente processadas

As hortaliças minimamente processadas são produtos de origem vegetal que passam por um processo de modificação física, mas que mantêm características de um alimento fresco (NGUYEN-THE; CARLIN, 1994). Esta tecnologia foi apresentada pela indústria de alimentos como resposta à demanda dos consumidores por alimentos frescos, convenientes, seguros e de boa qualidade nutricional (ODUMERU et al., 2002). Estão disponíveis no mercado norte-americano desde a década de 30, quando saladas embaladas começaram a ser vendidas em quitandas e pequenos mercados dos Estados Unidos (EUA) no ano de 1938 (IFPA, 1999). Mas, foi nos anos 50, com o surgimento das redes de *fast food*, que essa atividade apresentou crescimento acelerado. No Brasil, o início dessa prática ocorreu no final da década de 70, com a chegada das redes de lanches rápidos aos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (MORETTI, 2007; ODUMERU et al., 2002).

A alface era um dos principais ingredientes dos diferentes sanduíches consumidos e foi uma das primeiras hortaliças comercializadas na forma minimamente processada. Depois surgiram a cebola, a cenoura, o salsão e outras folhosas. Para embalar eram utilizadas as mesmas embalagens de maçãs e cebolas frescas, mas, rapidamente os processadores perceberam a necessidade de diferentes filmes de plástico para diferentes produtos. Inicialmente, estas embalagens eram fechadas com lacres metálicos. No início dos anos 90 chegaram ao mercado norte-americano de produtos minimamente processados os filmes com permeabilidade seletiva a gases, possibilitando que a vida de prateleira de hortaliças pudesse ser estendida (MORETTI, 2007).

Atualmente, o mercado de vegetais minimamente processados tem recebido grande aceitação pelos consumidores (ZHOU et al., 2004). Dados de um grupo de supermercados na Bélgica indicam que a quantidade (kg) vendida no período de 1999 a 2004 aumentou 57 % (RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007). Em 2003, o crescimento do negócio de saladas minimamente processadas nos EUA foi ao redor de 9 %, com vendas estimadas em 2,3 bilhões de dólares. No Brasil o varejo de supermercados tem trabalhado com segmentações de mercado. Um destes segmentos é o de consumidores de pré-processado ou minimamente processados, cujo produto participa com 2,9 % do total de hortifrutis consumidos nos lares (SEBRAE, 2008). Dentre as hortaliças comumente encontradas na forma minimamente processada pode-se citar alface, rúcula, agrião, couve, repolho, espinafre,

cenoura, beterraba, pepino, feijão-vagem, pimentão, couve-flor, brócolis, salsa, cebolinha, salsão e tomate (MORETTI, 2007).

Para o consumidor, estes produtos oferecem vantagens como maior praticidade no preparo de refeições, ausência de desperdício, maior segurança na aquisição de hortaliças limpas e embaladas, possibilidade de conhecer a procedência do produto, escolher marcas e comprar menores quantidades. Para o produtor e distribuidor, resulta em agregação de valor ao produto *in natura*, redução de perdas durante armazenamento e redução de custos de transporte e manipulação (AGUILA et al., 2006; DURIGAN, 2004). Entretanto, apresentam uma vida de prateleira curta se comparada ao produto inteiro, pois as modificações físicas que sofrem expõem os tecidos internos do vegetal tornando o metabolismo celular mais acelerado.

O estresse sofrido pelos vegetais durante o processamento mínimo gera respostas fisiológicas como o aumento da produção de etileno, elevação da atividade respiratória, indução do metabolismo de compostos fenólicos, escurecimento proveniente da oxidação de compostos fenólicos, amarelecimento decorrente da perda de clorofila, cicatrização dos tecidos e degradação de lipídios das membranas celulares. Estas alterações citadas repercutem na característica de alimento fresco dos vegetais acarretando o aumento da perda de água (VITTI; KLUGE; JACOMINO, 2003), açúcares, ácidos e vitaminas, ocasionando diminuição da qualidade nutricional, assim como alterações no sabor, aroma e textura do produto (MORETTI; SARGENT, 2000). Podem sofrer ainda danos pelo frio e injúria pela atmosfera modificada (MORETTI, 2007).

Associada a estas alterações fisiológicas está a possibilidade de contaminação das hortaliças minimamente processadas por micro-organismos deteriorantes e patogênicos, pois o estresse sofrido torna os tecidos vegetais mais suscetíveis ao ataque microbiano. Os vegetais são constituídos principalmente por água, resultando em uma elevada atividade de água ($>0,99$); o pH intracelular varia, embora para a maioria dos vegetais minimamente processados este valor encontre-se entre 4,9 a 6,5; possuem estrutura física susceptível a invasão de bactérias e fungos, já que os danos causados na superfície do tecido vegetal acarretam na liberação de nutrientes que podem ser utilizados pelos micro-organismos contaminantes (RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007).

Em resposta ao novo estilo de vida, percebe-se que o consumo crescente destes produtos é um fenômeno de âmbito mundial, associado a fatores decorrentes das mudanças sociais, políticas e econômicas ocorridas no século passado, que impuseram à sociedade novos hábitos, estilo de vida diferenciado e ritmo acelerado. De forma paralela tem havido um aumento no número de doenças transmitidas pelo consumo de vegetais, apesar da diminuição

da incidência global de doenças transmitidas por alimentos, ocorrida entre os anos de 2000 e 2006. Em grande parte, este aumento é devido ao maior consumo de alimentos minimamente processados e intensivas práticas de produção, transformação e manejo (OMAFRA, 2006). Segundo Suslow (2002), o consumo crescente desses alimentos minimamente processados aumenta o risco de exposição a micro-organismos patogênicos, pois os processos de controle disponíveis para proteger o consumidor ainda são limitados.

3.1.1 Fontes de contaminação

Enquanto a maioria das técnicas de processamento de alimentos estabiliza os produtos e prorroga sua vida de prateleira, o processamento mínimo aumenta sua perecibilidade, pois inclui várias etapas nas quais os vegetais (hortaliças e frutas) são submetidos a operações de manejo pós-colheita, pré-seleção e classificação, lavagem, corte, descasque ou fatiamento, enxágue inicial, sanitização, enxágue final, centrifugação, seleção, embalagem e armazenamento (NGUYEN-THE; CARLIN, 1994).

Na fase de produção agrícola, a contaminação pode ocorrer por meio do solo contaminado, da água de irrigação, do adubo orgânico ou proveniente de fezes de animais (BEUCHAT, 2002). Guan et al. (2001) e Ng, Fleet e Heard (2005) relatam que a presença de alguns compostos químicos inertes na composição de pesticidas é também um fator que predispõe à sobrevivência e à proliferação de micro-organismos. Jay (2005) destaca a importância dos valores de pH das hortaliças e também a camada protetora de algumas como fatores de influência na microbiologia destes produtos. Na colheita, pode ocorrer ainda contaminação cruzada com os operadores, equipamentos, fezes, animais, insetos, poeira, água de lavagem, veículos, equipamentos e embalagens utilizados no transporte (BEUCHAT, 2002; JAY, 2005).

No momento do recebimento, a matéria-prima deve ser colocada em local externo à área de processamento para que esta não seja contaminada. Nesta fase, recomenda-se uma lavagem inicial dos produtos com água corrente, para remoção das impurezas. Em seguida, as hortaliças devem ser selecionadas de forma a minimizar a contaminação da área de processamento. Devem-se eliminar os materiais impróprios para o consumo e partes não processáveis, como folhas em deterioração, talos, raízes e inflorescências deterioradas e separar as hortaliças de acordo com as características de forma, tamanho e peso, para facilitar o manuseio durante o processamento. Recomenda-se que a seleção seja realizada em mesas de aço inoxidável, limpas e sanitizadas (MORETTI, 2007).

Em seguida faz-se a lavagem e sanitização da superfície do alimento. A lavagem deve ser realizada em tanques de aço inoxidável, com água corrente e depois em solução com detergente apropriado, em concentrações previamente estabelecidas, de acordo com a hortaliça e conforme a recomendação do fabricante. Recomenda-se que fiquem imersas em tanques com a solução detergente e que a mesma seja trocada pelo menos de quatro a seis vezes ao dia. Após a lavagem, as hortaliças devem ser enxaguadas até a remoção completa do detergente (MORETTI, 2007).

As operações de corte, fatiamento ou torneamento também acarretam em contaminação das hortaliças, pois os danos sofridos pelo vegetal levam à liberação de um sumo rico em nutrientes, ao aumento da respiração dos tecidos e permitem a penetração de micro-organismos da superfície para o interior, com consequente desenvolvimento e crescimento microbiano. Além disso, estas operações têm o potencial de recontaminar o produto em virtude da alta manipulação (JAY, 2005; PINTO, 2007). A alface, por exemplo, pode ser comercializada em folhas intactas ou fatiada manualmente; couve, acelga e repolho são comercializados fatiados; os floretes dos brócolis e da couve-flor são separados manualmente; vagens são picadas manualmente ou em cortadores manuais; e a cenoura e a beterraba geralmente são preparadas em fatias, cubos e palitos ou raladas (MORETTI, 2007).

Após o corte, as hortaliças são lavadas primeiramente em água a 4 °C e circulante, para o resfriamento do produto e a retirada de suco celular resultante do corte (primeiro enxágue). Em seguida, são sanitizadas por imersão e posteriormente imersas novamente em água gelada para a retirada do excesso de sanitizante (segundo enxágue) (MORETTI, 2007). Ao se proceder a lavagem e a sanitização das hortaliças contribui-se para a redução da carga bacteriana presente, no entanto, quando não executada de maneira correta, pode agir de forma inversa, difundindo e incrementando a contaminação com micro-organismos que podem se desenvolver durante as demais etapas do processamento e no armazenamento (MAISTRO, 2001). Além disso, algumas células podem sobreviver ou ser quimicamente injuriadas, recuperar-se e crescer no alimento durante a estocagem (LEE; BAEK, 2008). Na sanitização pode-se utilizar hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e ozônio (FDA, 2002).

A centrifugação tem o objetivo de retirar o exsudado do corte e o excesso de água de lavagem, pois deve evitar a disponibilidade de nutrientes e água livre para o desenvolvimento de micro-organismos, mas, em contrapartida, pode também provocar injúria e promover deterioração mais rápida (MAISTRO, 2001). Por isso, uma nova seleção é realizada após a centrifugação. As folhosas (alface, repolho e acelga) e as inflorescências (brócolis e couve-

flor) devem passar por nova seleção, retirando-se os pedaços de folhas com defeitos e as impurezas resultantes do processamento que não foram eliminadas na pré-seleção. Nesta etapa, todos os utensílios e mesas devem estar devidamente higienizados e sanitizados, e os manipuladores devem fazer uso de luvas, máscaras e aventais, conforme as boas práticas de fabricação estabelecidas pela indústria de processamento (MORETTI, 2007).

A embalagem protege os produtos contra danos e contaminação por micro-organismos. Nesta etapa, as recomendações de controle higiênico-sanitário aplicam-se a manipuladores, equipamentos, utensílios e ao ambiente. O armazenamento do produto final, pronto para ser comercializado, é feito em câmaras frias. Devem ser mantidos sob temperatura em torno de 5 °C até a sua distribuição e com umidade relativa ajustada de acordo com as características de cada produto. As câmaras devem ser de material lavável, higienizadas e sanitizadas constantemente, para prevenir possíveis contaminações. A distribuição deve ser realizada em temperatura de refrigeração, entre 5 e 7 °C, e os produtos devem ser acondicionados em embalagens secundárias (MORETTI, 2007).

Os equipamentos mal higienizados também contribuem para a contaminação das hortaliças minimamente processadas, pois bactérias podem secretar exopolissacarídeos e proporcionar a formação de biofilmes, com consequente redução do efeito de sanitizantes e outros agentes antimicrobianos, como comprovado por Carmichael et al. (1999), ao observarem a resistência de *L. monocytogenes* à 500 ppm de cloro livre, quando se encontrava em biofilmes formados por *Pseudomonas fragi* e *Staphylococcus xilosus*.

As técnicas de preservação de hortaliças minimamente processadas como o uso de produtos químicos, temperatura de refrigeração, irradiação, pulsos elétricos, ultra-som, pulsos de luz, tratamento ultravioleta (UV), agentes antiescurecimento, agentes acidificantes, soluções de cálcio, revestimentos de película comestível e embalagens ativas visam aumentar a vida de prateleira e manter o alimento com características sensoriais favoráveis. Entretanto, o sucesso destas técnicas depende de vários fatores, a citar: eficácia na redução da contagem microbiana e, ainda mais importante, na manutenção dessa redução durante o armazenamento; grau em que ocorrem efeitos indesejáveis, como amolecimento do tecido vegetal ou descoloração devido à aplicação da técnica; efeito dessas técnicas sobre a qualidade nutricional e sobre a possível formação de subprodutos que podem ter implicações para a saúde humana, como no caso da desinfecção com produtos clorados; aspectos econômicos, tais como despesas relacionadas com equipamentos; e extensão da cadeia de processamento devido à aplicação do tratamento de preservação (RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007).

A ocorrência do elevado número de doenças alimentares transmitidas por vegetais minimamente processados se dá também pelo fato das hortaliças, em sua maioria, serem consumidas cruas e não haver no processamento nenhum tipo de tratamento térmico que possa assegurar a inativação dos micro-organismos presentes na matéria-prima e/ou aqueles adquiridos via manipulação (OMAFRA, 2006). Por isso, as hortaliças devem possuir elevado padrão microbiológico, estando isentas de quaisquer micro-organismos que possam vir a deteriorá-las ou trazer dano à saúde dos que as consomem. Além disso, a utilização de conservantes como os sulfitos, com o objetivo de garantir a qualidade microbiológica do produto, tem levado à busca por alternativas à aplicação desse agente, pois, podem provocar a corrosão de equipamentos, a diminuição do valor nutricional, a perda de firmeza, a formação de *off-flavors* no produto processado e alguns efeitos adversos à saúde (MORETTI, 2007).

Diante deste panorama situacional, em 2001 o Comitê de Higiene de Alimentos do *Codex Alimentarius* publicou o documento *Proposed draft code of hygienic practice for pre-cut fruits and vegetables*, que estabelece definições para a produção primária desse tipo de produto, como *layout* de equipamentos, controle das operações, higiene pessoal, transporte, informação do produto e treinamento. Em 2006, o *Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs – Ontario/Canada* (OMAFRA), publicou o *Minimally Processed Fruits and Vegetables – Good Manufacturing Practices Guidebook*, que fornece diretrizes para uma série de práticas de segurança alimentar. Já em 2008, a *Food and Drug Administration* (FDA) lançou o *Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables*, que determina medidas mais rigorosas de controle na cadeia produtiva destes alimentos, em face dos constantes surtos de doenças por contaminação microbiológica que vêm ocorrendo nesse mercado.

3.1.2 Micro-organismos de importância

Os alimentos em geral são passíveis de contaminação por diferentes agentes microbianos que podem levar a ocorrência de doenças, tanto por ação do próprio micro-organismo patógeno, quanto pela presença de suas toxinas (BENKEBLIA, 2004). Hortaliças cultivadas em solos carreiam aproximadamente 10^9 unidades formadoras de colônia/g (UFC/g) de micro-organismos depois de colhidas, sendo os mais comuns as bactérias, os fungos filamentosos e as leveduras. As bactérias mais frequentes são *Pseudomonas* spp., *Erwinia herbicola*, *Enterobacter agglomerans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus* spp. e as patogênicas do gênero *Salmonella* e *Clostridium*, além de *Escherichia coli* O157:H7

(MORETTI, 2007). Por isso, é imprescindível que a indústria de hortaliças minimamente processadas controle a higiene da matéria-prima, baseada em fundamentos tecnológicos comprovadamente eficientes a fim de garantir ao consumidor a disponibilidade de produtos de forma segura do ponto de vista microbiológico/sanitário (PINTO, 2007).

No caso das hortaliças minimamente processados a contagem microbiana após o processamento varia de 3,0 a 6,0 log UFC/g e inclui micro-organismos dos grupos *Pseudomonadaceae* e *Enterobacteriaceae*, além de bactérias láticas e leveduras. Podem ainda ser contaminados com patógenos humanos, presentes na matéria-prima ou inseridos durante ou após a colheita (RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007). Oliveira et al. (2011), avaliaram a qualidade microbiológica de 162 amostras de hortaliças folhosas minimamente processadas, comercializadas em seis supermercados da cidade de Ribeirão Preto – SP, e constataram a presença de micro-organismos pertencentes aos grupos pesquisados em todas as amostras. Bactérias psicrotróficas foram encontradas em 96,7 % das amostras com contagens acima de 5 log UFC/g, enquanto os coliformes totais e termotolerantes estavam presentes, respectivamente, em 132 (81,5 %) e 107 (66 %) hortaliças analisadas. *E. coli* foi isolada de 86 (53,1 %) amostras, *Listeria* spp. encontrada em 6 (3,7 %) e *Salmonella* spp. em 2 (1,2 %) amostras. Os autores ressaltam a necessidade de implementação de programas de qualidade durante a produção de minimamente processados visando à extensão da vida de prateleira do produto e sua segurança microbiológica.

É importante ressaltar que as alterações microbiológicas também afetam sobremaneira a qualidade sensorial dos produtos minimamente processados durante o armazenamento. Segundo Ragaert, Devlieghere e Debevere (2007), micro-organismos pectinolíticos podem estar relacionados a alterações visuais na medida em que rompem as paredes celulares do vegetal, provocando estresse e a exposição de enzimas e substratos, o que pode levar ao escurecimento enzimático destes produtos. Os mesmos autores alertam ainda sobre a importância de estudos como os de Giménez et al. (2003) e Li et al. (2001) que tentaram estabelecer um limite para a contagem de psicrotróficos na qual a degradação microbiológica torna-se óbvia. Jacques e Morris (1995) sugerem que contagens de até 8 log UFC/g não são suficientes para causar este tipo de dano ao alimento.

A produção de *off-flavour* em vegetais é proveniente do fermento mecânico que leva a um diversificado leque de vias enzimáticas associadas, em muitos casos, com a geração de compostos voláteis (TOIVONEN, 1997). No entanto, esta produção de voláteis também pode ser atribuída aos micro-organismos presentes no alimento. O aumento nos níveis de etanol durante o armazenamento pode ser causado por reações fermentativas devido a altas

concentrações de CO₂ e/ou baixas concentrações de O₂, atribuídas a atividade microbiológica (HAGENMAIER; BAKER, 1998; JACXSENS et al., 2003; RAGAERT et al., 2006). Ragaert et al. (2006) demonstraram ainda a produção de outros compostos orgânicos voláteis como 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, a partir de contagens de bactérias e leveduras em torno de 6,7-7,1 e 5,0 log UFC/cm², respectivamente.

A relação existente entre a atividade microbiana e a produção de odores durante o período de armazenamento de hortaliças minimamente processadas também já foi comprovada. Barry e O'Beirne (1998) observaram que durante a armazenagem de cenoura fatiada a 8 °C houve a produção de odores desagradáveis a partir do momento que a contagem total de bactérias alcançou 8 log UFC/g. Hao et al (1999) detectaram no décimo quarto dia de estocagem de cenoura embalada a 4 °C um leve odor azedo, isto ocorreu quando a contagem de bactérias psicrotróficas detectada foi de $8,1 \pm 0,1$ log UFC/g. No entanto, nenhum odor inaceitável foi observado durante os 22 dias de armazenamento de brócolis embalado, estando a contagem de bactérias psicrotróficas abaixo de 8 log UFC/g.

A perda da textura pode também ser resultado de altas contagens de bactérias aeróbias psicrotróficas. Diferentes micro-organismos produzem enzimas pectinolíticas que podem influenciar as mudanças na textura dos minimamente processados por meio da degradação da lamela média e da parede celular primária, dentre eles destacam-se as espécies de *Erwinia* e *Pseudomonas* (RAGAERT; DEVLEIGHERE; DEBEVERE, 2007). Robbs et al. (1996) encontraram população bacteriana variando de 7,0 a 7,7 log UFC/g em aipo minimamente processado, sendo predominante os micro-organismos pertencentes ao grupo das *Pseudomonas* pectinolíticas. No entanto, é provável que uma mistura complexa de bactérias, ao invés de uma única espécie, inicie o apodrecimento, como mostrado no caso de aipo cortado. Na maioria dos tecidos da planta intactos uma possível perda na resistência da planta ao ataque microbiológico conduz ao desenvolvimento das alterações (ROBBS et al., 1996).

Outro fato relevante a ser destacado a respeito da contaminação microbiológica de hortaliças minimamente processadas é que por serem armazenadas, geralmente, sob baixas temperaturas, há a predominância do crescimento de espécies de bactérias psicrotróficas como *P. fluorescens*, *A. hydrophila* e *L. monocytogenes* (RAGAERT; DEVLEIGHERE; DEBEVERE, 2007). Silva et al. (2007) analisaram 56 amostras de vegetais minimamente processados comercializados em supermercados da cidade de Porto Alegre – RS, quanto a presença de micro-organismos psicrotróficos, pelo período de um ano, e constataram que a contagem média variou de $7,9 \times 10^6$ a $2,7 \times 10^8$ UFC/g.

P. fluorescens, *A. hydrophila* e *L. monocytogenes* são considerados micro-organismos emergentes, reconhecidos como patógenos e estão envolvidos na produção, processamento e distribuição desse tipo de produto (FORSYTHE, 2002). A emergência ocorre quando um micro-organismo passa a habitar em um determinado produto alimentício onde até então não havia sido previamente identificado. As novas tecnologias de processamento e conservação na produção de alimentos explicam como os novos patógenos podem estabelecer-se na cadeia alimentar e comprometer os alimentos, pois criam novas rotas ecológicas para a contaminação e proliferação (SKOVGAARD, 2007). Com o advento do processamento mínimo, os vegetais passaram a figurar no cenário de alimentos capazes de causar surtos de origem alimentar.

Vários estudos têm relatado a presença de *P. fluorescens*, *A. hydrophila* e *L. monocytogenes* em hortaliças minimamente processadas, dentre eles pode-se citar os estudos realizados por Costa, Vanetti e Puschmann (2009), Francis, Thomas e O'Beirne (1999), Ongeng et al. (2006), Oliveira et al. (2010), Ragaert, Devlieghere e Debevere (2007), Wan, Wilcock e Coventry (1998), Xanthopoulos, Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetaki (2010). Acredita-se, que o desenvolvimento dessas espécies em ambientes refrigerados esteja atrelado a uma provável alteração na membrana lipídica da bactéria (aumento no grau de ácidos graxos insaturados), provocada pelo frio, necessária para manter a fluidez requerida para atividades enzimáticas, como também para o transporte de solutos através da membrana (BEALES, 2004). A compreensão dos mecanismos acerca da sobrevivência e crescimento destes micro-organismos em baixas temperaturas pode prover informações para ajudar a desenvolver métodos de controle mais efetivos, visto que os tratamentos usados não garantem a sua total eliminação (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

Pseudomonas fluorescens

Os micro-organismos do gênero *Pseudomonas* são bacilos Gram-negativos retos ou curvos, medindo cerca de 0,5 x 5 µm, possuem flagelos e pertencem aos grupos de bactérias aeróbias estritas e psicrotróficas, além de serem catalase e oxidase positivos (RAY, 2004). Devido a sua intensa atividade metabólica, são capazes de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos, além de produzirem pigmentos hidrossolúveis, enzimas proteolíticas e lipolíticas. Algumas espécies produzem enzimas pectinolíticas de importância para vegetais e podem ser encontradas em alimentos refrigerados, congelados e processados que sofreram contaminação pós-processamento (FRANCO; LANDGRAF, 2008). As bactérias pertencentes a este gênero são encontradas amplamente no meio ambiente, a citar o solo e água, plantas e

derivados, ultensílios de alimentos e animais (JAY, 2005), sendo as espécies *P. fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida* as mais importantes em alimentos (RAY, 2004).

P. fluorescens é o principal grupo de bactérias psicrotróficas comumente encontradas em hortaliças minimamente processadas (GIMÉNEZ et al., 2003). É um micro-organismo extremamente importante em produtos vegetais, não somente por se envolver em processos de deterioração, mas por contribuir com a colonização de outros patógenos, por meio da formação de biofilmes em superfícies de equipamentos e utensílios. Sua ocorrência pode ser associada também ao seu menor tempo de geração em temperaturas de refrigeração e a sua resistência a tratamentos térmicos (BEUCHAT, 2002; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2008). Além disso, é alvo de preocupação, pois apresenta resistência a antibióticos, como comprovado por Hamilton-Miller e Shah (2001), ao avaliarem a susceptibilidade da microbiota própria de saladas de vegetais a antibióticos.

Tem sido demonstrado que a quantidade de *P. fluorescens* no vegetal está diretamente correlacionada com a quantidade de açúcares presentes nas folhas de plantas hortícolas e que estes açúcares são o fator limitante no que diz respeito à sua colonização (MERCIER; LINDOW, 2000). Babic et al. (1996) observaram que as populações desse micro-organismo situavam-se na superfície de corte do espinafre. Este resultado foi similar aos achados de Brocklehurst e Lund (1981) que relataram que após a inoculação de aipo com *P. fluorescetes*, a podridão mole não poderia se desenvolver na região do tecido intacto. Beriam (2007) cita este micro-organismo como um dos responsáveis por doenças bacterianas em hortaliças como alface, alho e cebola.

No entanto, ainda é causa incomum de doença em seres humanos, e normalmente afeta pacientes com sistema imunológico comprometido como, por exemplo, pacientes em tratamento de câncer. Durante o período 2000-2004, 35 casos de infecção na corrente sanguínea por *P. fluorescens* foram notificados pelo *National Nosocomial Infections Surveillance System* dos Estados Unidos. De 2004 a 2006, houve um surto envolvendo 80 pacientes em seis estados diferentes. A fonte da infecção foi o fluido de lavagem utilizado para manter o cateter venoso periférico, colocado em pacientes hospitalizados, desobstruído. A microscopia eletrônica de varredura dos cateteres explantados de pacientes revelaram biofilmes contendo organismos morfologicamente consistentes com *P. fluorescens* (GERSHMAN et al., 2008).

Aeromonas hydrophila

A. hydrophila é outro exemplo de patógeno emergente, pois apenas há algumas décadas começou a ser identificado como o causador de infecções gastrintestinais (DASKALOV, 2006). Pode causar também um grande número de infecções extra-intestinais, incluindo bactеремia, meningite, infecções em feridas e nos tratos respiratório e urinário (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Apresenta ainda resistência aos antibióticos comumente empregados na prática clínica (DASKALOV, 2006) e pode ser um invasor secundário de doenças subjacentes, sendo considerada uma bactéria oportunista (SKOVGAARD, 2007).

Pertence ao gênero *Aeromonas*, o qual se caracteriza por bacilos pequenos (0,5 x 1,0 µm), móveis (flagelos), Gram-negativos, anaeróbios facultativos, psicrotróficos, oxidase e catalase positivos, que podem ocorrer isoladamente ou em pares. São encontrados em água doce, águas subterrâneas, água mineral, água do mar, águas estuarinas, sedimentos, águas contaminadas por esgotos, abastecimento de água clorada e não clorada, e até mesmo em água engarrafada. Nos alimentos podem estar presentes em legumes, carne, presunto, frango, leite cru, peixe, marisco, além de carne de porco e vaca embaladas a vácuo, carnes cozidas, saladas pré-preparadas, e especialmente em produtos frescos refrigerados. *A. hydrophila* é considerado um potencial patógeno de origem alimentar (PIANETTI et al., 2009; RAY, 2004; SKOVGAARD, 2007).

Sua distribuição em diferentes habitats se dá por sua capacidade de adaptação a uma grande variabilidade de condições ambientais. É capaz de crescer ou sobreviver a temperaturas que vão desde 5 a 45 °C, em alimentos embalados a vácuo, sob atmosfera com 100 % de CO₂, na presença de concentrações de 0,34 a 1,02 M de cloreto de sódio, e em ambientes com insignificantes quantidades de nutrientes (PIANETTI et al., 2009). Possui também um número elevado de características que a permitem crescer em hortaliças minimamente processadas. É psicrotrófica, cresce lentamente a 0 °C, mas temperaturas de 4 a 5 °C propiciam seu crescimento nestes alimentos. É um micro-organismo facultativamente anaeróbico, por isso é capaz de crescer em atmosferas contendo baixas concentrações de oxigênio (FRANCIS; THOMAS; O'BEIRNE, 1999).

Há diversos relatos da presença de *Aeromonas* spp. em espécies vegetais. Callister e Agger (1987) detectaram *A. hydrophila* em quase todos os vegetais analisados e sugeriram a forte probabilidade de serem implicados em gastrenterites. Segundo Marchetti, Casadei e Guerzoni (1992), pode-se encontrar cargas microbianas de *A. hydrophila* em vegetais minimamente processados variando de 10³ a 10⁶ UFC/g. Outros autores também identificaram

espécies patogênicas de *Aeromonas* em vegetais (McMAHON; WILSON, 2001; UYTENDAELE et al., 2004). É também frequentemente encontrada na água utilizada na limpeza de utensílios e equipamentos, podendo ser fonte de contaminação de hortaliças minimamente processadas (DASKALOV, 2006).

As evidências quanto ao envolvimento de micro-organismos do gênero *Aeromonas* spp na etiologia de doenças gastrointestinais em seres humanos têm aumentado nos últimos anos. Pode causar dois tipos de doença gastrointestinal, sendo que a mais comum apresenta características semelhantes à da coléra, com diarréia aquosa e febre moderada. O segundo tipo é caracterizado pela presença de muco e sangue nas fezes. A diarréia provocada geralmente é moderada e restrita. Cepas de *A. hydrophila* produzem dois tipos de enterotoxina: uma citotônica, semelhante à da cólera, e uma citotoxina. Já foi observada a acorrência das duas simultaneamente, no entanto, há consideráveis evidências de que o principal fator de virulência seja a citotoxina (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Listeria monocytogenes

As bactérias pertencentes ao gênero *Listeria* são bacilos curtos ($0,5 \times 1\text{-}2 \mu\text{m}$) Gram-positivos, que ocorrem isoladamente ou em cadeias curtas. São móveis, anaeróbios facultativos, catalase e oxidade negativas e capazes de crescer a 1°C . As espécies são amplamente distribuídas no ambiente e têm sido isoladas de diferentes tipos de alimentos (RAY, 2004). É móvel devido a flagelos peritríquios, apresentando movimento característico denominado tombamento, que auxilia na sua identificação (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Este micro-organismo apresenta crescimento na faixa de $2,5$ a 44°C , embora existam relatos sobre o crescimento a 0°C , e suporta repetidos congelamentos e descongelamentos. Seu tempo de geração a 35°C varia conforme o meio em que se encontra e pode oscilar de $0,65$ a $0,69\text{h}$. A 4°C , esse tempo varia de $1,16$ a $1,56$ dias. O pH ótimo para crescimento está entre 6 e 8 , mas pode crescer em uma faixa de 5 a 9 . Com relação a concentração de NaCl, constatou-se sobrevivência em $10,5$ e 13% a 37°C por 15 e 10 dias, respectivamente. Com 20 - 30% de NaCl o tempo de sobrevivência foi reduzido para 5 dias. Se a temperatura é reduzida para 4°C , a bactéria pode sobreviver por mais de 100 dias em concentrações entre $10,5$ e 30% . A atividade de água ótima é próxima a $0,97$ (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

L. monocytogenes tem sido encontrada em muitos vegetais prontos para o consumo (BEUCHAT; ADLER; LANG, 2004; CARRASCO et al., 2008). Isso se deve ao fato de ser encontrada frequentemente no ambiente agrário como solos, fezes de animais, lodo de esgoto,

silagem, esterco, água, lama e, sendo assim, é facilmente passível de ser veiculado para os produtos agrícolas (BEUCHAT, 2002). Além disso, apresenta características semelhantes a *A. hydrophila*, pois também possui habilidade de crescer em temperaturas de refrigeração, requer no mínimo - 0,4 °C, e também é facultativamente anaeróbia, ou seja, capaz de sobreviver e crescer sob baixas concentrações de O₂ (FRANCIS; THOMAS; O'BEIRNE, 1999), e por isso é comumente isolada nesse tipo de produto. Na área de processamento, pode ser introduzida por vários vetores, e se estabelecer e multiplicar particularmente em locais que são de difícil limpeza e sanitização, tornando-os focos de contaminação. As condições ambientais as quais os alimentos prontos para o consumo, como hortaliças minimamente processadas, são expostos podem ser uma fonte potencial desse patógeno (ICMSF, 2002).

L. monocytogenes é considerado um micro-organismo emergente, pois o papel dos alimentos em sua transmissão só foi reconhecido recentemente (WHO, 2002). Na área de Microbiologia Veterinária é um micro-organismo patogênico bastante conhecido há muito tempo. Porém, tornou-se um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos na década de 80, devido a eclosão de diversos surtos de listeriose humana (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* têm gerado impacto sobre a saúde pública (GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Em mulheres grávidas, pode causar aborto, em crianças e em pessoas com sistema imunológico debilitado pode levar a septicemia e meningite. Surtos de listeriose têm sido relatados na Austrália, Suíça, França e EUA. Dois surtos também ocorreram na França em 2000 e no EUA em 1999 (WHO, 2002).

3.1.3 Sanitização

Nos últimos cinquenta anos o interesse pela proteção dos alimentos contra micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos tem despertado grande interesse, de modo que neste período a produção de alimentos microbiologicamente estáveis vem sendo alcançada por meio do uso de vários procedimentos de natureza física ou química (BENKEBLIA, 2004). No caso das hortaliças minimamente processadas, a lavagem e a sanitização, procedimentos realizados utilizando-se água e substâncias químicas, são consideradas etapas críticas do processamento. São necessárias para a remoção de sujeira, de resíduos de pesticidas, e, principalmente, para eliminação dos micro-organismos responsáveis pela deterioração e perda da qualidade desse tipo de produto (SAPERS, 2003).

Esta prática é comumente empregada para se obter um produto mais seguro microbiologicamente, porém, faz-se necessário ressaltar que se a água utilizada não for de qualidade, torna-se fonte de contaminação dentro da planta de processamento (BERBARI; PASCHOALINO; SILVEIRA, 2001; ZAGORY, 2000). Segundo Moretti (2007), reduções significativas da população microbiana em hortaliças minimamente processadas podem ser obtidas com compostos sanitizantes. No entanto, a eficiência desses compostos na sanitização depende de fatores que atuam isoladamente ou em conjunto, como pH, temperatura da água, tempo de contato, natureza da superfície dos produtos e carga microbiana inicial.

A FDA aprovou o uso de hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e ozônio como sanitizantes para hortaliças frescas e minimamente processadas (FDA, 2002). Entretanto, dados sugerem que quaisquer dos métodos disponíveis, incluindo alguns dos mais novos agentes de desinfecção, como dióxido de cloro, ozônio e ácido peracético, não foram capazes de reduzir a população microbiana em mais de 90 ou 99 % (SAPERS, 2003). Além disso, podem afetar negativamente a qualidade nutricional e sensorial do produto. Soma-se a isso o questionamento acerca dos aspectos de segurança alimentar de preservativos sintéticos, uma vez que tais substâncias têm sido citadas como responsáveis pelo desencadeamento de efeitos carcinogênicos, bem como de toxicidade residual (SKANDAMIS; TSIGARIDA; NYCHAS, 2000).

O hipoclorito de sódio tem sido o sanitizante mais amplamente utilizado em alimentos, com vistas ao controle de micro-organismos. Seu uso é rotineiro na lavagem de hortaliças frescas e minimamente processadas (ARTÉS et al., 2007; LEE; BAEK, 2008), pois reage com as proteínas da membrana das células bacterianas interferindo no transporte de nutrientes e promovendo o extravasamento dos componentes celulares (VANETTI, 2000).

O cloro tem um efeito limitado na redução de micro-organismos em superfícies de hortaliças (SAPERS, 2001) e possui a desvantagem de formar compostos clorados com potencial efeito carcinogênico (MARTÍN-DIANA et al., 2007). De acordo com Suslow (1997), o cloro oxida materiais orgânicos de forma completa, produzindo subprodutos indesejáveis na água de processamento como o clorofórmio (CHCl_3) e trihalometanos (THM), suspeitos de serem potenciais carcinogênicos. Em pH alcalino reage com as bases nitrogenadas e produz cloraminas.

Em adição, o teor de cloro livre em uma solução pode ser reduzido devido a sua alta reatividade com matéria orgânica na presença de oxigênio e por fatores como pH, temperatura e concentração do sanitizante. Por estas razões, faz-se necessária a troca da solução após dois a três usos ou quando o nível de cloro livre for menor que 100 mg/L (VANETTI, 2000). Por

outro lado, concentrações muito elevadas podem causar problemas como descoloração do alimento, perda de qualidade e aumento na corrosão de equipamentos (PARK; LEE, 1995).

Em razão dos sistemas de lavagem com soluções a base de cloro resultar em subprodutos nocivos e, em razão da eficácia restrita na redução de contaminantes, sanitizantes alternativos e inócuos têm sido investigados e pesquisados (ÖLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009). Alguns ácidos orgânicos, por exemplo, podem agir como inibidores do crescimento de bactérias. Entretanto, os resultados obtidos com o uso destes ácidos como sanitizantes não indicam maior descontaminação do produto do que a encontrada com a sanitização com cloro. Geralmente, a população microbiana após o tratamento com 1 % de ácido láctico ou acético é reduzida a valores iguais ou menores do que um ciclo logarítmico (COSTA, 2002).

O dióxido de cloro (ClO_2), também utilizado na sanitização de hortaliças, é um gás estável dissolvido, com maior poder de penetração do que o hipoclorito de sódio, sendo mais eficaz contra os esporos. Ataca bactérias, pois reage com substâncias orgânicas da célula bacteriana, impedindo que reações ocorram. O ClO_2 não ioniza e por isso não forma ácidos fracos ou subprodutos cancerígenos como THM. Sua principal desvantagem é que tem que ser produzido no local, por meio da reação do cloreto de sódio com ácido ou cloro (EPA, 1999). Atualmente, uma nova tecnologia permite sua produção mais facilmente, no entanto, este produto se torna instável e pode ser explosivo quando as concentrações atingem 10 % ou mais no ar (BETTS; EVERIS, 2005). As principais desvantagens do seu uso são sua instabilidade e a formação de subprodutos inorgânicos como cloretos e cloratos (SADIQ; RODRIGUEZ, 2004).

Embora o uso do ClO_2 em alimentos seja permitido, existem poucos relatos sobre o uso em hortaliças minimamente processadas. Rodgers et al. (2004), demonstraram que, para a alface, uma solução de 5 ppm foi eficaz para inibir *L. monocytogenes*. López-Gálvez et al. (2010), comparando a ação sanitizante de hipoclorito de sódio e dióxido de cloro, observaram que na dose de 3 mg/L o dióxido de cloro foi tão eficaz quanto o hipoclorito, não causou qualquer efeito negativo sobre a qualidade sensorial e não levou à formação de THM. No entanto, diante da falta de conhecimento sobre a toxicidade dos subprodutos do dióxido de cloro e do seu impacto sobre a microbiota natural após a lavagem e armazenamento das hortaliças minimamente processadas, fazem-se necessários mais estudos.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é outro sanitizante potencial e é classificado como um composto GRAS pela FDA, para uso em alimentos como agente alvejante, oxidante, redutor e antimicrobiano. O principal objetivo do tratamento com peróxido de hidrogênio é estender a vida de prateleira pela redução da população de micro-organismos deterioradores

na superfície do produto (SAPERS; SIMMONS, 1998). Resíduos em hortaliças tratadas com peróxido de hidrogênio podem ser eliminados passivamente pela ação da enzima catalase do próprio vegetal, ou, ativamente, pelo enxágue imediatamente após o tratamento, para evitar reações entre o peróxido de hidrogênio e constituintes do alimento que poderão afetar a qualidade ou a segurança do produto. O H₂O₂ isolado não é comumente utilizado como agente descontaminante, pois tanto sua ação sanitizante como sua eficiência são lentas (KOIVUNEN; HEINONEN – TANSKI, 2005). Geralmente, é aplicado em associação com ácido peroxiacético. Comercialmente faz parte da composição das soluções de ácido peroxiacético, apresentando propriedade antimicrobiana importante (WAGNER; BRUMELIS; GEHR, 2002).

O ácido peroxiacético é uma combinação de ácido acético (CH₃CO₃H) e H₂O₂, geralmente comercializado como um líquido, também utilizado para a limpeza de superfícies e dos alimentos (FDA, 1997). Devido a sua tolerância a vários fatores tais como temperatura, pH, dureza e contaminação do solo, a sua aplicação principal é no setor de produtos hortícolas processados (ARTÉS et al., 2007). Sua ação antimicrobiana primária está relacionada a produção de espécies reativas de oxigênio, causa também desnaturação de proteínas e enzimas e aumento da permeabilidade da parede celular (SMALL et al., 2007). Pode ser utilizado como sanitizante na indústria de hortaliças minimamente processadas como substituto do hipoclorito de sódio (NGUYEN-THE; CARLIN, 1994). Entretanto, possui desvantagens como instabilidade em altas concentrações (15 %), alto custo quando comparado com outros sanitizantes tradicionais como, por exemplo, o próprio hipoclorito (KUNIGK; ALMEIDA, 2001), e limitada ação antimicrobiana frente a microbiota de vegetais (NASCIMENTO et al., 2003; RUIZ-CRUZ et al., 2007).

O ozônio (O₃), um agente oxidante potente, tem se mostrado um sanitizante mais eficaz que o cloro para a eliminação de micro-organismos em produtos vegetais. Destroi os organismos por meio da oxidação dos componentes vitais da célula, evitando o crescimento microbiano e permitindo estender a vida de prateleira dos produtos (PARISH et al., 2003). Entretanto, pesquisas adicionais são necessárias para definir seu potencial e os limites efetivos para seu uso, pois poucos estudos, dentre eles os de Achen e Yousef (2001), Kim, Yousef e Chusm (1999) e Singh et al. (2002), têm sido realizados para determinar seu efeito como sanitizante em produtos minimamente processados. Além de algumas pesquisas ainda estarem estudando seu potencial e seu limite de uso, outras (BAUR et al., 2004; BELTRÁN et al., 2005; RICO et al., 2006) demonstram que sua aplicação pode não ser bem sucedida. Garcia, Mount e Davidson (2003), utilizando a combinação de ozônio e cloro na sanitização de

saladas de alface minimamente processada, concluíram que a combinação de ozônio e cloro resultou em equivalentes ou melhores reduções microbianas e extensão da vida útil quando comparado ao cloro isolado. Entretanto, o ozônio não pôde substituir totalmente o cloro, pois este era necessário para se conseguir uma maior redução microbiana.

Por estas razões, os consumidores e a indústria alimentícia tendem cada vez mais a rejeitar sanitizantes sintéticos, e a demanda por preservativos naturais vem pressionando as indústrias de alimentos (SKANDAMIS; TSIGARIDA; NYCHAS, 2000). Além disso, muitas são as dificuldades e os desafios vividos pela indústria de hortaliças minimamente processadas, fazendo-se necessária a realização de trabalhos de pesquisa, com o objetivo de desenvolver novas tecnologias de conservação destes produtos (PINTO, 2007).

Um fato importante que merece destaque é que o uso descontrolado de antimicrobianos sintéticos tem sido responsável pelo surgimento de cepas microbianas progressivamente mais resistentes a diferentes compostos (KIESSLING et al., 2002). Vários autores reportam sobre o crescente número de isolamentos de cepas microbianas resistentes aos tradicionais procedimentos antimicrobianos aplicados pela indústria alimentícia (BRULL; COOTE, 1999; BURT, 2004). A resistência antimicrobiana é considerada uma consequência do amplo uso de antimicrobianos em todos os campos do controle do crescimento de micro-organismos. Entretanto, poderia ser possivelmente administrado ou, pelo menos, suavizado por meio do uso racional de antimicrobianos (BANERJEE; SAKAR, 2004). Brull e Coote (1999) relatam resistência de micro-organismos deteriorantes e patogênicos frente a alguns antimicrobianos usados para a conservação de alimentos como ácidos orgânicos fracos, peróxido de hidrogênio e agentes quelantes.

A eficácia e a segurança toxicológica de preservativos químicos e sintéticos vêm sendo colocada em questão e sendo bastante discutida nos últimos anos, por isso a demanda por alternativas naturais tem aumentado. Além disso, pode-se citar a resistência microbiana frente aos antimicrobianos clássicos e aditivos alimentares sintéticos como outro importante aspecto impulsor da busca de novos compostos antimicrobianos para o emprego em sistemas de conservação alimentar (HOLLEY; PATEL, 2005; SOUZA, 2005), os quais poderiam, possivelmente, ser aplicados em combinação com procedimentos pré-existentes. Dentre as alternativas propostas, destacam-se os óleos essenciais de plantas, considerados produtos naturais GRAS, pois possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana, apresentando eficácia no controle de bactérias patogênicas e deteriorantes de importância em vegetais prontos para o consumo (AZERÊDO et al. 2011; BURT, 2004; GUTIERREZ et al., 2008; OUSSALAH et al., 2006).

3.2 Potencial antimicrobiano de óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos voláteis, naturais e complexos, caracterizados por um forte odor e por fazerem parte de plantas aromáticas como metabólitos secundários. Possuem reconhecidamente atividade anti-séptica, ou seja, bactericida, virucida e fungicida, e propriedades medicinais, e por isso, na natureza exercem importante papel para a proteção da planta. São extraídos de várias espécies de plantas aromáticas geralmente localizadas em países de clima temperado. São líquidos, límpidos e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos com densidade geralmente menor que a da água, podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta (broto, flores, folhas, caules, galhos, sementes frutos, raízes ou casca) e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008; BEDIN; GUTKOSKI; WIRST, 1999; FORSYTHE, 2002).

Estes óleos constituem-se em complexas misturas de substâncias, podendo conter 100 ou mais compostos orgânicos, pertencentes às mais diversas classes (hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres e ácidos orgânicos), em diferentes concentrações, nos quais um composto farmacologicamente ativo é majoritário (CASTRO et al., 2004; FARMACOPEA ITALIANA, 1998). Porém, os terpenos e os fenilpropanos são as classes mais comumente encontradas. Os terpenos encontrados com maior frequência são os monoterpenos, que podem chegar a constituir cerca de 90 % do óleo, e os sesquiterpenos, bem como os diterpenos, constituintes minoritários (BAKKALI et al., 2008; CASTRO et al., 2004).

As especiarias apresentam ação indireta como agentes inibitórios de micro-organismos devido à presença em sua constituição dos óleos essenciais e por isso assumiram relevante importância como antimicrobianos. Esses elementos que se destacavam, principalmente, por conferir aromas e gostos característicos aos alimentos, revelaram nova perspectiva para seu emprego na indústria de alimentos (ERNANDRES; GARCIA-CRUZ, 2007). Entre as muitas especiarias utilizadas primariamente para flavorizar os alimentos, e que ao mesmo tempo têm reconhecido potencial como antimicrobianos inclui-se alho, cebola, noz-moscada, mostarda, pimenta-preta, tomilho, sálvia, alecrim, menta, manjericão, pálpula, açafrão, orégano, gengibre, coentro, manjerona, cravo, canela e cominho (BURT, 2004; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER 2010).

Segundo Bhavanani e Ballow (1992), cerca de 60 % dos óleos essenciais têm ação antifúngica e 30 % exibem propriedade antibacteriana. Já foi comprovada ação contra um

grande número de bactérias, tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas (PRASHAR et al., 2003), incluindo espécies resistentes a antibióticos sintéticos clássicos e ainda frente a leveduras e fungos filamentosos. Alguns estudos mostram que uma maior ou menor efetividade antimicrobiana das especiarias depende do tipo de especiaria, da sua concentração, do tipo e concentração do micro-organismo alvo e da composição do substrato (MARINO; BERSANI; COMI, 2001; OZCAN; ERKMEN, 2001).

As principais vantagens dos óleos como agentes antimicrobianos são sua origem natural e a grande variedade de constituintes que possuem. Por isso, apresentam mais segurança para o consumidor e para o meio ambiente, como também baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana, pois devido à grande variedade de constituintes, os quais, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de ação antimicrobiana, torna-se mais difícil uma possível adaptação dos micro-organismos (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003). Entretanto, devido ao grande número de constituintes, alguns pesquisadores têm sugerido que os óleos não apresentam alvos específicos (BAKKALI et al., 2008; CARSON; MEE; RILEY, 2002).

O sucesso dos testes conduzidos em laboratório sugerindo a aplicação de óleos essenciais em diversos grupos de alimentos (carnes, peixes, produtos lácteos, cereais, frutas e hortaliças) foi relatado por Burt (2004). Skandamis e Nychas (2000) verificaram que em vegetais a atividade antimicrobiana foi beneficiada pela diminuição na temperatura e/ou diminuição do pH do alimento. Geralmente, os vegetais têm um baixo conteúdo de lipídios, o que contribui para o sucesso da aplicação dos óleos, pois na presença de grande quantidade de gordura os compostos terpênicos hidrofóbicos estariam menos disponíveis para interagir com as células bacterianas. Segundo Singh et al. (2002) e Wan, Wilcock e Coventry (1998), todos os óleos essenciais e seus componentes já testados em vegetais demonstraram ser eficazes contra a flora microbiana, como também frente aos patógenos contaminantes, em concentrações de 0,1 – 10 µL/g.

Vários estudos já testaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a *A. hydrophila*, *P. fluorescens* e *L. monocytogenes*. Os óleos essenciais de cravo (0,05 %), coentro (0,125 %), noz moscada (1 %) e pimenta (1,5 %) apresentam atividade antimicrobiana contra *A. hydrophila* (STECCHINI; SARAIS; GIAVEDONI, 1993), *Cymbopogon citratus*, *Mentha arvensis*, *Mentha piperita* e *Eucalyptus globulus*, contra *P. fluorescens* (TYAGI; MALIK, 2010) e *Thymus vulgaris* L., *R. officinalis* L. e *O. vulgare* L. contra *L. monocytogenes* (DIMITRIJEVIĆ et al., 2007). Wan, Wilcock e Coventry (1998) sugerem que o óleo essencial de manjericão ou outras plantas com atividade antimicrobiana

pode oferecer uma alternativa natural para sanitização de vegetais minimamente processados podendo substituir o emprego do cloro.

Dentre os diversos óleos essenciais que apresentam atividade antimicrobiana, o óleo essencial de *O. vulgare* L. tem mostrado destacáveis resultados *in vitro* na inibição de diferentes micro-organismos, como *Candida albicans* e *Candida krusei* (SOUZA et al., 2007), *A. hidrophyla*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella choleraesius*, *S. enterica*, *Serratia mercencens*, *Shigella flexneri*, *S. sonei* e *Y. enterocolitica* (SOUZA; STAMFORD; LIMA, 2006). Estes achados têm motivado a realização de estudos com sistemas alimentares (AZERÊDO et al., 2011; GUTIERREZ et al., 2008; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009), a partir dos quais se pode observar que o óleo essencial de orégano pode ser fortemente influenciado pela composição química do alimento, afetando sobremaneira sua efetividade antimicrobiana.

A espécie *R. officinalis* L., conhecida usualmente como alecrim, é procedente da Região Mediterrânea, pertence à Família *Lamiaceae* e é uma especiaria conhecida desde a antiguidade por seus efeitos medicinais. O óleo essencial é obtido, principalmente, de suas folhas e sumidades floridas (LORENZI; MATOS, 2006). Atualmente, diversos estudos têm apontado tal especiaria como antimicrobiana (AFONSO et al., 2008) e que muitos dos seus compostos são inibidores de micro-organismos como *S. aureus*, *B. subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *P. fluorescens* e *Escherichia coli* (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002).

No estudo realizado por Gachkar et al. (2007), o óleo essencial de alecrim mostrou forte efeito antimicrobiano contra *L. monocytogenes*. Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (1998) encontraram valor de CIM *in vitro* de 0,2 µL/mL contra *L. monocytogenes*. No entanto, Porte e Godoy (2001) alertam que as concentrações de alecrim, para exercerem os efeitos antibacterianos desejados, são maiores que as utilizadas costumeiramente em alimentos para propósitos flavorizantes. Contudo, associados a outros agentes ou procedimentos antimicrobianos, podem contribuir para o controle do crescimento bacteriano em alimentos.

Além da segurança microbiológica, a qual os óleos essenciais parecem atender, as hortaliças minimamente processadas devem apresentar propriedades de um alimento fresco. Este é um fator primordial que norteia a aquisição deste tipo de produto (RAGAERT et al., 2004). Por isso, ao se decidir pela aplicação de óleos essenciais em alimentos, é fundamental se pesquisar o impacto sobre as características sensoriais dos produtos alimentícios durante o armazenamento, uma vez que altas concentrações do óleo, algumas vezes necessárias para

agir como antimicrobiano, podem resultar em odores e sabores desagradáveis ao consumo (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009; NAZER et al., 2005). Segundo Jay (2005) as quantidades dos óleos empregadas em alimentos variam muito conforme o sabor.

Outro fator importante a ser ressaltado é que a ação combinada de óleos e/ou fitoconstituintes pode potencializar o efeito antimicrobiano, como verificado por Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008) e Lambert et al. (2001), quando combinaram óleo de orégano com o de tomilho. Estes resultados suportam a idéia de que, quando usados em combinação, as concentrações requeridas podem ser menores, minimizando assim o impacto sobre os atributos sensoriais. No estudo realizado por Azerêdo et al. (2011) verificou-se efeito sinérgico entre os óleos essenciais de orégano e alecrim, cujos componentes majoritários são, respectivamente, carvacrol e 1,8-cineol, frente à *A. hydrophila*, *L. monocytogenes* e *Y. enterocolitica*, e efeito aditivo contra *P. fluorescens*.

3.3 Fitoconstituíntes carvacrol e 1,8-cineol

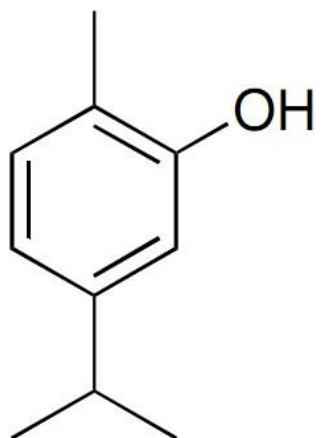
O número de compostos presentes em óleos essenciais pode ser superior a sessenta componentes diferentes. Os principais podem constituir até 80 % do óleo como, por exemplo, o carvacrol no óleo essencial de *O. vulgare* L., e 89 % como, por exemplo, o 1,8-cineol no óleo essencial de *R. officinalis* L. (MARINO; BERSANI; COMI, 2001; PRUDENT et al, 1995), ao passo que outros estão presentes apenas em quantidades traço (SENATORE, 1996). Estudos têm confirmado a atividade antimicrobiana de compostos presentes em óleos essenciais de plantas, especialmente os compostos terpênicos carvacrol (fenol) e 1,8-cineol (óxido) (OLIVEIRA et al., 2010; STOJKOVIC et al., 2011).

O carvacrol (Figura 1), um composto fenólico, apresenta-se como o componente majoritário do óleo essencial de orégano (VALERO; SALMENRÓN, 2003) e provavelmente pode ser o principal responsável pela destacável atividade antimicrobiana de tal produto. Azerêdo et al. (2011) avaliou a composição química do óleo essencial de orégano (*O. vulgare* L.) e encontrou 16 compostos em quantidade superior a 0,1 g/100 g de massa total do óleo, sendo o carvacrol (66,9 g/100 g) o de maior representatividade.

O carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil)fenol) também pode ser denominado isopropil-*o*-cresol, *p*-cimen-2-ol, 2-hidroxi-*p*-cimene, 5-isopropil-2-metilfenol ou iso-timol, possui fórmula química C₁₀H₁₄O e peso molecular de 150,22 g.mol⁻¹. Este composto foi aprovado pela FDA para uso alimentar e foi incluído pelo Council of Europe na lista de aromas

químicos que podem ser adicionadas a gêneros alimentícios em níveis que variam de 2 a 25 ppm (DE VINCENZI et al., 2004).

Figura 1 – Estrutura química de uma molécula de carvacrol.



Fonte: Bakkali et al. (2008).

Aliannis et al. (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum scabrum*, rico em carvacrol (74,86 %), e encontraram valores de CIM variando entre 0,28 e 1,27 mg/mL para diferentes micro-organismos, incluindo bactérias e leveduras. Estes resultados sugerem que a atividade do óleo pode ser atribuída, em grau considerável, a existência, em sua maioria, do carvacrol, que demonstrou possuir atividades semelhantes contra todos os micro-organismos testados (*S. aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. aeruginosa* ATCC 227853, *C. albicans*, *Candida tropicalis* e *Torulopsis glabrata*). Os valores de CIMs do carvacrol oscilaram entre 0,1 a 1,0 mg/mL, sendo *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. tropicalis* os micro-organismos mais resistentes, pois apresentaram os maiores valores de CIM.

Ben Arfa et al. (2006) também avaliaram a capacidade antimicrobiana do carvacrol e obtiveram, pelo método de diluição em caldo, valores de CIM de 0,25 g/L para *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, 1 g/L para *P. fluorescens*, e > 3 g/L para *Lactobacillus plantarum*. No estudo realizado por Kaloustian et al. (2008), a CIM do carvacrol, encontrada por meio da mesma técnica, para ambos micro-organismos testados (*E. coli* ATCC 10536 e *S. aureus* ATCC 6538) foi de 400 µg/mL. Estes autores verificaram que este composto fenólico puro apresentou atividade superior a do óleo essencial de orégano avaliado, que possui 98,3 % de carvacrol em sua composição, além de vestígios de outros

componentes. Oliveira et al. (2010), utilizando o mesmo método, encontraram CIM de 1,25 µL/mL para cepas de *S. aureus* isoladas de diferentes amostras de queijo curado pelos procedimentos padrão.

Dentre os constituintes do óleo essencial de alecrim estão cânfora, 1,8-cineol, α-pineno e borneol (SANTOYO et al., 2005), com destaque para o 1,8-cineol, componente majoritário. Azerêdo et al. (2011) avaliaram a composição química do óleo essencial de alecrim (*R. officinalis* L.), e verificaram a presença de 13 compostos distintos, sendo o 1,8-cineol o composto em maior quantidade representando 32,2 % da massa total do óleo. Baratta et al. (1998) obtiveram um valor de 46,6 % e Wang et al. (2008) de 27,23 %. Em função dessa variação de composição verifica-se a importância do uso de um composto isolado em detrimento do uso do óleo essencial.

O 1,8-cineol (Figura 2) também denominado eucaliptol, 1,3,3-trimetil-2-oxabiciclo[2.2.2.]octano, 1,8-epoxi-*p*-metano ou cajeputol possui fórmula química C₁₀H₁₈O e peso molecular de 154,24 g.mol⁻¹. Foi dado como um composto geralmente reconhecido como seguro pela *Flavor and Extract Manufacturer's Association* (FEMA) em 1965 e aprovado pela FDA para o uso em alimentos (DE VINCENZI et al., 2002).

Figura 2 – Estrutura química de uma molécula de 1,8-cineol.



Fonte: Morais et al. (2006).

Mulyaningsih et al. (2010) obtiveram valores de CIM do 1,8-cineol para 13 micro-organismos, incluindo bactérias Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *Acinetobacter baumanii* ATCC BAA 747), Gram-positivas (*B. subtilis* ATCC 6051, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *S. pyogenes* ATCC 12344, *S. agalactiae* ATCC 27956,

Enterococcus faecalis ATCC 29212) e leveduras (*C. albicans* ATCC 90028 e *C. glabrata* ATCC MYA 2950), variando entre 8 e 64 mg/mL, sendo *S. aureus* o micro-organismo mais resistente. Além disso, constataram que as bactérias Gram-positivas e as leveduras foram mais sensíveis a ação do composto, ou seja, baixas concentrações do antimicrobiano foram capazes de evitar ou pelo menos reduzir seu crescimento. Já Ait-Ouazzou et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana do 1,8-cineol e encontraram valores de CIM superiores a 2,0 µl/mL para *L. monocytogenes* e *E. coli*. Segundo os autores o 1,8-cineol foi pouco eficaz contra *E. coli* em pH 4,0.

Estudo realizado por Stojkovic et al. (2011) teve como objetivo investigar os constituintes químicos dos óleos essenciais obtidos de frutos verdes e maduros, bem como das folhas de *Vitex agnus-castus* L. (alecrim-de-angola, agno-casto, árvore-da-castidade, cordeiro-casto, flor-da-castidade ou pimenteiro-silvestre), além de testar a sua atividade antimicrobiana contra importantes patógenos de plantas, bactérias e fungos patógenos para humanos e animais, e causadores de intoxicação alimentar. O composto majoritário identificado foi o 1,8-cineol, perfazendo cerca de 17,5, 16,3 e 22 % dos óleos essenciais extraídos dos frutos verdes, dos frutos maduros e das folhas, respectivamente.

Os mesmos autores obtiveram valores de CIM do 1,8-cineol pelo método de microdiluição em placas para um grupo de bactérias: 4,0 µg/mL para *Micrococcus flavus* ATCC 9341 e *B. subtilis* ATCC 10907, 5,0 µg/mL para *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 e *S. aureus*, e 6,0 µg/mL para *E. coli* ATCC 35210; e fungos: 5,0 µg/mL para *Penicillium ochrochloron* ATCC 9112, *Penicillium funiculosum* ATCC 36839, *Alternaria alternata* DMS 2006, *Aspergillus ochraceus* ATCC 12066 e *Aspergillus flavus* ATCC 9643, 4,0 µg/mL para *Aspergillus Niger* ATCC 6274, 3,5 µg/mL para *Fusarium tricinctum* CBS 514478 (Holanda) e 7,0 µg/mL para *Trichoderma viride* JCM 22452 (Japão). Os autores concluíram que o 1,8-cineol apresentou atividade antimicrobiana e foi capaz de reduzir a incidência da doença causada por *A. niger*, agente causal da podridão em frutos de maçã, e por isso pode ser utilizado como um composto bioativo para controlar a infecção por este fungo durante o armazenamento de maçã.

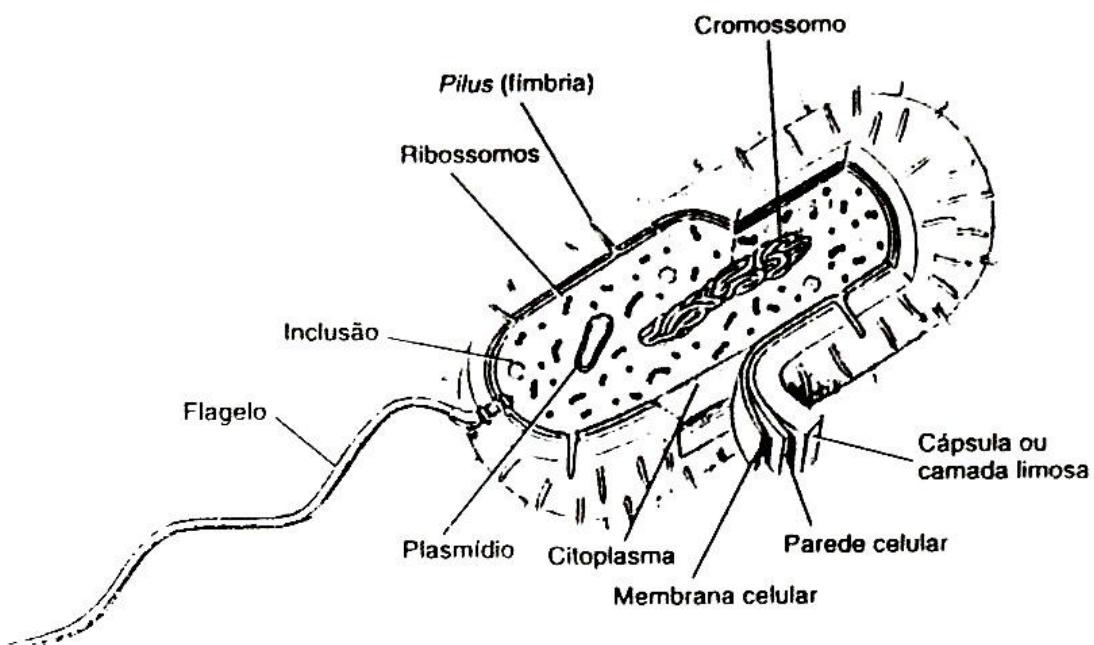
Além do estudo da atividade antimicrobiana destes constituintes é importante também verificar sua influência em características sensoriais dos alimentos onde são empregados. Poucos trabalhos têm enfatizado este aspecto, no entanto, alguns pesquisadores, como Valero e Giner (2006) já testaram a aplicação do carvacrol em concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0 µL/100 mL em caldo de cenoura, e a partir do teste sensorial verificaram que o composto pode influenciar negativamente características sensoriais do alimento. Já Stojkovic et al.

(2011) aplicaram 1,8-cineol em concentrações de 3 µL/mL em maçãs e verificaram que para os provadores as características sensoriais dos frutos permaneceram estáveis independentemente do tempo de armazenamento.

3.4 Mecanismos de ação de fitoconstituíntes

Para o melhor entendimento dos mecanismos pelos quais óleos essenciais e seus fitoconstituíntes levam à morte da célula bacteriana faz-se necessária uma breve revisão acerca de sua composição estrutural básica. Como se sabe a célula bacteriana pode assumir três formas básicas: esférica (coco), haste (bacilo) e espiral (espirilo). Sua principal característica é a ausência de membrana nuclear, por isso são chamados seres procarióticos, diferentemente da célula eucariótica, cujo núcleo é separado do citoplasma por uma membrana. As estruturas de uma célula bacteriana incluem parede celular, membrana citoplasmática, cápsula, órgãos de locomoção (flagelos), pili ou fimbrias e ribossomos (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). Na Figura 3 pode-se visualizar o esquema da estrutura básica de uma célula bacteriana.

Figura 3 – Representação esquemática da célula bacteriana (bacilo com flagelo apolar).



Fonte: Blackburn e McClure (2000).

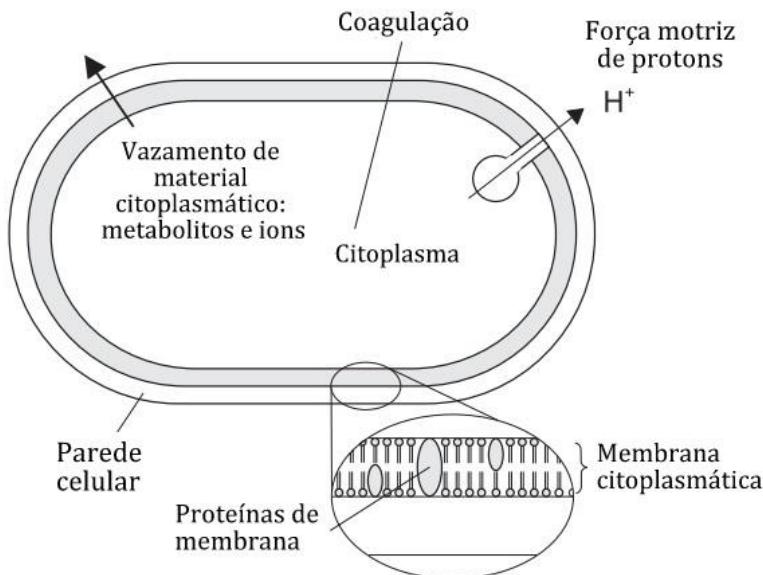
A superfície da célula é responsável pela proteção do seu interior contra perigos externos mantendo a sua integridade. Além disso, permite o transporte de diversas

moléculas (hidratos de carbono, vitaminas, aminoácidos, nucleosídeos e proteínas) para dentro e para fora da célula. A estrutura e composição de diferentes superfícies celulares podem variar consideravelmente dependendo do organismo, sendo as de bactérias Gram-negativas muito mais complexas do que as de células Gram-positivas, pois são compostas de duas membranas e entre elas encontra-se a parede celular composta de poucas camadas de peptideoglicano. Nas Gram-positivas a segunda membrana não existe e a parede celular é várias vezes mais espessa (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). Provavelmente, a presença da segunda membrana lipopolissacarídica, seja o fator que leva alguns pesquisadores a acreditarem que as Gram-negativas são mais resistentes a ação de óleos essenciais e fitoconstituintes, pois isso restringe a difusão dos compostos hidrofóbicos (TAJKARIMI; IBRAHIMA; CLIVER, 2010).

Como citado anteriormente, atribui-se a atividade antimicrobiana de óleos essenciais principalmente aos terpenos presentes em sua composição, como por exemplo, o carvacrol e o 1,8-cineol. Segundo Turina et al. (2006), os possíveis mecanismos de ação são: alteração da bicamada lipídica da membrana celular microbiana, com aumento da permeabilidade e posterior liberação de constituintes intracelulares vitais, além de danos causados nos sistemas enzimáticos do micro-organismo. Acredita-se que estes compostos se dissolvam na membrana microbiana e desta forma penetrem na célula onde podem interagir com mecanismos essenciais para o metabolismo celular (MARINO; BERSANI; COMI, 2001). Na Figura 4 são apresentados os possíveis sítios de ação dos fitoconstituintes na célula bacteriana.

O mecanismo de ação do carvacrol se dá pela sua capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática causando uma considerável perda de Trifosfato de Adenosina (ATP) citoplasmático (ULTEE; SMID, 2001). O aumento da permeabilidade ocorre devido à sua capacidade em se dissolver na bicamada lipídica alinhando-se entre as cadeias de ácidos graxos e levando à distorção e desestabilização da membrana aumentando sua fluidez e resultando no incremento de sua permeabilidade passiva. Esta capacidade é atribuída ao grupo hidroxil (OH) no anel fenólico, particularidade que lhe confere um alto poder reativo (BEN ARFA et al., 2006; MOREIRA et al., 2005; ULTTE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002). O 1,8-cineol também apresenta a propriedade de penetrar na membrana citoplasmática, influenciar em sua permeabilidade e ocasionar a perda de material citoplasmático. Além disso, o sinergismo entre estes dois compostos pode ser explicado pelo fato do grupo oxigenado presente na molécula do 1,8-cineol propiciar um aumento na propriedade antimicrobiana de compostos terpenóides, como por exemplo, o carvacrol (NAIGRE et al., 1996).

Figura 4 – Representação dos locais e mecanismos da célula bacteriana que parecem ser sítios de ação para os compostos presentes em óleos essenciais.



Fonte: Adaptada de Burt (2004).

A partir da perturbação da membrana citoplasmática, além da ruptura do fluxo de elétrons, ocorrem alteração do transporte ativo, inativação da bomba de sódio e potássio, a inibição da atividade de enzimas e a coagulação do conteúdo citoplasmático. Cox et al. (2001) demonstraram que nem todos estes mecanismos ocorrem de forma separada, de modo que alguns deles, possivelmente, possam ser ativados como consequência dos outros mecanismos previamente desencadeados.

É importante ressaltar também que além da inibição do crescimento de células vegetativas, torna-se interessante a supressão da produção de toxinas microbianas, já que elas são capazes de desencadear surtos de doenças transmitidas por alimentos. É sabido que a produção e a excreção de toxinas são processos ativos e a presença do carvacrol, ou de qualquer composto da classe dos terpenos que possua a capacidade de se alojar na membrana citoplasmática e/ou invadir o interior das células bacterianas, pode provocar insuficiência de ATP para secretá-las, devido ao fato das células utilizarem todas as energias disponíveis para sustentar sua viabilidade (ULTEE; SMID, 2001).

O estudo realizado por Gill e Holley (2006) objetivou determinar se o rompimento da membrana celular ocorria quando cepas de *L. monocytogens*, *Lb. sakei* e *E. coli* O157H7 eram expostas a concentrações bactericidas de carvacrol, além de avaliar quais seriam os mecanismos de ação utilizados por este antimicrobiano. Os resultados indicaram claramente que, em concentrações bactericidas, o principal mecanismo de ação do carvacrol frente a *L.*

monocytogenes, *Lb. sakei* e *E. coli* O157H7 foi a ruptura da membrana citoplasmática, o que levou ao aumento de sua permeabilidade. Outros efeitos secundários em concentrações subletais não foram desconsiderados e podem ser esperados como uma consequência de interações na membrana. Estes autores também sugerem que o carvacrol possui atividade inibidora da ATPase.

Storia et al. (2011), realizaram um estudo utilizando Microscopia de Força Atômica (MFA) para investigar o efeito de carvacrol sobre a morfologia das células e modificação da rugosidade da superfície celular de bactérias Gram-positivas (*Brochothrix thermosphacta* 1R2, *Carnobacterium maltaromaticum* 9P, *L. plantarum* 48M e *Listeria innocua* 1770) e Gram-negativas (*E. coli* 32, *Hafnia alvei* 53M, *P. fragi* 25P e *Serratia proteamaculans* 42M) geralmente associadas com alimentos. Os resultados demonstraram que todas as bactérias Gram-negativas, com a exceção de *P. fragi*, apresentaram um maior aumento da rugosidade média após 1 hora de tratamento com 3,3 mM de carvacrol em comparação com as Gram-positivas. Segundo os autores a ação do carvacrol pode tornar os componentes da membrana (por exemplo, proteínas e lipídios) mais expostos a superfície externa, causando um aumento da rugosidade. Em contrapartida, foi verificado também que as superfícies das cepas de bactérias Gram-positivas apresentaram-se mais irregulares. Uma hipótese para explicar este fato seria a de que o carvacrol move-se através da camada de peptidoglicano e depois age na membrana plasmática. As mudanças estruturais na membrana, como a alteração fluidez, poderiam levar a uma ligeira modificação na superfície externa da parede celular destas cepas.

Os autores concluíram, por meio da visualização das imagens 3D obtidas pela MFA, que as células de todas as cepas tratadas com carvacrol exibiram modificações apreciáveis, indicando uma mudança na estrutura da superfície celular. Além disso, verificou-se que houve redução no comprimento, tamanho e diâmetro das células de todas as cepas em resposta ao tratamento com carvacrol. Isto pode ser atribuído ao vazamento de fluidos do citoplasma para o exterior das células.

4 Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos e no Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa - PB; no Laboratório de Microscopia do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife - PE; e no Laboratório de Biologia Celular e Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) – FIOCRUZ, Recife - PE.

4.1 Obtenção dos fitoconstituíntes

Os fitoconstituíntes carvacrol e 1,8-cineol foram obtidos da empresa Sigma Aldrich (Sigma, França). As soluções dos fitoconstituíntes foram preparadas em caldo nutritivo ou em caldo a base de vegetais, com concentrações variando no intervalo de 160 a 0,075 µL/mL, acrescido de ágar bacteriológico (0,15 g/100 mL) como agente estabilizador (BENNIS et al., 2004).

4.2 Obtenção dos micro-organismos teste

L. monocytogenes (ATCC 7644), *A. hydrophila* (INCQS 7966) e *P. fluorescens* (ATCC 11253), obtidas da Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba – UFPB (João Pessoa, Brasil), foram utilizadas como micro-organismos teste nos ensaios antimicrobianos. Culturas estoque foram mantidas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia, India) inclinado sob refrigeração (6 °C).

4.3 Inóculo microbiano

Os inóculos utilizados nos ensaios foram obtidos a partir de suspensões das cepas na fase estacionária de crescimento e preparados por inoculação de duas colônias de cada bactéria a partir de culturas *overnight* cultivadas em ágar BHI (Himedia, India) em 400 mL de caldo BHI e posterior incubação a 35 °C para *L. monocytogenes* e a 28 °C para *A. hydrophila* e *P. fluorescens* por 18 h. Após o período de incubação, as bactérias foram separadas do meio de crescimento por centrifugação a 10,000 x g por 12 min a 4 °C, lavadas duas vezes com

solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, e ressuspendidas em PBS suplementado com Tween 80 a 0,01 g L (Sigma) (PBS-T).

As suspensões foram ajustadas de modo que a densidade óptica de 620 nm (DO_{620}) de uma diluição 1-em-100 fosse de aproximadamente 0,3, que representa aproximadamente 10 log de unidades formadoras de colônias por mililitro (10 log UFC/mL) (CARSON et al., 2002). A suspensão foi diluída seriadamente em PBS ($10^{-1} - 10^{-3}$) para proporcionar uma contagem de células viáveis de cerca de 7 log UFC/mL.

4.4 Preparação do caldo vegetal

Alface (*Lactuca sativa* L.), acelga (*Beta vulgaris* L. var. cicla) e rúcula (*Eruca sativa* L.) foram adquiridas de um mercado atacadista de João Pessoa nos dias das análises e sempre no início da manhã, sendo considerados todos os cuidados para a escolha de hortaliças que não apresentavam quaisquer sinais de alteração de causa biológica, química e/ou física, e transportados dentro de 20 min em caixas isotérmicas com gelo para o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos da UFPB. Uma mistura (1:1:1) das amostras contendo 60 g de cada hortaliça foi triturada com 400 mL de água destilada usando um liquidificador doméstico e filtrada a vácuo utilizando papel de filtro Whatman no. 1. O material obtido foi esterilizado por filtração em Millipore 0,22 μ m (AZERÊDO et al., 2011).

4.5 Ensaio de atividade antimicrobiana

4.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fitoconstituíntes foi determinada por meio da técnica de macrodiluição em caldo. Tubos contendo 4 mL de caldo nutriente (Himedia, India) foram inoculados com 1 mL do inóculo microbiano, misturados com 5 mL da solução do fitoconstituínte e agitados em vortex por 30 segundos. O sistema foi estaticamente incubado por 24 h a 35 °C para *L. monocytogenes* e a 28 °C para *A. hydrophila* e *P. fluorescens*. Os valores de CIM foram definidos como a mais baixa concentração dos fitoconstituíntes requerida para evitar crescimento bacteriano visível (NOSTRO et al., 2001). Frascos isentos dos fitoconstituíntes foram utilizados como controle.

4.5.2 Avaliação do efeito da ação combinada dos fitoconstituíntes

O estudo da natureza do efeito antimicrobiano decorrente da aplicação combinada dos fitoconstituíntes carvacrol e 1,8-cineol frente às cepas microbianas teste foi realizado pela determinação da Concentração Inibitória Fracional (CIF). Para isso, foi utilizado o procedimento de macrodiluição em caldo nutritivo. O valor da CIF foi calculado como segue:

$$\text{CIF} = \frac{\text{CIM do carvacrol em combinação com 1,8-cineol}}{\text{CIM do fitoconstituínte isolado}}$$

Os fitoconstituíntes foram combinados em CIM + CIM; CIM Car + $\frac{1}{2}$ CIM Cin; CIM Cin + $\frac{1}{2}$ CIM Car; CIM Car + $\frac{1}{4}$ CIM Cin; CIM Cin + $\frac{1}{4}$ CIM Car; CIM Car + $\frac{1}{8}$ CIM Cin; CIM Car + $\frac{1}{8}$ CIM Cin; $\frac{1}{2}$ CIM + $\frac{1}{2}$ CIM; $\frac{1}{2}$ CIM Car + $\frac{1}{4}$ CIM Cin; $\frac{1}{2}$ CIM Cin + $\frac{1}{4}$ CIM Car; $\frac{1}{2}$ CIM Car + $\frac{1}{8}$ CIM Cin; $\frac{1}{2}$ CIM Cin + $\frac{1}{8}$ CIM Car; $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM; $\frac{1}{4}$ CIM Car + $\frac{1}{8}$ CIM Cin; $\frac{1}{4}$ CIM Cin + $\frac{1}{8}$ CIM Car e $\frac{1}{8}$ CIM + $\frac{1}{8}$ CIM. A ocorrência do efeito sinérgico foi definido como CIF $\leq 0,5$; adição como CIF $> 0,5$ a 4; e antagonismo como CIF > 4 (AZERÊDO et al., 2011; MACKAY; MILNE; GOULD, 2000; OLIVEIRA et al., 2010).

4.5.3 Influência dos fitoconstituíntes sobre a viabilidade das cepas bacterianas

Os ensaios de interferência dos fitoconstituíntes (isolados e em combinação) sobre a viabilidade das cepas bacterianas foram realizados pelo método de contagem de células viáveis. Para isso, 4 mL de caldo nutritivo foi inoculado com 1 mL da suspensão bacteriana, em seguida adicionado 5 mL da solução dos fitoconstituíntes isolados (CIM) e em combinação ($\frac{1}{8}$ CIM + $\frac{1}{8}$ CIM e $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM), e por fim suavemente agitado por 30 segundos. O sistema foi incubado a 35 °C para *L. monocytogenes* e a 28 °C para *A. hydrophila* e *P. fluorescens*. Em diferentes intervalos de tempos (0, 2, 4, 8, 12 e 24 h) uma alíquota de 1 mL da suspensão foi seriadamente diluída (1:10 v/v) de 10^{-1} a 10^{-5} em PBS e uniformemente inoculada em placas de Petri estéreis contendo ágar nutritivo (Himedia, India) por 24 h a 35 °C ou 28 °C (BARROS et al., 2009). No experimento controle, a solução do fitoconstituínte foi substituída por 5 mL de água destilada estéril. Após o término do período de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL. O efeito de diferentes concentrações dos fitoconstituíntes (isolados e em

combinação) sobre a viabilidade das cepas bacterianas também foi avaliado no caldo de hortaliças. A obtenção do caldo vegetal encontra-se descrito em seção anterior.

4.5.4 Efeito dos fitoconstituíntes sobre a sobrevivência de bactérias potencialmente patogênicas em hortaliças minimamente processadas

Porções de 90 g de um *pool* de alface, acelga e rúcula (em uma proporção de 1:1:1) previamente lavadas com água destilada foram cortadas, utilizando as mãos cobertas por luvas, e inoculadas com as cepas teste de acordo com o procedimento a seguir: a porção de hortaliças foi submersa em 900 mL do inóculo bacteriano (*L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *P. fluorescens* em uma proporção de 1:1:1, aproximadamente 7 log UFC/mL), suavemente agitado com um bastão de vidro estéril por 5 min, para assegurar uma boa inoculação, e secas durante 1 h em uma cabine de biossegurança. Após esse tempo as hortaliças foram submergidas em 250 mL das soluções dos fitoconstituíntes isolados (CIM) e em combinação (1/8 CIM + 1/8 CIM e 1/4 CIM + 1/4 CIM) por 5 minutos a 28 °C. Em seguida, uma amostra de 25 g das hortaliças foi tomada de forma asséptica e transferida para dentro de um saco Stomacher estéril contendo 225 mL de água peptonada estéril (1 g/L) e homogeneizada por 60 s. Posteriormente, uma série de diluições decimais (10^{-2} – 10^{-5}) foi realizada no mesmo diluente e a enumeração de bactérias foi determinada por *spread-plating* 0,1 mL da diluição da amostra apropriada em *Listeria* Selective Agar Base + *Listeria* Selective Supplement II (Himedia, India) a 35 °C (24 h) para contagem de *L. monocytogenes*; *Aeromonas* isolation Medium + *Aeromonas* Selective Supplement (Himedia, India) a 28 °C (48 h) para contagem de *A. hydrophila*; e *Pseudomonas* Agar Base + CFC Supplement (Himedia, India) a 28 °C (48 h) para contagem de *P. fluorescens* (XU et al., 2007).

4.5.5 Efeito dos fitoconstituíntes sobre a microbiota natural de hortaliças minimamente processadas

Porções de 90 g de um *pool* de alface, acelga e rúcula (em uma proporção de 1:1:1) previamente lavadas com água destilada foram cortadas utilizando as mãos cobertas por luvas e imediatamente submergidas em 250 mL das soluções dos fitoconstituíntes isolados (CIM) e em combinação (1/8 CIM + 1/8 CIM e 1/4 CIM + 1/4 CIM) e suavemente agitado por 5 min a 28 °C com um bastão de vidro estéril para garantir a cobertura completa e o máximo de contato das superfícies com as soluções dos fitoconstituíntes. Em seguida, 25 g da amostra

das hortaliças foi tomada de forma asséptica e transferida para dentro de um saco Stomacher estéril contendo 225 mL de água peptonada estéril (1 g/L) e homogeneizada por 60 s. Posteriormente, uma série de diluições decimais de 10^{-2} a 10^{-5} foram feitas no mesmo diluente e a enumeração de bactérias foi realizada por *pour-plating* 1 mL da diluição da amostra apropriada em Plate Count Agar (Himedia, India) a 37 °C (24 – 48 h) para contagem total de bactérias mesófilas e a 6 °C (7 d) para bactérias psicrotróficas, e por *spread-plating* 0,1 mL em Eosyne-Metilen-Blue Agar (Himedia, India) a 37 °C (24 h) para *Enterobacteriaceae* e Sabouraud Agar (Himedia, India) a 28 °C (48 – 72 h) para bolores e leveduras. Os resultados foram expressos em log de UFC/mL (LÓPEZ-GALVÉZ et al., 2010). Frascos controle contendo água destilada foram testados de forma semelhante.

Todos os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos como média dos três ensaios.

4.6 Avaliação Sensorial

Foi realizada pelo teste de aceitação com 50 provadores por dia (N total=150). Os participantes foram funcionários, alunos, professores e visitantes que se encontravam na UFPB nos dias de realização da avaliação sensorial, convidados a participar da pesquisa e que, após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), demonstraram interesse em participar voluntariamente do teste. Portanto, foram selecionados de acordo com seu interesse em participar da pesquisa e, além disso, por possuir o hábito de consumir hortaliças folhosas, ou seja, por serem prováveis consumidores desse tipo de produto.

Porções de 180 g de um *pool* de alface, acelga e rúcula (em uma proporção de 1:1:1), não inoculadas com as bactérias testes, previamente lavadas com água destilada, foram cortadas utilizando-se as mãos cobertas por luvas, submergidas em 500 mL das soluções dos fitoconstituintes isolados (CIM) e em combinação (1/8 CIM + 1/8 CIM), sendo o sistema suavemente agitado por 5 min a 28 °C utilizando-se um bastão de vidro estéril. Em seguida, as hortaliças foram retiradas da solução, drenadas em repouso durante 30 min em temperatura ambiente, colocadas em bandejas de plástico, seladas com filme de polipropileno e armazenadas a 7 °C.

Após 24, 48 e 72 h de armazenamento a 7 °C, o painel de 50 provadores foi conduzido à cabines individuais, com condições controladas de temperatura e iluminação, e servido com 4 amostras, contendo 20 g cada, codificadas com números de três dígitos aleatórios colocadas em pequenos pratos e talheres brancos e servidas imediatamente após serem retiradas do

armazenamento refrigerado. Os provadores foram orientados a consumir bolachas e água para limpar os seus paladares entre as amostras avaliadas. A aceitação da aparência, textura, sabor, odor e percepção geral foi avaliada em uma escala hedônica de 5 pontos, variando de 1 (desgostei extremamente) a 5 (gostei extremamente). Além disso, os provadores foram convidados a avaliar o escurecimento das bordas cortadas e o escurecimento geral do vegetal. A intenção de compra foi avaliada utilizando uma escala hedônica de 5 pontos, variando de 1 (jamais compraria) a 5 (compraria). Amostras das hortaliças não expostas aos fitoconstituíntes foram testados de maneira semelhante como controle (AZERÊDO et al., 2011).

O projeto de pesquisa foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, atendendo a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, aprovado e protocolado sob o número 0217/11.

4.7 Testes de avaliação de possíveis danos causados à célula bacteriana

4.7.1 Microscopia eletrônica de varredura

As cepas teste com crescimento de 18 h (*overnight*) em ágar BHI inclinado foram transferidas para o caldo vegetal e expostas a diferentes concentrações dos fitoconstituíntes isolados (CIM) e em combinação (1/8 CIM + 1/8 CIM e ¼ CIM + ¼ CIM) por 60 min. Em seguida foram separadas do caldo de crescimento por centrifugação a 10.000 x g por 12 min a 4 °C, lavadas em PBS e pré-fixadas em glutaraldeído (0,25 g/L) por 24 h a 4 °C, para as devidas observações microscópicas posteriores. Células bacterianas não expostas aos fitoconstituíntes foram fixadas e observadas da mesma forma como um controle.

Após lavagem as células foram pós-fixadas por 30 min com tetróxido de ósmio (0,01 g/L) em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) e em seguida aderidas à lamínulas de poli-lisina-revestido. As amostras foram desidratadas em etanol em ponto crítico de secagem com CO₂, revestida com uma camada de ouro de 20 nm e observadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 FEG (BATTISTELLI et al., 2005; TYAGI; MALIK, 2010).

4.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão

As cepas teste com crescimento microbiano de 18 h (*overnight*) em ágar BHI inclinado foram transferidas para caldo vegetal e expostas a diferentes concentrações dos

fitoconstituintes isolados (CIM) e em combinação (1/8 CIM + 1/8 CIM e ¼ CIM + ¼ CIM) por 60 min. Em seguida, foram separadas do caldo de crescimento por centrifugação a 10.000 x g por 12 min a 4 °C, lavadas em PBS e pré-fixadas em glutaraldeído (0,25 g/L) por 24 h a 4 °C, desidratadas em uma série graduada de acetona e embebidas por 72 h a 60 °C em resina Poly/Bed 812 (PolySciences, Warrington, PA, USA). Cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas no microscópio eletrônico de transmissão Morgagni 268D (OLIVOTTO et al., 2008). Células bacterianas não expostas aos fitoconstituintes foram fixadas e observadas da mesma forma como um controle.

4.7.3 Microscopia confocal

Células expostas aos fitoconstituintes isolados (CIM) e em combinação (1/8 CIM + 1/8 CIM e ¼ CIM + ¼ CIM) por 15 e 30 min foram coradas com SYTO9 e Iodeto de Propídio (PI) do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) preparado como descrito pelo fabricante. A coloração dupla com PI e SYTO9 foi realizada incubando-se as amostras com 1,50 µM de PI e 250.5 nM de SYTO9 em temperatura ambiente por 15 min. Uma alíquota da suspensão bacteriana exposta a álcool isopropílico (700 mL/L) por 1 h a fim de permeabilizar as membranas celulares, foi usada como um controle positivo de morte celular. Células bacterianas não expostas aos fitoconstituintes foram testadas de maneira semelhante como um controle negativo. As amostras foram observadas utilizando microscópio confocal Leica TCS SP2 AOBS em excitação/emissão de comprimento de onda de 480/500 nm para SYTO 9 e 490/635 nm para iodeto de propídio (LEONARD et al., 2010; OTTO et al., 2010). As imagens coletadas foram analisadas utilizando o programa Lite 2.0. O percentual de células coradas com PI (células danificadas) e SYTO9 (células viáveis) foi determinado por contagem direta de células nos canais vermelho e verde. SYTO9 cora todas as células de verde fluorescente, enquanto PI penetra apenas as células cuja membrana da célula foi danificada, corando-as de vermelho.

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva (média e desvio padrão). O comportamento das variáveis segundo o critério de normalidade da distribuição foi avaliado por meio da aplicação do teste de Kolmogorov-smirnov ($p > 0,05$). Para comparação entre as médias e determinação das diferenças estatisticamente

significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados foi utilizado ANOVA, seguido de testes de estatística inferencial (teste de Duncan). Para o tratamento estatístico utilizou-se o software Sigma-Stat 2.03 e para confecção dos gráficos o software Statistica version 7.

5 Resultados – Artigos Originais

5.1 Artigo 1: Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables.

Artigo aceito para publicação na revista:

International Journal of Food Microbiology (2012)

Fator de Impacto (JCR 2010): 3.143

doi:[10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.026](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.026)

Autores

Jossana Pereira de Sousa

Geíza Alves de Azerêdo

Rayanne de Araújo Torres

Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

Maria Lúcia da Conceição

Evandro Leite de Souza

Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables

Running title: Synergies of phytocompounds to inhibit microorganisms in vegetables

Jossana Pereira de Sousa ^a, Geíza Alves de Azerêdo ^b, Rayanne de Araújo Torres ^c, Margarida Angélica da Silva Vasconcelos ^a, Maria Lúcia da Conceição ^c, Evandro Leite de Souza ^{c*}

^a Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^b Laboratory of Food Microbiology, Federal Institute of Education, Science and Technology of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil

^c Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

* Author for correspondence: Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

e-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Telephone number: + 55 83 3216 7807

Fax number: + 55 83 3216 7094

Abstract

This study assessed the occurrence of an enhancing inhibitory effect of the combined application of carvacrol and 1,8-cineole against bacteria associated with minimally processed vegetables using the determination of Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index, time-kill assay in vegetable broth and application in vegetable matrices. Their effects, individually and in combination, on the sensory characteristics of the vegetables were also determined. Carvacrol and 1,8-cineole displayed Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in a range of 0.6–2.5 and 5–20 µL/mL, respectively, against the organisms studied. FIC indices of the combined application of the compounds were 0.25 against *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*, suggesting a synergic interaction. Application of carvacrol and 1,8-cineole alone (MIC) or in mixture (1/8 MIC + 1/8 MIC or 1/4 MIC + 1/4 MIC) in vegetable broth caused significant decrease ($p < 0.05$) in bacterial count over 24 h. Mixtures of carvacrol and 1,8-cineole reduced ($p < 0.05$) the inocula of all bacteria in vegetable broth and in experimentally inoculated fresh-cut vegetables. Similar efficacy was observed in the reduction of naturally occurring microorganisms in vegetables. Sensory evaluation revealed that the scores of most-evaluated attributes fell between “like slightly” and “neither like nor dislike.” The combination of carvacrol and 1,8-cineole at sub-inhibitory concentrations could constitute an interesting approach to sanitizing minimally processed vegetables.

Keywords: Minimally processed vegetables, phytocompounds, combined application, antibacterial efficacy

1. Introduction

Consumers are currently modifying their eating habits and becoming aware of the relationship between diet and disease prevention. In this context, minimally processed foods (MPF), such as fruits and vegetables, have risen in prominence due to their characteristics of convenience, freshness and good nutritional quality (Zhou et al., 2004). MPF are plant products that go through a process of physical modification, including trimming, peeling or cutting, washing and disinfection, but still retain characteristics of fresh food (Nguyen-The and Carlin, 1994).

New technologies for processing and preserving foods create new routes for environmental contamination and proliferation of microorganisms. With the advent of minimal processing, vegetables have increasingly become one of the food types that can cause

foodborne outbreaks (Skovgaard, 2007) because, while most food processing techniques stabilize the products and extend their shelf life, minimal processing increases their perishability. Moreover, most MPF are consumed raw, representing a potential microbiological safety problem, especially when processed under unsatisfactory sanitary conditions (Gleeson and Beirne, 2005).

By being stored, usually, at low temperatures, minimally processed vegetables may harbor some emerging foodborne pathogens, such as *Aeromonas hydrophila* (Uyttendaele et al., 2004) and *Listeria monocytogenes* (Francis et al., 1999), and spoilage bacteria of the genus *Pseudomonas*, such as *P. fluorescens* (Ragaert et al., 2007). These bacteria are psychrotrophic microorganisms that can grow in refrigerated environments, probably due to a change in their lipid membranes caused by the cold (Beales, 2004).

Therefore, sanitation becomes a critical step in the minimal processing of vegetables affecting the safety, quality and shelf-life of the product. Hypochlorite has been the most widely used sanitizer in food; its use is routine to sanitize minimally processed vegetables in the industry, mainly because of its low cost and ease of use. However, hypochlorite has been cited to have a limited antimicrobial efficacy on the surface of vegetables and has the disadvantage that it can form chlorine compounds (chloramines and trihalomethanes) with potential carcinogenic effects (Martín-Diana et al., 2007). In the last few years, the outbreaks associated with foodborne pathogen contamination in fresh-cut vegetables raised the concerns about the efficacy of chlorine treatment in assuring the safety of these products (Ölmez and Kretzschmar, 2009).

Concern over the negative consumer perception of chemical preservatives has also provoked researchers to investigate the antimicrobial efficacy of natural compounds against food-related pathogenic microorganisms (Skandamis and Nychas, 2000; Singh et al., 2002; Gutierrez et al., 2009). Therefore, the essential oils of plants and their constituents with a wide spectrum of antimicrobial effect have been featured. The plant essential oils are usually mixtures of several components, with monoterpenes constituting approximately 90 g/100g of them (Bakkali et al., 2008).

Several studies have confirmed the antimicrobial activity of compounds present in essential oils, especially the monoterpenes carvacrol and 1,8-cineole (Lambert et al., 2001; Oliveira et al., 2010; Stojkovic et al., 2011). Carvacrol has been identified as the major compound in *Origanum vulgare* L. (oregano) essential oil, while 1,8-cineole is the major compound in *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) essential oil (Azerêdo et al., 2011). According to previous results, carvacrol and 1,8-cineole appear to have no significant or

marginal toxic effects *in vivo* and raise no concerns regarding the possible level of use in foods (Pharmaceutical Codex, 1979; Burt, 2004).

In addition to improving the microbiological safety of minimally processed vegetables, compounds of essential oils should not affect the freshness of these products because changes in organoleptic aspects during storage influence food acceptance by consumers (Zhou et al., 2004). Sometimes, the required amounts of essential oils (and their compounds) to establish the desired antimicrobial efficacy in foods can result in odors and flavors that are unpleasant to the consumer (Gutierrez et al., 2009). The addition of small amounts of compounds of essential oils in combination may be a way to provide the balance between sensory acceptability and antimicrobial efficacy because the combined action of these compounds, even in small quantities, may potentiate their antimicrobial effect (Dimitrijević et al., 2007).

Although some researchers have found that carvacrol and 1,8-cineole have antimicrobial activity against foodborne pathogenic and spoilage bacteria, there is a lack of studies about their antimicrobial effect when applied in combination at sub-inhibitory concentrations. Here we report the investigation of an enhanced antibacterial effect when carvacrol and 1,8-cineole were used in combination against naturally occurring microorganisms and some bacteria associated with the contamination of minimally processed vegetables in food-based broth and food matrices. Moreover, the influence of these compounds on the sensory attributes of minimally processed vegetables during refrigerated storage was investigated.

2. Material and methods

2.1 Antimicrobial agents

The compounds carvacrol and 1,8-cineole were supplied by Sigma Aldrich (Sigma, France). Solutions of the tested compounds were prepared in a range of 160 - 0.075 µL/mL using bacteriological agar (0.15 g/100 mL) as a stabilizing agent (Bennis et al., 2004).

2.2. Bacterial strains

L. monocytogenes ATCC 7644, *A. hydrophila* INCQS 7966 and *P. fluorescens* ATCC 11253, obtained from the Microorganism Collection, Laboratory of Food Microbiology, Federal University of Paraíba (João Pessoa, Brazil), were used as test microorganisms. Stock

cultures were kept on Brain-Heart-Infusion agar (Himedia, India) slants under refrigeration (6 °C).

Unless stated otherwise, inocula used in assays were obtained from suspensions of the strains in the stationary phase of growth and prepared by inoculating two colonies of each bacterium from overnight cultures on Brain-Heart-Infusion agar (Himedia, India) into 400 mL of Brain-Heart-Infusion broth (Himedia, India), which was incubated at 37 °C for 18 h. After incubation, the bacteria were separated from the growth medium by centrifugation at 10,000 x g for 12 min at 4 °C, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), and resuspended in PBS. Suspensions were adjusted so that the optical density at 620 nm (OD₆₂₀) of a 1-in-100 dilution was approximately 0.3, which was approximately of 10 log of colony forming units per milliliter (10 log cfu/mL) (Carson et al., 2002). The suspension was serially diluted in PBS (10⁻¹ - 10⁻²) to provide a viable cell count of approximately 8.0 log cfu/mL.

2.3. Preparation of vegetable broth

Iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.), chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) and rocket (*Eruca sativa* L.) were purchased from a local wholesale market in João Pessoa (Brazil) on the day of harvest and transported within 20 min under refrigerated conditions. A mixture (1:1:1) of the samples containing 60 g of each leafy vegetable was mashed with 400 mL of distilled water using a domestic blender and vacuum filtered using Whatman no. 1 filter paper. The obtained material was sterilized by filtration using a Millipore 0.22 µm filter unit (Azerêdo et al., 2011).

2.4. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

MIC values of the carvacrol and 1,8-cineole were determined using macrodilution in broth. Four milliliters of double strength nutrient broth (Himedia, India) was inoculated with 1 mL of the bacterial inocula, mixed with 5 mL of the phytochemical solution, and vortexed for 30 s. The system was statically incubated for 24 h at 35 °C for *L. monocytogenes* and at 28 °C for *A. hydrophila* and *P. fluorescens*. MIC was defined as the lowest concentration of the phytochemical required to prevent visible bacterial growth (Nostro et al., 2001). Control flasks without the phytochemicals were tested similarly.

2.5. Synergy assays

The assays for the synergy of carvacrol and 1,8-cineole were carried out by determining the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index in nutrient broth using the

macrodilution method. FIC was calculated as follows: MIC of the combination of the phytochemicals/MIC of the phytochemical alone. Phytochemicals were combined at MIC + MIC; MIC + 1/2 MIC; MIC + 1/4 MIC; MIC + 1/8 MIC; 1/2 MIC + 1/2 MIC; 1/2 MIC + 1/4 MIC; 1/2 MIC + 1/8 MIC; 1/4 MIC + 1/4 MIC; 1/4 MIC + 1/8 MIC; and 1/8 MIC + 1/8 MIC. Synergy was FIC \leq 0.5; addition or indifference was FIC > 0.5 to 4; and antagonism was FIC > 4 (Mackay et al., 2000; Oliveira et al., 2010; Azeredo et al., 2011).

2.6. Time-kill assay

The effect of the compounds alone (MIC) and in combination (1/8 MIC + 1/8 MIC) on the cell viability of bacterial strains in vegetable broth over 24 h was evaluated by the viable cell count procedure. For this, 4 mL of vegetable broth was inoculated with 1 mL of the bacterial inocula, and 5 mL of the solution of compounds alone (final concentration of the MIC) or in mixture (final concentration of 1/8 MIC + 1/8 MIC) were added to the system and gently shaken for 30 s. The system was incubated at 37 °C for *L. monocytogenes* and at 28 °C for *A. hydrophila* and *P. fluorescens*. At different time intervals (0, 2, 4, 8, 12 and 24 h), 1 mL of the suspension was serially diluted (10^{-1} - 10^{-5}) in PBS and inoculated on sterile nutrient agar (Himedia, India) Petri dishes for 24 h at 35 °C or 28 °C (Barros et al., 2009). Control flasks without phytochemicals were tested similarly. The results were expressed in the log of cfu/mL.

2.7. Effect of carvacrol and 1,8-cineole on survival of bacteria in fresh vegetables

Portions of 90 g of a pool of iceberg lettuce, chard and rocket (in a rate of 1:1:1) previously washed with sterile distilled water were shredded by glove-covered hands and inoculated with the bacteria according to the following procedure: the portion of vegetables was submerged in 900 mL of the bacterial inoculum (*L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens*, in a ratio of 1:1:1, approximately 7.0 log cfu/mL), softly rotated with a sterile glass stem for 5 min to ensure even inoculation, and air-dried for 1 h in a bio-safety cabinet. After that, the vegetables were submerged in 250 mL of the solutions of antimicrobials alone (MIC) or in mixture (1/8 MIC + 1/8 MIC) for 5 min at 28 °C. Then, a 25 g sample of the vegetables was aseptically taken, transferred into a sterile stomacher bag containing 225 mL of sterile peptone water (1 g/L), and homogenized for 60 s. Subsequently, a decimal dilution series (10^{-2} - 10^{-5}) was made in the same diluent and bacterial enumeration was performed by sepread-plating 0,1 mL of the appropriate sample dilution on *Listeria* Selective Agar Base + *Listeria* Selective Supplement II (Himedia, India) at 37 °C (24 h) for *L. monocytogenes* count;

Aeromonas isolation Medium + *Aeromonas* Selective Supplement (Himedia, India) at 28 °C (48 h) for *A. hydrophila* count; and *Pseudomonas* Agar Base + CFC Supplement (Himedia, India) at 28 °C (48 h) for *P. fluorescens* count (Xu et al., 2007). Control flasks containing sterile distilled water were tested in the same way. The results were expressed in the log of cfu/mL.

2.8. Effect of carvacrol and 1,8-cineole on survival of naturally occurring microorganisms in fresh vegetables

Portions of 90 g of iceberg lettuce, chard and rocket (in a rate of 1:1:1) were shredded by glove-covered hands and immediately submerged in 250 mL of the antimicrobials solutions alone (MIC) or in mixture (1/8 MIC + 1/8 MIC) and softly rotated for 5 min at 28 °C using a sterile glass stem to ensure complete coverage and contact of surfaces with the phytochemicals solutions. Then, a 25 g sample of the vegetables was aseptically taken, transferred into a sterile stomacher bag containing 225 mL of sterile peptone water (1 g/L), and homogenized for 60 s. Subsequently, a decimal dilution series (10^{-2} - 10^{-5}) was made in the same diluent, and enumeration of the natural flora was performed by pour-plating 1 mL of the appropriate sample dilutions on Plate Count Agar (Himedia, India) at 37 °C (24 - 48 h) for total mesophilic bacteria and at 6 °C (7 d) for psychrotrophic bacteria, and by spread-plating 0.1 mL onto Eosyne-Metilen-Blue agar (Himedia, India) at 37 °C (24 h) for *Enterobacteriaceae* and Sabouraud agar (Himedia, India) at 28 °C (48 - 72 h) for fungi. The results were expressed in the log of cfu/mL (López-Galvéz et al., 2010). Control flasks containing sterile distilled water were tested in the same way.

2.9. Sensory evaluation

Sensory evaluation was performed by the acceptance test using 50 experienced members pre-selected according to interest and fresh leafy-vegetable consuming habits. Panelists worked in individual booths with controlled conditions of temperature and lighting. Portions of 180 g of a pool of iceberg lettuce, chard and rocket (in a rate of 1:1:1) previously washed with sterile distilled water were shredded by glove-covered hands, submerged in 500 mL of the phytochemicals solutions alone (MIC) or in mixture (1/8 MIC + 1/8 MIC), softly rotated for 5 min at 28 °C using a sterile glass stem for 5 min, air-dried for 30 min at room temperature, and put on plastic trays sealed with polypropylene film. After 24, 48 and 72 h of storage at 7 °C, the panelists were served with 20 g of each sample coded with three-digit random numbers placed on small white plates, and served immediately after being taken out

of the refrigerated storage. Panelists were asked to use low-salt crackers and water to clean their palates between the assessed samples. The acceptance of appearance, texture, taste, odor and general perception were evaluated on a 5-point hedonic scale, ranging from 1 (dislike very much) to 5 (like very much). Additionally, the panelists were asked to assess the appearance, cut edge vascular tissue browning, overall browning, texture, taste, odor and general perception of the vegetables. The purchasing intention was evaluated using a 5-point hedonic scale, ranging from 1 (certainly would not purchase) to 5 (certainly would purchase). Samples of vegetables without exposure to the phytochemicals were tested similarly as control.

2.10. Reproducibility and statistics

All assays were made in triplicate on three separate occasions, and the results were expressed as an average of the assays. Statistical analysis was performed to determine significant differences ($p < 0.05$) by ANOVA followed by Duncan test using the Sigma stat 3.1 computer program (Azerêdo et al., 2011).

3. Results

3.1 MIC of carvacrol and 1,8-cineole

Results of MIC values of carvacrol and 1,8-cineole against bacteria associated with minimally processed vegetables are presented in Table 1. The MIC values for carvacrol and 1,8-cineole ranged from 0.6 - 2.5 and 5 - 20 $\mu\text{L/mL}$, respectively, against the organisms studied. MIC values of 1,8-cineole were 4- to 32-fold higher than those found for carvacrol. *P. fluorescens* was the microorganism that showed the greatest resistance to carvacrol, while *L. monocytogenes* was the most resistant to 1,8-cineole. MIC values against *A. hydrophila* were the lowest for both tested compounds.

3.2 FIC index of the combined application of carvacrol and 1,8-cineole

FIC indices for the combined application of carvacrol and 1,8-cineole were 0.25 for *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens*, suggesting a synergic interaction of the assayed antimicrobials against these bacteria. The compounds inhibited the growth of bacteria tested when applied up to a combination of 1/8 MIC of carvacrol + 1/8 MIC of 1,8-cineole. Synergy occurs when the phytochemicals applied in combination, even in smaller quantities, present a high activity, higher than application of either phytochemical alone.

Test strains were capable of growth at sub-inhibitory concentrations (1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC) of both compounds when applied alone.

Table 1

Minimum Inhibitory Concentration of carvacrol and 1,8-cineole against bacteria associated to minimally processed vegetables.

Bacterial strains	Compounds (μ L/mL)	
	Carvacrol	1,8-cineole
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	0.6	20
<i>A. hydrophila</i> INCQS 7966	0.6	5
<i>P. fluorescens</i> ATCC 11253	2.5	10

3.3 Time-kill assays

Results of the kill time of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* when exposed to carvacrol and 1,8-cineole, alone and in combination, in vegetable broth over 24 h is given in Figures 1 to 3. The compounds were assayed at their MIC and in the combinations 1/8 MIC + 1/8 MIC and 1/4 MIC + 1/4 MIC. Addition of carvacrol and 1,8-cineole at their MIC values resulted in a significant drop in the bacterial counts over the 24 h of exposure. Values lower than 2 log cycle were found after only 4 h for the tested strains in broth with carvacrol and 1,8-cineole at MIC and at a combination of 1/4 MIC + 1/4 MIC, with the exception of *L. monocytogenes*, when exposed to 1,8-cineole at MIC. Combination of carvacrol with 1,8-cineole at 1/8 MIC + 1/8 MIC provided a reduction of the count of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* to lower than 2 log cycle after a maximum time of 8 h, and no recovery in viable count was noted in the remainder of the evaluated intervals.

No significant difference ($p > 0.05$) was found among the counts of *L. monocytogenes* in the broth with the compounds alone or in combination, except between the combination 1/8 MIC + 1/8 MIC and carvacrol. For *A. hydrophila* and *P. fluorescens*, a significant difference ($p < 0.05$) was only observed between carvacrol at MIC and the combination of carvacrol and 1,8-cineole at 1/8 MIC + 1/8 MIC. Over the evaluated intervals, broths with carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination showed a significantly lower bacterial count ($p < 0.05$) than the control assay. These results show an interesting inhibitory effect of these compounds toward the cell viability of the tested bacteria.

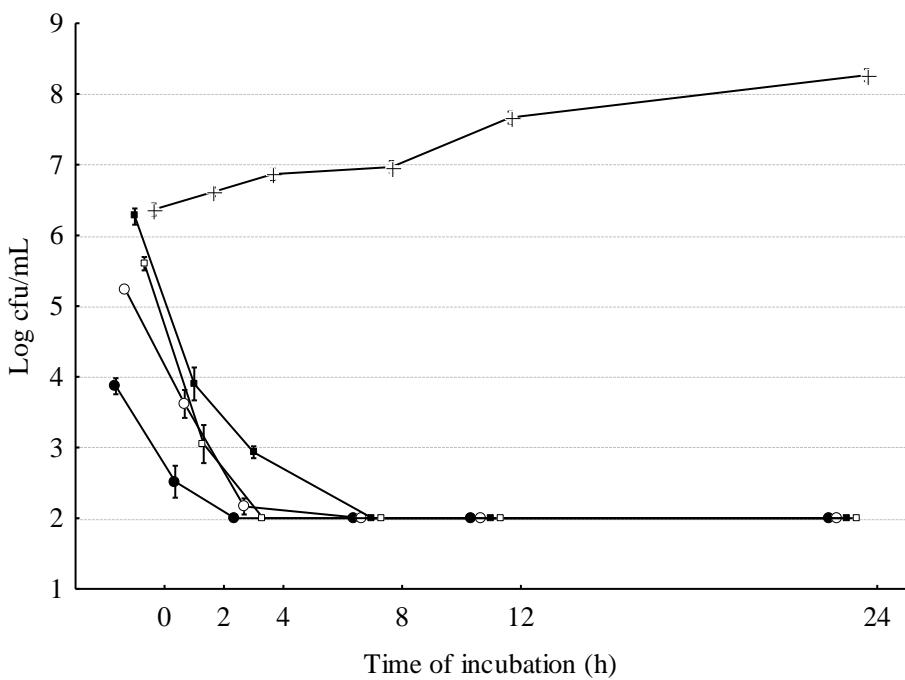


Fig. 1. Viable cell counts of *L. monocytogenes* ATCC 7644 in vegetable broth at 37 °C as a function of antimicrobial concentration: (+): control (0 µL/mL); (●): Carvacrol (MIC: 0.6 µL/mL); (○): 1,8-cineole (MIC: 20 µL/mL); (■): Carvacrol (1/8 MIC: 0.075 µL/mL) + 1,8-cineole (1/8 MIC: 2.5 µL/mL); (□): Carvacrol (1/4 MIC: 0.15 µL/mL) + 1,8-cineole (1/4 MIC: 5 µL/mL). Detection limit of the test: 2.0 log cfu/mL.

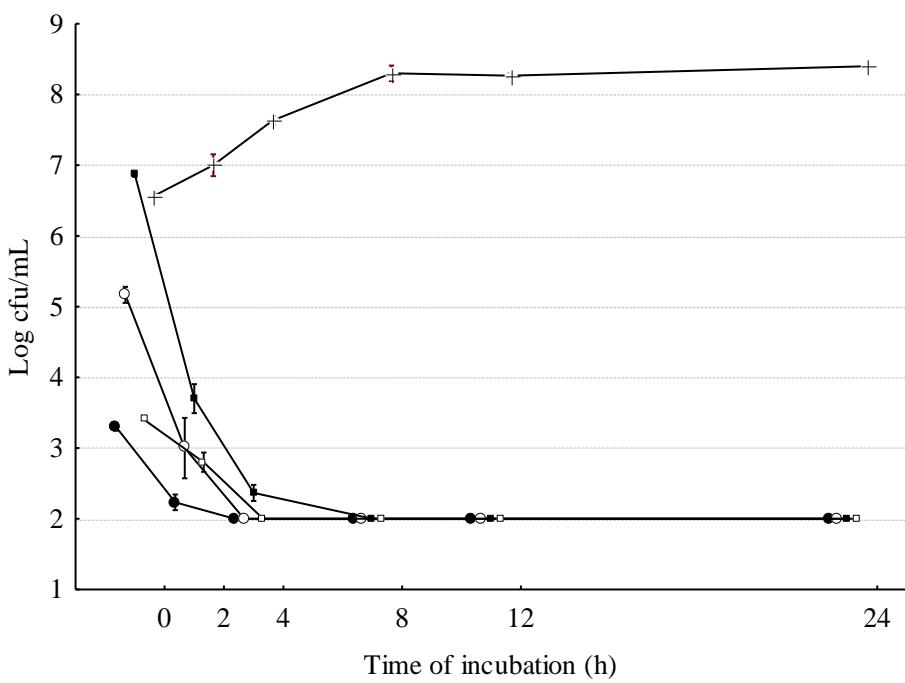


Fig. 2. Viable cell counts of *A. hydrophila* INCQS 7966 in vegetable broth at 28 °C as a function of antimicrobial concentration: (+): control (0 µL/mL); (●): Carvacrol (MIC: 0.6 µL/mL); (○): 1,8-cineole (MIC: 5 µL/mL); (■): Carvacrol (1/8 MIC: 0.075 µL/mL) + 1,8-cineole (1/8 MIC: 0.6 µL/mL); (□): Carvacrol (1/4 MIC: 0.15 µL/mL) + 1,8-cineole (1/4 MIC: 1.25 µL/mL). Detection limit of the test: 2.0 log cfu/mL.

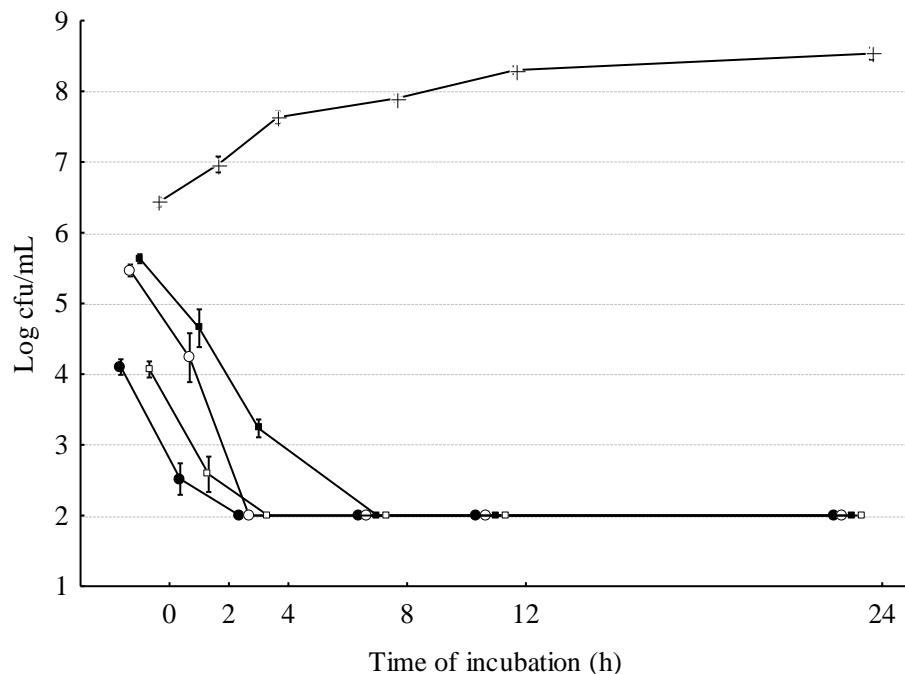


Fig. 3. Viable cell counts of *P. fluorescens* ATCC 11253 in vegetable broth at 28 °C as a function of antimicrobial concentration: (+): control (0 µL/mL); (●): Carvacrol (MIC: 2.5 µL/mL); (○): 1,8-cineole (MIC: 10 µL/mL); (■): Carvacrol (1/8 MIC: 0.3 µL/mL) + 1,8-cineole (1/8 MIC: 1.25 µL/mL); (□): Carvacrol (1/4 MIC: 0.6 µL/mL) + 1,8-cineole (1/4 MIC: 2.5 µL/mL). Detection limit of the test: 2.0 log cfu/mL.

3.4 Effect of carvacrol and 1,8-cineole on survival of bacteria in fresh vegetables

The effect of carvacrol and 1,8-cineole alone and in combination on the counts of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* in experimentally inoculated hand-cut fresh vegetables are shown in Table 2. The application of the compounds alone (MIC) or in combination (sub-inhibitory concentrations, 1/8 MIC + 1/8 MIC; 1/4 MIC + 1/4 MIC) in vegetables caused a significant reduction ($p < 0.05$) in bacterial counts in comparison to the control assay.

Exposure of vegetables to the MIC of carvacrol (0.6 - 2.5 µL/mL) provided the most significant drop in the bacterial counts, which were < 2.0 log cfu/g for all tested bacteria.

These values were significantly lower ($p < 0.05$) than those obtained for 1,8-cineole at MIC and for the mixtures of carvacrol and 1,8-cineole at sub-inhibitory concentrations. The mixture of compounds decreased the initial inocula of all tested bacteria to counts in a range of 2.9 - 7.3 log cfu/g after 5 min of exposure.

Table 2

Counts (log cfu/g) of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* in experimentally inoculated fresh-cut leafy vegetables exposed to carvacrol and 1,8-cineole (alone and in mixture) for 5 mim (28 °C).

Treatment	Bacterial strains		
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>P. fluorescens</i>
	ATCC 7644	INCQS 7966	ATCC 11253
Carvacrol (MIC)	<2.0 ^E	<2.0 ^D	<2.0 ^D
1,8-cineole (MIC)	5.3 ± 0.10 ^D	3.7 ± 0.30 ^C	6.3 ± 0.00 ^B
Mixture I *	7.3 ± 0.20 ^B	5.4 ± 0.10 ^B	4.2 ± 0.10 ^C
Mixture II **	5.8 ± 0.01 ^C	2.9 ± 0.21 ^C	4.3 ± 0.01 ^C
Control/water	8.5 ± 0.01 ^A	7.8 ± 0.30 ^A	7.9 ± 0.01 ^A

* 1/8 MIC of carvacrol + 1/8 MIC of 1,8-cineole

** 1/4 MIC of carvacrol + 1/4 MIC of 1,8-cineole

Means in the same column with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan test.

Detection limit of the test: 2.0 log cfu/g.

3.5 Effects of carvacrol and 1,8-cineole on survival of naturally occurring microorganisms in fresh vegetables

The effects of carvacrol and 1,8-cineole alone and in combination on the counts of mesophilic bacteria, psychrotrophic bacteria, *Enterobacteriaceae* and moulds and yeasts in hand-cut fresh vegetables are shown in Table 3. The application of the compounds alone (MIC values) or in combination (sub-inhibitory concentrations, 1/8 MIC + 1/8 MIC and 1/4 MIC + 1/4 MIC) caused a significant reduction ($p < 0.05$) of the microflora of fresh-cut vegetables in comparison to the control assay.

In accordance with the results found in experimentally inoculated vegetables, the application of carvacrol alone caused the highest decrease in the counts of all assessed groups (or family) of microorganisms. No difference ($p > 0.05$) was found among the counts of

mesophilic organisms in vegetables exposed to carvacrol (MIC), 1,8-cineole (MIC) and to the two combined at 1/4 MIC + 1/4 MIC; and the counts of psychrotrophic bacteria in vegetables exposed to 1,8-cineole (MIC) and both compounds combined at 1/4 MIC + 1/4 MIC.

Table 3

Counts (log cfu/g) of the naturally occurring microorganisms in leafy vegetables exposed to carvacrol and 1,8-cineole (alone and in mixture) for 5 min (28 °C).

Treatment	Microorganisms			
	Mesophilics	Psychrotrophic	Enterobacteriaceae	Moulds and yeasts
Carvacrol (MIC)	3.9 ± 0.06 ^C	<2.0 ^D	2.4 ± 0.1 ^D	<2.0 ^D
1,8-cineole (MIC)	4.3 ± 0.20 ^C	3.5 ± 0.30 ^C	4.5 ± 0.02 ^B	3.2 ± 0.20 ^C
Mixture I *	4.9 ± 0.06 ^B	4.9 ± 0.03 ^B	4.8 ± 0.08 ^B	3.7 ± 0.06 ^B
Mixture II **	4.3 ± 0.20 ^C	3.6 ± 0.07 ^C	3.2 ± 0.30 ^C	<2.6±0.02 ^D
Control/water	6.3 ± 0.03 ^A	6.3 ± 0.08 ^A	6.7 ± 0.09 ^A	4.9 ± 0.10 ^A

* 1/8 MIC of carvacrol + 1/8 MIC of 1,8-cineole

** 1/4 MIC of carvacrol + 1/4 MIC of 1,8-cineole

Means in the same column with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan test.

Detection limit of the test: 2.0 log cfu/g.

3.6 Sensory analysis

Results of the analysis for sensory scores in vegetables sanitized with carvacrol and 1,8-cineole alone and in combination are shown in Table 4. The mean of the most evaluated attributes fell between “like slightly” and “neither like nor dislike” on the hedonic scale for samples treated with compounds alone and in combination. Only for appearance, taste and general perception was a significant difference ($p < 0.05$) observed among the treatments.

Scores for appearance and general perception of the vegetables exposed to 1,8-cineole alone were significantly higher ($p < 0.05$) than those found for the control samples (without exposure to the tested compounds) after 48 h of storage. For carvacrol alone, the score was higher only for taste. The storage time showed an influence mainly on the sensory attributes of vegetables sanitized with the carvacrol alone (MIC). For appearance, cut edge vascular tissue browning and overall browning, the scores fell significantly ($p < 0.05$) from 24 to 48 h, while for odor the scores fell significantly ($p < 0.05$) only after 48 to 72 h. No significant

influence ($p > 0.05$) of the time of storage was observed in the attributes of the vegetables treated with 1,8-cineole alone (MIC).

Table 4

Mean sensory scores (n=50) for minimally processed leafy vegetables sanitized with carvacrol and 1,8-cineole alone and in mixture during refrigerated storage.

Attributes	Time of storage (h)	Carvacrol (MIC)	1,8-Cineole (MIC)	Mixture *	Control
Appearance	24	3.88 ± 1.35 ^{aA}	3.96 ± 1.23 ^{aA}	3.64 ± 1.54 ^{aA}	3.36 ± 1.32 ^{aAB}
	48	3.04 ± 1.31 ^{aB}	3.72 ± 1.33 ^{bA}	3.60 ± 1.41 ^{bA}	3.00 ± 1.40 ^{aA}
	72	3.40 ± 1.46 ^{aAB}	3.60 ± 1.36 ^{aA}	3.42 ± 1.37 ^{aA}	3.66 ± 1.21 ^{aB}
Cut edge vascular tissue browning	24	3.76 ± 1.20 ^{aA}	3.52 ± 1.13 ^{aA}	3.96 ± 1.16 ^{aA}	3.44 ± 1.09 ^{aA}
	48	2.96 ± 0.95 ^{aB}	3.36 ± 1.05 ^{aA}	3.24 ± 0.96 ^{aB}	2.88 ± 1.10 ^{aA}
	72	3.12 ± 1.10 ^{aB}	3.28 ± 1.07 ^{aA}	3.04 ± 0.95 ^{aB}	3.18 ± 1.24 ^{aA}
Overall browning	24	4.20 ± 1.07 ^{aA}	4.04 ± 1.16 ^{aA}	4.08 ± 1.09 ^{aA}	3.76 ± 0.98 ^{aA}
	48	3.64 ± 1.10 ^{aB}	3.88 ± 1.08 ^{aA}	3.84 ± 1.15 ^{aA}	3.64 ± 1.31 ^{aA}
	72	3.68 ± 1.19 ^{aB}	3.72 ± 1.13 ^{aA}	3.56 ± 1.15 ^{aA}	3.64 ± 1.24 ^{aA}
Texture	24	3.84 ± 1.41 ^{aA}	3.80 ± 1.34 ^{aA}	4.04 ± 1.47 ^{aA}	3.56 ± 1.34 ^{aA}
	48	3.48 ± 1.43 ^{aA}	3.84 ± 1.28 ^{aA}	3.80 ± 1.28 ^{aA}	3.32 ± 1.42 ^{aA}
	72	3.28 ± 1.40 ^{aA}	3.60 ± 1.36 ^{aA}	3.92 ± 1.23 ^{aA}	3.92 ± 1.35 ^{aA}
Taste	24	3.76 ± 1.27 ^{aA}	3.76 ± 1.45 ^{aA}	3.84 ± 1.52 ^{aA}	4.00 ± 1.16 ^{aA}
	48	3.92 ± 1.23 ^{bcA}	3.72 ± 1.26 ^{acA}	4.28 ± 1.05 ^{bA}	3.36 ± 1.32 ^{aB}
	72	3.48 ± 1.54 ^{aA}	3.60 ± 1.58 ^{aA}	3.92 ± 1.29 ^{aA}	3.96 ± 1.23 ^{aA}
Odor	24	4.24 ± 1.06 ^{aA}	4.16 ± 1.08 ^{aA}	4.24 ± 1.14 ^{aA}	4.32 ± 0.96 ^{aA}
	48	4.16 ± 0.99 ^{aA}	4.36 ± 0.94 ^{aA}	4.32 ± 1.12 ^{aA}	4.00 ± 1.09 ^{aA}
	72	3.64 ± 1.37 ^{aB}	3.84 ± 1.41 ^{aA}	4.28 ± 1.20 ^{aA}	3.84 ± 1.28 ^{aA}
General perception	24	3.60 ± 1.23 ^{aA}	3.64 ± 1.24 ^{aA}	3.48 ± 1.37 ^{aA}	3.48 ± 1.11 ^{aA}
	48	3.24 ± 1.19 ^{acA}	3.60 ± 1.16 ^{bcA}	3.76 ± 1.21 ^{bA}	3.00 ± 1.28 ^{aA}
	72	3.24 ± 1.38 ^{aA}	3.32 ± 1.36 ^{aA}	3.36 ± 1.26 ^{aA}	3.48 ± 1.18 ^{aA}

* 1/8 MIC carvacrol + 1/8 MIC 1,8-cineole.

Means in the same row with different superscript lowercase letters denote significant differences ($p < 0.05$) between the values obtained for the different treatments according to Duncan test.

Means in the same column with different superscript capital letters denote significant differences ($p < 0.05$) between the values obtained for the different days of storage for each treatment according to Duncan test.

The vegetables exposed to the mixture of carvacrol and 1,8-cineole obtained scores significantly higher ($p < 0.05$) than the control after 48 h of storage and only for cut edge vascular tissue browning a significant reduction ($p < 0.05$) of the scores occurred after 24 h of storage. Vegetables exposed to the mixture of carvacrol and 1,8-cineole also received significantly higher scores ($p < 0.05$) for taste when compared to vegetables exposed to 1,8-cineole alone and for appearance and general perception when compared to vegetables exposed to carvacrol alone.

Only the scores for texture presented no significant difference ($p > 0.05$) among the vegetables exposed to carvacrol and 1,8-cineole, alone and in combination, over the assessed storage periods. When asked to report about the purchase intention, the panelists revealed no difference ($p > 0.05$) with respect to vegetables exposed to carvacrol and 1,8-cineole alone and in combination, after any of the storage times.

4. Discussion

Carvacrol and 1,8-cineole were effective in inhibiting all assayed bacterial strains, although lower MIC values (4- to 32-fold) were observed for carvacrol. The smallest MIC values were observed against *A. hydrophila*, which is considered the gram-negative bacteria more sensitive to essential oils (Burt, 2004), while species belonging to the *Pseudomonas* genera have been cited as the least sensitive to the action of essential oils and their compounds (Storia et al., 2011). Moreover, the findings of this study support the observations of other researchers about the efficacy of carvacrol and 1,8-cineole-containing essential oils in inhibiting the growth of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila*, and *P. fluorescens* (Ouattara et al., 1997; Baratta et al., 1998; Gachkar et al., 2007; Tyagi and Malik, 2010; Azerêdo et al., 2011).

Sandri et al. (2007) evaluated the antimicrobial activity of the essential oils from *Cunila incisa* and *Cunila spicata*, containing 1,8-cineole in concentrations of 42.9 g/100g and 47.9 g/100g, respectively, and found they were able to inhibit the growth of *A. hydrophila* up to 5 mg/mL, and *L. monocytogenes* up to 2.5 - 5 mg/mL.

Delamare et al. (2007), assessing the composition of *Salvia officinalis* and *Salvia triloba* essential oils, found 1,8-cineole as their major compound, with amounts of 14.8 and 15.7 g/100g, respectively. In the same study, these authors found MIC values for *S. officinalis* essential oil of 0.3-0.5 mg/mL against *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 and *Pseudomonas*

fluorescens IBPf-101, while for *S. triloba* essential oil these values were of 3 - 5 mg/mL. Ait-Ouazzou et al. (2011) found MIC values for carvacrol and 1,8-cineole against *L. monocytogenes* of < 2.0 and > 2.0 µL/mL, respectively.

The synergy of carvacrol and 1,8-cineole against bacteria has not been reported before; however, in a previous study, Azerêdo et al. (2011) verified the existence of synergy between the essential oils from *O. vulgare* L. and *R. officinalis* L., which contain carvacrol and 1,8-cineole as major components at 66.9 and 32.2 g/100 g, respectively. Few studies have used FIC calculations for assessing the occurrence of synergy resulting from the mixture of essential oil constituents. According to Santiesteban-Lopez et al. (2007), the synergistic combinations could be useful in reducing the amount of antimicrobials needed to inhibit microbial growth and survival, thus diminishing consumer concerns regarding chemical preservatives.

According to Santiesteban-Lopez et al. (2007), there are some generally accepted mechanisms of antimicrobial interaction that produce synergism: the sequential inhibition of a common biochemical pathway, inhibition of protective enzymes, combinations of cell wall active agents, and the use of cell wall active agents to enhance the uptake of other antimicrobials. On the other hand, there are mechanisms of antimicrobial interaction that produce antagonism. They are less known, although they include combinations of bactericidal and bacteriostatic agents, use of compounds that act on the same target of the microorganism and chemical (direct or indirect) interactions among compounds (Goñi et al., 2009).

Gutierrez et al. (2009) found an additive effect of the combination of *Origanum vulgare* with *Thymus vulgaris*, whose major components are carvacrol and thymol (phenolic compounds), respectively, against *Enterobacter cloacae*, *P. fluorescens* and *Listeria innocua*, and Gutierrez et al. (2008) found additive interaction between oregano and thyme essential oils against *Escherichia coli*, *L. monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*. Mulyaningsih et al. (2010) found an enhancing antimicrobial effect between aromadendrene (sesquiterpene) and 1,8-cineole (monoterpene) against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *S. pyogenes*. Lambert et al. (2001) noted additive effect of mixtures of carvacrol and thymol against *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

It seems reasonable that the combination of compounds with similar structures may exhibit additive or indifference rather than a synergistic effect. The occurrence of additive or indifference interaction between carvacrol and thymol could be related to the similarity in their structures (they are isomers), suggesting a similar mechanism of action. Thus, the increased antimicrobial activity caused by the mixture of carvacrol and 1,8-cineole could be

partially explained by considering the different structure, and therefore possibly different mechanisms of action, for each compound.

The results of the time-kill curves of tested bacteria in vegetable broth with carvacrol and 1,8-cineole alone and combined at selected sub-inhibitory amounts in this study are in accordance with the observations of Azerêdo et al. (2011) who found an intense inhibition of the cell viability of the same bacteria when exposed to the essential oils of *O. vulgare* L. (66.9 g of carvacrol/100 g) and *R. officinalis* L. (32.2 g of 1,8-cineole/100 g) over 24 h.

Taking into account that the sensory shelf life of foods is determined as the time required for a sensory attribute to reach a certain intensity, this study assessed the effect of carvacrol and 1,8-cineole alone (MIC) and in mixture (1/8 MIC + 1/8 MIC) on the sensory characteristics of minimally processed leafy vegetables over refrigerated storage. Some researchers have reported a possible negative influence of the application of essential oils on the sensory characteristics of foods (Valero and Giner, 2006; Gutierrez et al., 2009), but the results of this study revealed that the application of carvacrol and 1,8-cineole, alone or in mixture, in minimally processed leafy vegetables did not negatively influence their sensory attributes when compared to the control assay during the assessed storage period. These results are in accordance with those obtained by Stojkovic et al. (2011) applying 1,8-cineole (3 µL/mL) on apples, when the sensory characteristics of the fruits remained acceptable to the panelists regardless of the assayed concentration of 1,8-cineole and the time of storage.

5. Conclusions

The results presented in this study showed a synergistic effect of carvacrol and 1,8-cineole on the FIC index, kill-time assay and application in fresh leafy vegetables. These essential oil compounds combined at sub-inhibitory concentrations were effective in inhibiting the growth and survival of pathogenic and spoilage microorganisms associated with minimally processed vegetables, although the underlying mode of action remains to be explored in the future. Sensory evaluation suggested that application of the compounds alone or in mixture at sub-inhibitory concentrations as a sanitizer in vegetables would be acceptable to consumers. Our results reinforced the idea that the mixture of essential oil constituents with different structures at sufficiently low concentrations could arise as an alternative to replace synthetic sanitizers classically applied to vegetables and to reach the balance between the demand for microbial safety and organoleptic acceptability.

Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Brazil) for financial support and for a scholarship to the first author.

References

- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C., Pagán, R., 2011. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 320-329.
- Azerêdo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Neto, N.J.G., Oliveira, M.E.G., Souza, E.L., 2011. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International* 44, 1541-1548.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475.
- Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Ruberto, G., 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13, 235-244.
- Barros, J.C., Conceição, M.L., Gomes Neto, N.J., Costa, A.C.V., Souza, E.L., 2009. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT – Food Science and Technology* 42, 1139-1143.
- Beales, N., 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3, 1-20.
- Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., Remmal, A., 2004. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology* 38, 454-458.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assay and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1914-1920.

- Delamare, A.P.L., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S., 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry* 100, 603-608.
- Dimitrijević, S.I., Mihajlovski, K.R., Antonović, D.G., Milanović-Stevanović, M.R., Mijin, D.Ž., 2007. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgares* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chemistry* 104, 774-782.
- Francis, G.A., Thomas, C., Beirne, D.O., 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 34, 1-22.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry* 102, 898-904.
- Gleeson, E., Beirne, D.O., 2005. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control* 16, 677-685.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., Nerín, C., 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry* 116, 982-989.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* 124, 91-97.
- Gutierrez, J., Bourke, P., Lonchamp, J., Barry-Ryan, C., 2009. Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 195-202.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.-J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453-462.
- López-Gálvez, F., Allende, A., Truchado, P., Martínez-Sánchez, A., Tudela, J.A., Selma, M.V., Gil, M.I., 2010. Suitability of aqueous chlorine dioxide versus sodium hypochlorite as an effective sanitizer for preserving quality of fresh-cut lettuce while avoiding by-product formation. *Postharvest Biology and Technology* 55, 53-60.
- Mackay, M.L., Milne, K., Gould, I.M., 2000. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *International Journal Antimicrobial and Agents* 15, 125-129.

- Martín-Diana, A.B., Rico, D., Barry-Ryan, D., Frias, J.M., Henehan, G.T.M., Barat, J.M., 2007. Efficacy of steamer Jet-injection as alternative to chlorine in fresh-cut lettuce. Postharvest Biology and Technology 45, 97-107.
- Mulyaningsih, S., Sporera, F., Zimmermannb, S., Reichlinga, J., Winka, M., 2010. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. Phytomedicine 17, 1061-1066.
- Nguyen-The, C., Carlin, F., 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 34, 371-401.
- Nostro, A., Bisignano, G., Cannatelli, M.A., Crisafi, G., Germano, M.P., Alonzo, V., 2001. Effects of *Helichysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 17, 517-520.
- Oliveira, C.E.V., Stamford, T.L.M., Gomes Neto, N.J., Souza, E.L., 2010. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. International Journal of Food Microbiology 137, 312-316.
- Ölmez, H., Kretzschmar, U., 2009. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. LWT - Food Science and Technology 42, 686-693.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.P., Begin, A., 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. International Journal of Food Microbiology 37, 155-162.
- Pharmaceutical Codex., 1979. Monographie: Eucalyptol, 11th ed. The Pharmaceutical Press, London.
- Ragaert, P., Devlieghere F., Debevere, J., 2007. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. Postharvest Biology and Technology 44, 185-194.
- Sandri, I.G., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A.P.L., Echeverrigaray, S., 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bactéria. Food Chemistry 103, 823-828.
- Santiesteban-Lopez, A., Palou, E., López-Malo, A., 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH. Journal of Applied Microbiology 102, 486-497.

- Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K., Stroshine, R.L., 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. LWT – Food Science and Technology 35, 720-729.
- Skandamis, P.N., Nychas, G.J.E., 2000. Development and evaluation of a model predicting the survival of *E. coli* O157H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. Applied and Environmental Microbiology 66, 1646-1653.
- Skovgaard, N., 2007. New trends in emerging pathogens. International Journal of Food Microbiology 120, 217-224.
- Stojkovic, D., Sokovic, M., Glamoclija J., Dzamic, A., Cirić, A., Ristic, M., Grubišić, D., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. Food Chemistry 128, 1017-1022.
- Storia, A., Ercolini, D., Marinello, F., Pasqua, R., Villani, F., Mauriello, G., 2011. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. Research in Microbiology 162, 164-172.
- Tyagi, A.K., Malik, A., 2010. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. International Journal of Food Microbiology 143, 205-210.
- Uyttendaele, M., Neyts, K., Vanderswalmen, H., Notebaert, E., Debevere, J., 2004. Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water, or thyme essential oil solution. International Journal of Food Microbiology 90, 263-271.
- Valero, M., Giner, M.J., 2006. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. International Journal of Food Microbiology 106, 90-94.
- Xu, W., Qu, W., Huang, K., Guo, F., Yang, J., Zhao, H., Luo, Y., 2007. Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. Postharvest Biology and Technology 45, 126-133.
- Zhou, T., Harrisonm A.D., Mckellar, R., Young, J.C., Odumeru, J., Piyasena, P., 2004. Determination of acceptability and shelf life of ready-to-use lettuce by digital image analysis. Food Research International 37, 875-881.

5.2 Artigo 2: *Carvacrol and 1,8-cineole applied alone and in combination using subinhibitory amounts cause changes in the morphology and membrane permeability of Pseudomonas fluorescens.*

Artigo submetido em Janeiro de 2012 para publicação na revista:

Food Microbiology

Fator de Impacto (JCR 2010): 3.320

Autores

Jossana Pereira de Sousa

Rayanne de Araújo Torres

Geíza Alves de Azerêdo

Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo

Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

Evandro Leite de Souza

Carvacrol and 1,8-cineole applied alone and in combination using subinhibitory amounts cause changes in the morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens*

Running title: The effects of carvacrol and 1,8-cineole on *P. fluorescens*.

Jossana Pereira de Sousa ^a, Rayanne de Araújo Torres ^b, Geíza Alves de Azerêdo ^c, Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo ^d, Margarida Angélica da Silva Vasconcelos ^a, Evandro Leite de Souza ^{b*}

^a Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^b Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

^c Laboratory of Food Microbiology, Federal Institute of Education, Science and Technology of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil

^d Laboratory of Microbiology, Research Center Aggeu Magalhães (CPqAM), FIOCRUZ, Recife, Brazil

* Author for correspondence: Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

e-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Telephone number: + 55 83 3216 7807

Fax number: + 55 83 3216 7094

Abstract

This study investigated the effects of carvacrol (CAR) and 1,8-cineole (CIN) on the morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth following treatment with one phytocompound (CAR: 2.5 µL/mL; CIN: 10 µL/mL) and with combinations of both phytocompounds using subinhibitory concentrations (CAR: 0.3 µL/mL + CIN: 1.25 µL/mL; CAR: 0.6 µL/mL + CIN: 2.5 µL/mL). Electron microscopy of bacterial cells exposed to CAR, CIN and combinations of both revealed the following severe ultrastructural changes after 1 h of exposure: alteration in the cell wall structure, rupture of the plasma membrane, shrinking of the cells, condensation of the cytoplasmic content and leakage of the intracellular material. Confocal scanning laser microscopy revealed increased cell membrane permeability, which resulted in cell death after short exposure times of 15 and 30 min. A combination of subinhibitory concentrations of CAR and CIN could be applied to inhibit the growth of *P. fluorescens* in vegetables.

Keywords: carvacrol, 1,8-cineole, antibacterial effect, *P. fluorescens*, ultrastructural changes.

1. Introduction

Pseudomonas fluorescens is a ubiquitous and aerobic Gram-negative bacillus. The psychrotrophic *P. fluorescens* is capable of growing in the cold environments utilized by the food industry to control bacterial contamination in minimally processed foods, due to this becomes closely related with this type of food and the sanitization is critical to limiting this bacterial contamination (Ragaert et al., 2007). Therefore, efforts to find alternative and effective methods of protecting these foods with natural sanitizers such as essential oils and their constituents have increased (Sousa et al., 2012).

Origanum vulgare L. (oregano) and *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) essential oils have exhibited a strong capability to inhibit the growth and survival of food-related bacteria (Azerêdo et al., 2011; Burt, 2004; Elgayyar et al., 2001). Although more than sixty individual components called phytocompounds are present in these essential oils, the major components can constitute up to 90 % of the oils (Burt, 2004). Carvacrol (CAR) and 1,8-cineole (CIN) are often found as the major compounds in the oregano and rosemary essential oils, respectively (Azerêdo et al., 2011).

In a previous study (Sousa et al., 2012), we reported that the minimum inhibitory concentration (MIC) values of CAR and CIN against *P. fluorescens* ATCC 11253 are 2.5 and 10 µL/mL, respectively. In that same study, analysis of the fractional inhibitory concentration index for the combined application of these phytocompounds suggested a synergistic

interaction against this bacterium and great inhibition in vegetable matrices. The sensory evaluation of vegetables sanitized with a mixture of these compounds using subinhibitory concentrations (1/8 MIC + 1/8 MIC) indicated an increased acceptability of most of the sensory attributes assessed after refrigerated storage when compared to vegetables sanitized with only one of the compounds (at the MIC). In this manuscript, we further analyzed the effects of CAR and CIN on the morphology and membrane permeability of *P. fluorescens* when used alone and in combination at subinhibitory concentrations in a vegetable-based broth.

2. Material and methods

2.1 Phytochemicals

The compounds CAR and CIN were obtained from Sigma Aldrich (Sigma, France), and solutions were prepared in a vegetable broth. Bacteriological agar (0.15 g/100 mL) was used as a stabilizing agent.

2.2 Bacterial strain

P. fluorescens ATCC 11253 was the test microorganism. The stock culture was kept on nutrient agar (NA) slants under refrigeration ($7 \pm 1^{\circ}\text{C}$). The inocula used were obtained from overnight cultures grown on NA slants at 28°C according to a previously described procedure (Carson et al., 2002). The suspensions were adjusted so that the optical density at 620 nm (OD_{620}) of a 1-in-100 dilution was approximately 0.3, which corresponded to approximately 10 log of colony forming units per milliliter (cfu/mL). The suspension was serially diluted in Phosphate-Buffered Saline (PBS) ($10^{-1} - 10^{-3}$) to provide a viable cell count of approximately 7 log cfu/mL.

2.3. Preparation of vegetable broth

Iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.), chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) and rocket (*Eruca sativa* L.) were purchased from a local wholesale market in João Pessoa (Brazil) on the day of harvest and transported within 20 min under refrigerated conditions. A mixture (1:1:1) of the samples containing 60 g of each leafy vegetable was mashed with 400 mL of distilled water using a domestic blender and vacuum filtered using Whatman no. 1 filter paper. The obtained material was sterilized by filtration using a Millipore 0.22 μm filter unit (Azerêdo et al., 2011).

2.4 Scanning electron microscopy (SEM)

The cells exposed to CAR, CIN and combinations of both for 1 h in vegetable broth were harvested by centrifugation at 10 000 x g for 12 min at 4 °C, washed in PBS and fixed for 24 h at 4 °C in PBS with glutaraldehyde (0.25 g/L). The cells were then washed in the same buffer, post-fixed for 30 min with osmium tetroxide (0.01 g/L) in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and allowed to adhere to poly-lysine-coated cover slips. The samples were dehydrated in ethanol, critical-point-dried with CO₂, coated with a 20-nm-thick gold layer and observed with a Quanta 200 FEG (FEI, Hillsboro, OR, USA) scanning electron microscope. The bacterial cells not exposed to the phytocompounds were fixed and observed similarly as a control (Tyagi and Malik, 2010).

2.5 Transmission electron microscopy (TEM)

The cells exposed to CAR, CIN and combinations of both for 1 h in vegetable broth were fixed and post-fixed as described above for the SEM studies, dehydrated in a graded acetone serie and embedded for 72 h at 60°C in Poly/Bed 812 resin (PolySciences, Warrington, PA, USA). The ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Morgagni 268D (FEI, Hillsboro, OR, USA) transmission electron microscope. The bacterial cells not exposed to the phytocompounds were fixed and observed similarly as a control (Pianetti et al., 2009).

2.6 Fluorescent staining method

The cells exposed to CAR, CIN and combinations of both for 15 and 30 min in vegetable broth were stained with the SYTO 9 and propidium iodide (PI) of the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), which was prepared as described by the manufacturer. Double staining with PI and SYTO 9 was performed by incubating the samples with 1.50 µM PI and 250.5 nM SYTO 9 at room temperature for 15 min. One aliquot of the bacterial suspension exposed to isopropyl alcohol (700 mL/L) for 1 h to permeabilize the cell membranes was used as a positive control for cell death. The bacterial cells not exposed to the phytocompounds were tested similarly as a negative control. The samples were observed using the TCS SP2 AOBS confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at the following excitation/emission wavelengths specific for these dyes: 480/500 nm for the SYTO 9 stain and 490/635 nm for the PI stain (Leonard et al., 2010). The images collected were analyzed with the Lite 2.0 software and the percentage of cells stained

with PI (damaged cells) and SYTO 9 (viable cells) was determined by direct cell counting in red and green channels, respectively.

3. Results

3.1 Ultrastructural analysis

SEM and TEM were used to directly observe morphological and ultrastructural changes induced in *P. fluorescens* upon exposure to CAR and CIN for 1 h in a vegetable broth. The cells exposed to CAR, CIN and combinations of both using subinhibitory concentrations underwent considerable morphological alterations. Control cells displayed normal bacillary morphology and cells were whole, turgid and separated from each other at the end of the incubation period (Fig. 1A-B, Fig. 2A-B).

The SEM images of *P. fluorescens* revealed morphological damages due to exposure to the phytocompounds, both alone and in combination, after 1 h of exposure (Fig. 1C-J). The number of normal shaped cells decreased drastically in the treatments with CIN alone (10 µL/mL) and in combination with CAR (CAR: 0.3 µL/mL + CIN: 1.25 µL/mL) (Fig. 1E-F and G-H, respectively), while disappeared completely when treated with CAR alone (2.5 µL/mL) and in combination with CIN (CAR: 0.6 µL/ml + CIN: 2.5 µL/mL) (Fig. 1C-D and I-J, respectively). After exposure to the antimicrobials, the cells appeared shrunken, with a rough cell surface, discrete ridges and wavy surface appearance. The exposure to the phytocompounds also induced the appearance of damaged or ruptured cells and the appearance of projecting cellular material.

TEM revealed that cells exposed to CAR, CIN and combinations of both phytocompounds exhibited changes in the outer membrane, cytoplasmic appearance and cell shape (Fig 2. C-J). These changes included shrinkage, condensation of the cytoplasmic content and detachment of the cell wall from the plasma membrane. Moreover, the disruption of the cell wall resulted in leakage of the intracellular material. Exposure to CAR alone caused cell deformation, an intense condensation of the cytoplasmic material and detachment of the cell wall from the cytoplasmic membrane (Fig. 2C-D). Similar changes were found when the cells were exposed to CIN alone (Fig. 2E-F); however, the condensation of the cytoplasm appeared to be less intense. In the images of the cells treated with the two combinations of the antimicrobials, the same changes previously mentioned can also be noted (Fig. 2G-J), in addition to the loss of cytoplasmic material from the cells (Fig. 2 I-J). The cells grown in control flasks displayed high population densities and appeared normal in shape with intact outer membranes, thick and dense cell walls that were strongly associated with

their plasma membranes and evenly distributed cytoplasm with homogeneous electron-dense material (Fig. 2A-B).

3.2 Confocal scanning laser microscopy

The SYTO 9 stains all cells fluorescent green, while PI penetrates only the cells whose cell membrane has been damaged, staining them red. The control cells exhibited a bright green fluorescence indicative of viable and intact cells throughout the incubation period (Fig 3. A-B). Red-stained cells (approximately 3 per field) were occasionally observed in the control cultures and probably corresponded to senescent bacteria. Exposure to the phytocompounds resulted in a significant change in this profile. The cells treated with CAR, CIN and the combination (CAR: 0.3 μ L/mL + CIN: 1.25 μ L/mL) of both compounds presented a gradual shift in the fluorescence signal from green (live cells) to red (dead cells) (Fig. 3C-H). Conversely, all bacteria exposed to the other combination of the antimicrobials (CAR: 0.6 μ L/mL + CIN: 2.5 μ L/mL) exhibited red fluorescence, indicative of diminished membrane integrity (Fig. 3I-J) after 15 min. All of the cells treated with isopropyl alcohol were PI positive (images not shown).

4. Discussion

This study revealed drastic changes in the morphology and membrane permeability of *P. fluorescens* following exposure to CAR and CIN, applied alone and in combination using subinhibitory amounts. The antimicrobial properties of essential oils have been attributed to their terpene compounds including CAR (phenol) and CIN (oxide), which are the major compounds found in the essential oils of oregano and rosemary, respectively (Azerêdo et al., 2011).

It has been proposed that the compounds present in essential oils exhibit different modes of action that result in the loss of the microbial viability or death. These antimicrobial properties cause the following: a destabilization of the double phospholipid layer, with disruption in the function and the composition of the plasma membrane; an increased permeability and loss of vital intracellular components; the inactivation of the mitochondrial enzymatic mechanism, thereby inhibiting electron transport for energy production, disrupting the proton motive force, protein translocation and synthesis of cellular components; and lysis and eventual cell death (Ben Arfa et al., 2006; Turina et al., 2006).

The components of essential oils may enter the cells through lesions, thereby facilitating the leakage of cellular components and inducing cell lysis. The visualization of the

damage to the cell structure confirms the sensitivity of the outer membrane of *P. fluorescens* to the tested phytocompounds. CAR and CIN appeared to penetrate the cytoplasmic membrane, influencing the membrane permeability and causing the leakage of cytosolic material over a short period of exposure. This finding corroborates a previous study (Tyagi and Malik, 2010) that found that *P. fluorescens* exposed to a combination of four different essential oils vapor, containing a high amount of CIN, and negative air ions had complete leakage of cytoplasmic material within the 4 h exposure time.

Due to its hydrophobic nature, the presence of a free hydroxyl group and a delocalized electron system, the CAR molecule may interfere with the structural and functional properties of bacterial membranes (Ben Arfa et al., 2006). In a previous study (Gill and Holley, 2006), the results clearly indicated that the main mechanism of action of CAR against *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei* and *Escherichia coli* O157H7 was the rupture of the cytoplasmic membrane, leading to increased permeability. The authors also suggested that CAR possesses an ATPase inhibitory activity.

The action of CAR can also make the cell membrane components (proteins and lipids) more exposed to the outer surface, causing an increase in roughness. In addition, structural changes in membrane fluidity could lead to a slight modification on the outer surface of the cell wall of gram-negative bacteria. Moreover, CAR can cause a reduction in the length, size and diameter of the bacterial cells, which is possibly related to a leakage of fluid from the cytoplasm to the outside of the cells (Storia et al., 2011).

It is difficult to understand the exact mechanism underlying the enhanced antimicrobial effect of the combined application of the compounds, although the increased antimicrobial activity caused by the combination of CAR and CIN may partially be explained by considering their different structures. The hydroxyl groups present in CAR enhances its antibacterial properties (Elgayyar et al., 2001) and the oxygenated groups present in CIN are known to increase the antimicrobial properties of terpenoids (Naigre et al., 1996). There are some generally accepted mechanisms of antimicrobial interaction that produce synergism: the sequential inhibition of a common biochemical pathway, the inhibition of protective enzymes, the combinations of cell wall active agents and the use of cell wall active agents to enhance the uptake of other antimicrobials (Santiesteban-Lopez et al., 2007).

Since treatment with CAR and CIN alone and in combination induced significant ultrastructural changes to the bacteria within a short time of exposure, the viability and permeability of treated cells was further investigated by confocal scanning laser microscopy to determine if the same effects could be produced in a shorter incubation time. The

incubation of cells for 15 and 30 min with individual compounds and with combinations of the two compounds rapidly killed the bacteria. Within 30 min, the majority of cells were damaged. These data support the observation that treatment with the tested phytocompounds, alone and in combination, leads to the loss of integrity in the cell wall and the cell membrane, causing cell death even after short incubation times.

5. Conclusions

The phytocompounds CAR and CIN alone and combined at subinhibitory concentrations inhibited the cell viability of *P. fluorescens* in a vegetable-based broth. This antimicrobial property is probably due to bacterial cell wall degradation and membrane damage. This study reveals that the combination of these compounds at subinhibitory amounts could be applied to inhibit the growth of this bacterium in foods, particularly in vegetables.

Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Brazil) for financial support and for a scholarship to the first author.

References

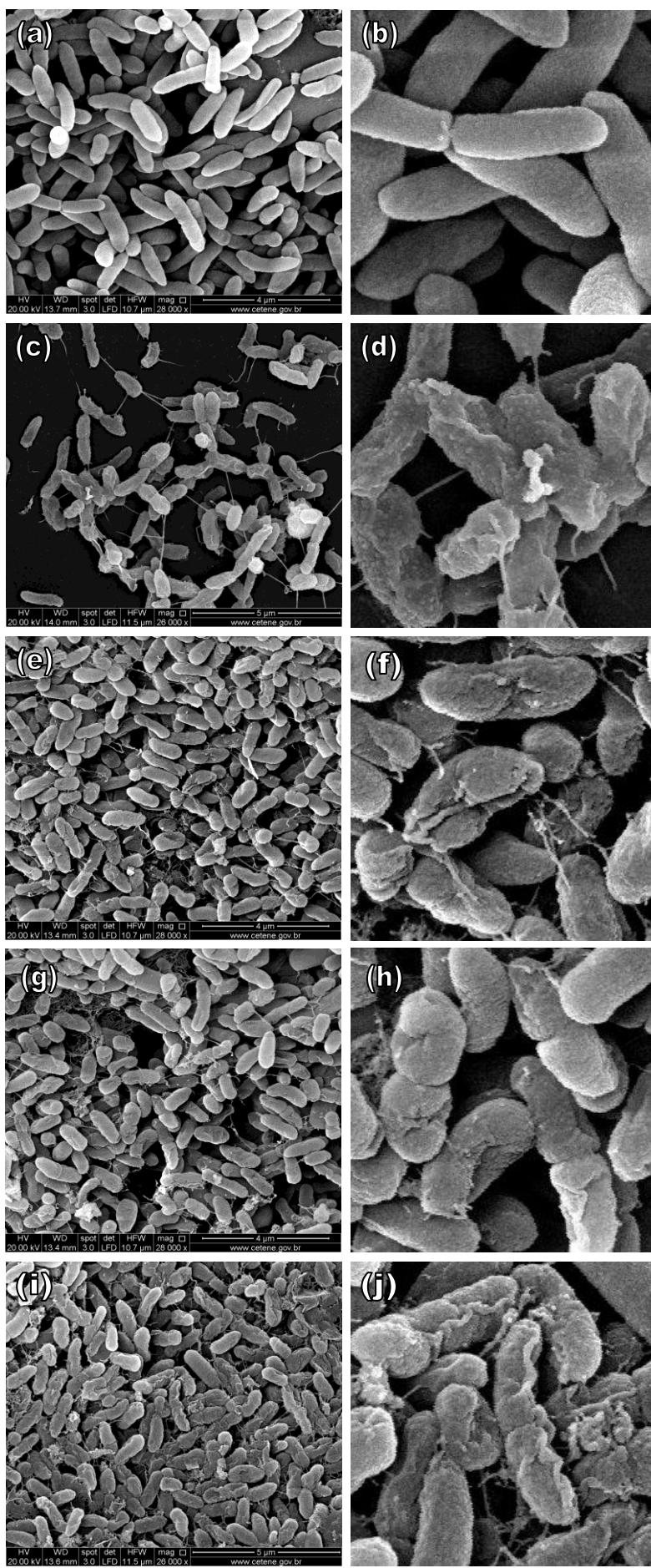
- Azerêdo, G. A., Stamford, T. L. M., Nunes, P. C., Gomes Neto, N. J., Oliveira, M. E. G., & Souza, E. L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, 44, 1541-1548.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 149-154.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assay and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1914-1920.

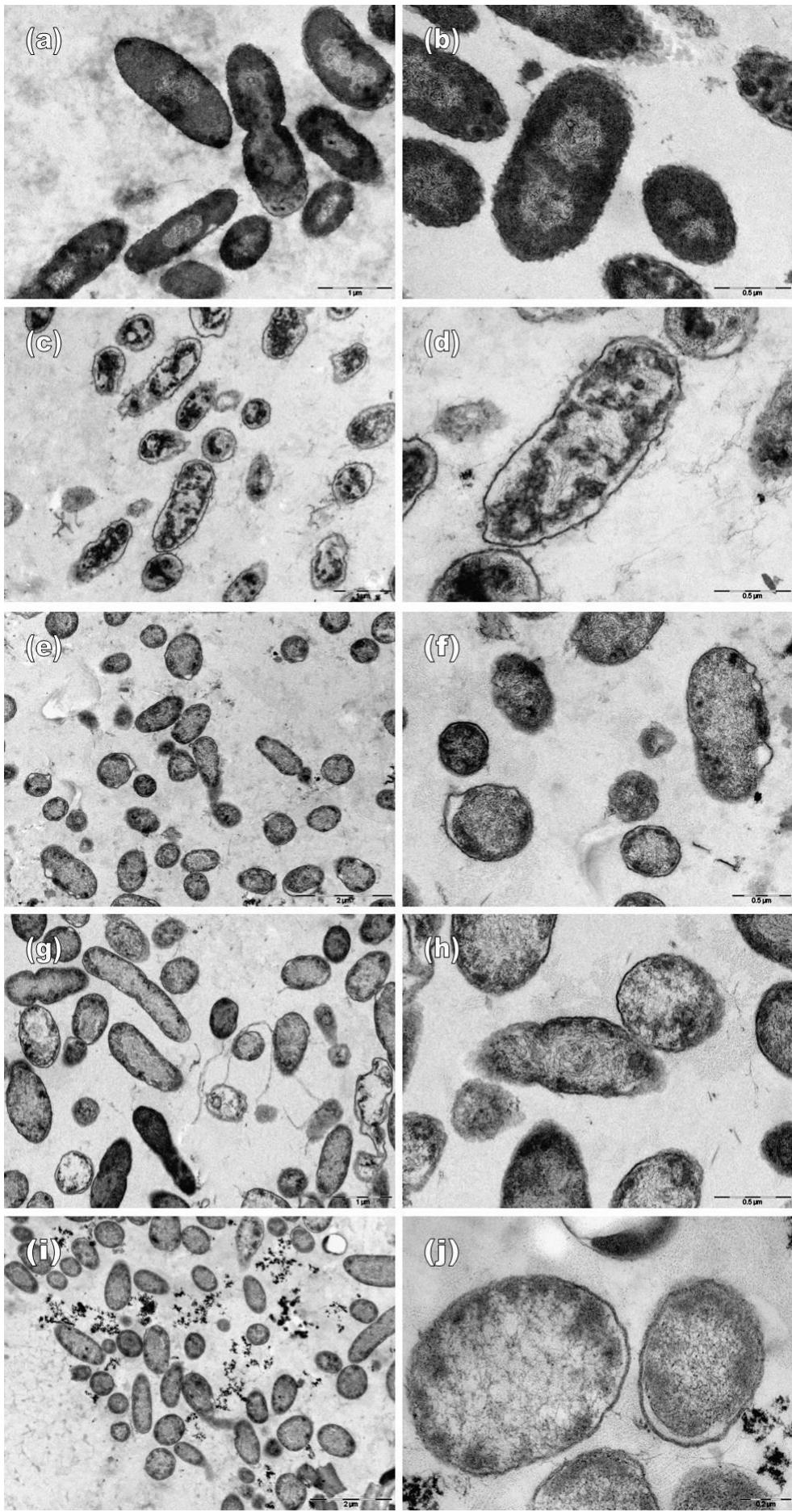
- Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., & Mount, J. R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64, 1019-1024.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 1-9.
- Leonard, C. M., Virijevic, S., Reginier, T., & Combrinck, S. (2010). Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *South African Journal Of Botany*, 76, 676-680.
- Naigre, R., Kalck, P., Roques, C., Roux, I., & Michel, G. (1996). Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Planta Medica*, 62, 275-277.
- Pianetti, A., Battistelli, M., Citterio, B., Parlani, C., Falcieri, E., & Bruscolini, F., Morphological changes of *Aeromonas hydrophila* in response to osmotic stress. *Micron*, 40, 426-433.
- Ragaert, P., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2007). Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 185-194.
- Santiesteban-Lopez, A., Palou, E., & López-Malo, A. (2007). Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 486-497.
- Sousa, J. P., Azerêdo, G. A., Torres, R. A., Conceição, M. L., Vasconcelos, M. A. S., & Souza, E. L. (2012). Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, in press.
- Storia, A., Ercolini, D., Marinello, F., Pasqua, R., Villani, F., & Mauriello, G. (2011). Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Research in Microbiology*, 162, 164-172.
- Turina, A. V., Nolan, M. V., Zyгадло, J. A., & Perillo, M. A. (2006). Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*, 122, 101-113.
- Tyagi, A. K., & Malik, A. (2010). Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 205-210.

Fig. 1. Scanning electron microscopy of *P. fluorescens* ATCC 11253 exposed to CAR and CIN alone and in combination for 1 h in a vegetable-based broth. (A, B) Control cells (0 μ L/mL); (C, D) CAR: 2.5 μ L/mL; (E, F) CIN: 10 μ L/mL; (G, H) CAR: 0.3 μ L/mL + CIN: 1.25 μ L/mL; (I, J) CAR: 0.6 μ L/mL + CIN: 2.5 μ L/mL.

Fig. 2. Transmission electron microscopy of *P. fluorescens* ATCC 11253 exposed to CAR and CIN alone and in combination for 1 h in a vegetable-based broth. (A, B) Control cells (0 μ L/mL); (C, D) CAR: 2.5 μ L/mL; (E, F) CIN: 10 μ L/mL; (G, H) CAR: 0.3 μ L/mL + CIN: 1.25 μ L/mL; (I, J) CAR: 0.6 μ L/mL + CIN: 2.5 μ L/mL.

Fig. 3. Fluorescence microscopy of *P. fluorescens* ATCC 11253 exposed to CAR and CIN alone and in combination for 15 min (left column) and 30 min (right column) in a vegetable-based broth. (A, B) Control cells (0 μ L/mL); (C, D) CAR: 2.5 μ L/mL; (E, F) CIN: 10 μ L/mL; (G, H) CAR: 0.3 μ L/mL + CIN: 1.25 μ L/mL; (I, J) CAR: 0.6 μ L/mL + CIN: 2.5 μ L/mL.

**Fig. 1**

**Fig. 2**

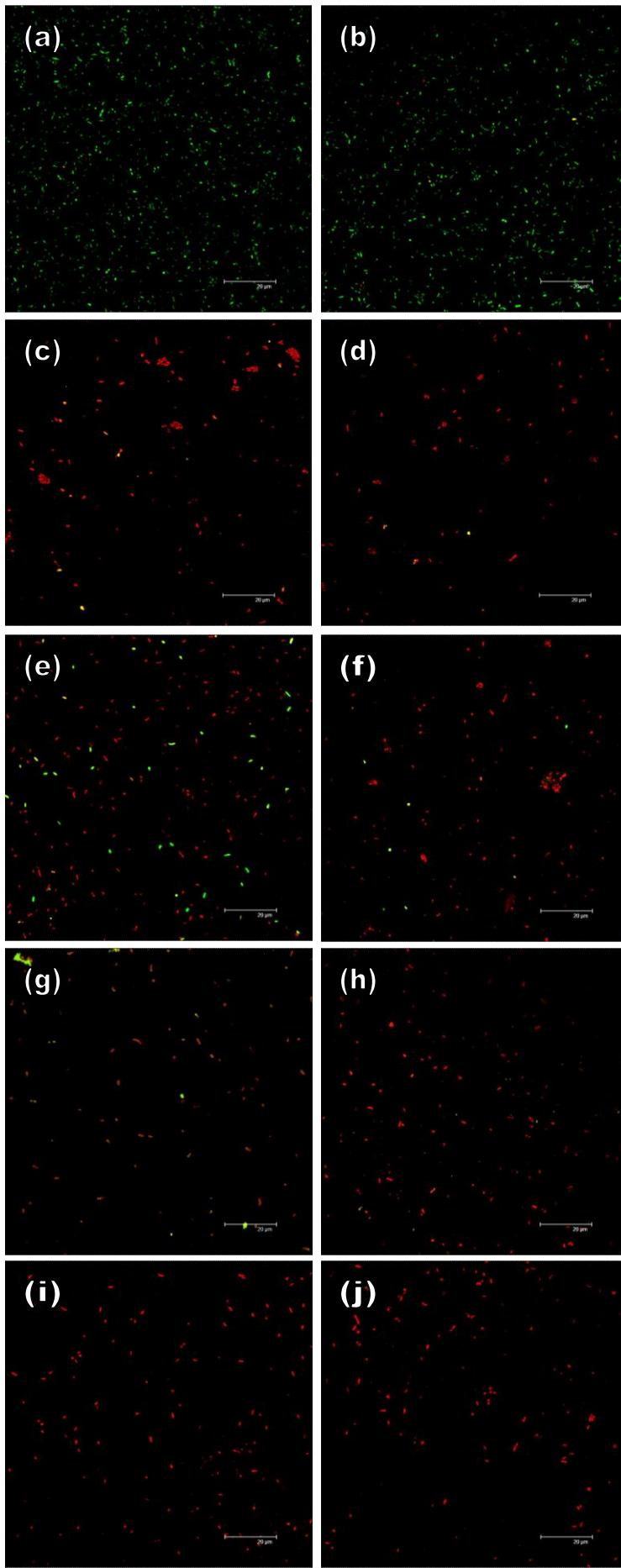


Fig. 3

6 Considerações finais

Os compostos carvacrol e 1,8-cineol mostraram considerável poder de inibição do crescimento e sobrevivência de bactérias pertencentes à microbiota natural de hortaliças e bactérias potencialmente patogênicas de importância em hortaliças folhosas minimamente processadas. Além disso, quando aplicados em combinação em concentrações subinibitórias revelaram efeito sinérgico. Quanto aos aspectos sensoriais das hortaliças tratadas com os fitoconstituíntes, verificou-se que aquelas expostas à combinação do carvacrol e 1,8-cineol receberam as melhores notas no teste de aceitação, sugerindo que sua utilização não alterou negativamente a qualidade sensorial das hortaliças, sendo considerada a mais aceita pelo painel de provadores. As observações da morfologia da célula bacteriana de *P. fluorescens* sugerem que os compostos carvacrol e 1,8-cineol ocasionam danos à membrana citoplasmática e à parede celular da bactéria, o que pode causar lise e morte celular. Diante destes achados, pode-se concluir que a mistura de constituintes de óleos essenciais com atividade antimicrobiana pode ser uma alternativa para substituir sanitizantes sintéticos clássicos e estabelecer um equilíbrio entre a demanda pela segurança microbiológica e a qualidade sensorial de hortaliças minimamente processadas.

Referências

- ACHEN, M.; YOUSEF, A. E. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 1380-1384, 2001.
- AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L. S.; PINTO, J. P. A. N.; XIMENES, B. Atividade antioxidante e antimicrobiana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de tilápia (*Oreochromis* ssp) salgados secos durante o armazenamento congelado. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, p. 12-17, 2008.
- AGUILA, J. S. D.; SASAKI, F. F.; HEIFFIG, L. S.; ONGANELLI, M. G.; GALLO, C. R.; JACOMINO, A. P.; KLUGE, R. A. Determinação da microflora em rabanetes minimamente processados. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 75-78, 2006.
- AIT-OUAZZOU, A.; CHERRAT, L.; ESPINA, L.; LORÁN, S.; ROTA, C.; PAGÁN, R. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 320-329, 2011.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.
- ARES, G.; GIMÉNEZ, A.; GÁMBARO. A. Sensory shelf life estimation of minimally processed lettuce considering two stages of consumers' decision-making process. **Appetite**, v. 50, p. 529-535, 2008.
- ARES, G.; MARTINÉZ, I.; LAREO, C.; LEMA, P. Failure criteria based on consumers' rejection to determine the sensory shelf life of minimally processed lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 255-259, 2008.
- ARTÉS, F.; GÓMEZ, P.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; AGUAYO, E.; ESCALONA, V. Improved strategies for keeping overall quality of fresh-cut produce. **Acta Horticulturae**, v. 746, p. 245-258, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: Informação e documentação – Citações em documentos – Apresentação. Rio de Janeiro, 2002. 7p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12225**: Informação e documentação – Lombada – Apresentação. Rio de Janeiro, 2004. 3p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: Informação e documentação – Trabalhos acadêmicos – Apresentação. Rio de Janeiro, 2011. 11p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6024:** Informação e documentação – Numeração progressiva das seções de um documento escrito – Apresentação. Rio de Janeiro, 2003. 3p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6027:** Informação e documentação – Sumário – Apresentação. Rio de Janeiro, 2003. 2p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6028:** Informação e documentação – Resumo – Apresentação. Rio de Janeiro, 2003. 2p.

AZERÊDO, G. A.; STAMFORD, T. L. M.; NUNES, P. C.; NETO, N. J. G.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUZA, E. L. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541-1548, 2011.

BABIC, I.; ROY, S.; WATADA, A. E.; WERGIN, W. P. Changes in microbial populations on fresh cut spinach. **International Journal of Food and Microbiology**, v. 31, p. 107-119, 1996.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BANERJEE, M.; SARKAR, P.K. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic microorganisms from spices. **Food Microbiology**, v. 21, p. 335-342, 2004.

BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G. RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some essential oils. **Flavour and Frangance Journal**, v. 13, p. 235-244, 1998.

BARROS, J. C.; CONCEIÇÃO, M. L.; GOMES NETO, N. J.; COSTA, A. C. V.; SOUZA, E. L. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 1139-1143, 2009.

BARRY-RYAN, C.; O'BEIRNE, D. Quality and shelf-life of fresh cut carrot slices as affected by slicing method. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 851–856, 1998.

BATTISTELLI, M. R.; DE SANCTIS, R.; DE BELLIS, L.; CUCCHIARINI, M.; GOBI, P. Rhodiola rosea as antioxidant in red blood cells: ultrastructural and hemolytic behavior. **European Journal of Histochemistry** 49, 243–254, 2005.

BAUR, S.; KLAIBER, R.; HAMMES, W. P.; CARLE, R. Sensory and microbiological quality of shredded, packaged iceberg lettuce as affected by pre-washing procedures with chlorinated and ozonated water. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 45-55, 2004.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 1-20, 2004.

BEDIN, C.; GUTKOSKI, S. B.; Wiest, J. M. Atividade antimicrobiana de especiarias. **Higiene Alimentar**, v. 13, p. 26-29, 1999.

BELTRÁN, D.; SELMA, M.; TUDELA, J.; GIL, M. Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging. **Postharvest Biology and Technology**, v. 37, p. 37-46, 2005.

BEN ARFA, A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 149–154, 2006.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology**, v. 37, p. 263-268, 2004.

BENNIS, S.; CHAMI, F.; CHAMI, N.; BOUCHIKHI, T.; REMMAL, A. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 454-458, 2004.

BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 197-201, 2001.

BERIAM, L. O. S. Doenças bacterianas em hortaliças. **Biológico**, v. 69, p. 81-84, 2007.

BETTS, G.; EVERIS, L. **Alternatives to hypochlorite washing systems for the decontamination of fresh fruit and vegetables**. In: JONGEN, W. (Ed.). Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables. Wageningen, The Netherlands, 2005. Parte 3.

BEUCHAT, L. R.; ADLER, B. B.; LANG, M. M. Efficacy of chlorine and a peroxyacetyl acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and Romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1238-1242, 2004.

BEUCHAT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 413-423, 2002.

BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 528-534, 1992.

BLACKBURN, C.; McCLURE, P. **Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control**. England: Cambridge, 2000, 513p.

BROCKLEHURST, T. F.; LUND, B. M. Properties of *Pseudomonas* causing spoilage of vegetables stored at low temperature. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 50, p. 259-266, 1981.

BRULL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.1-17, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CALLISTER, S. M.; AGGER, W. A. Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 249-257, 1987.

CARMICHAEL, I. S.; HARPER, I. S.; COVENTRY, M. J.; TAYLOR, P. W. J.; WAN, J.; HICKEY, M. W. Bacterial colonization and biofilm development on minimally processed vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 45-51, 1999.

CARRASCO, E.; PÉREZ-RODRIGUEZ, F.; VALERO, A.; GARCÍA-GIMENO, R. M.; ZURERA, G. Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. **Food Control**, v. 19, p. 487-494, 2008.

CARSON C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

CASTRO, H. G.; L. O. OLIVEIRA; L. C. A. BARBOSA; F. A. FERREIRA; D. J. H. SILVA; P. R. MOSQUIM; E. A. NASCIMENTO. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de Mentrasto. **Química Nova**, v. 27, p. 55-57, 2004.

COSTA, W. A. **Controle de *Listeria monocytogenes* em couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*) minimamente processada.** 2002, 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.

COSTA, W. A.; VANETTI, M. C. D.; PUSCHMANN, R. Biocontrole de *Listeria monocytogenes* por *Pediococcus acidilactici* em couve minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 785-792, 2009.

COX, S. D. ; MANN, C. M.; MARKHAN, J. L.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. Determination of the antimicrobial action of tea tree oil. **Molecules**, v. 6, p. 87-91, 2001.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44. 2003.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v. 17, p. 474-483, 2006.

DE VICENZI, M.; SILANO, M.; DE VINCENZI, A.; MAIALETTI, F.; SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: eucalyptol. **Fitoterapia**, v. 73, p. 269-275, 2002.

DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A. SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.

DIMITRIJEVIĆ, S. I.; MIHAJLOVSKI, K. R.; ANTONOVIĆ, D. G.; MILANOVIĆ-STEVANOVIĆ, M. R.; MIJIN, D. Ž. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgares* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, v. 104, p. 774-782, 2007.

DURIGAN, J. F. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Fortaleza: Instituto Frutal, 2004. 69 p.

EPA – ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidance Manual – Alternative Disinfectants and Oxidants**: Chlorine Dioxide. USA. p. 4–36. 1999.

ERNANDRES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **Boletim do CEPPA**, v. 25, p. 193-206, 2007.

FARMACOPEIA UFFICIALE DELLA REPUBLICA ITALIANA. X Edizione. Roma: Instituto Poligrafico e Zecco dello Stato, v. 1, p. 206-210, 1998.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables**. 2008. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/ucm064458.htm>>. Acesso em: 07 jun. 2010.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Secondary direct food additives permitted in food for human consumption**. 2002. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/>>. Acesso em: 12 jun. 2010.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Substances generally recognized as safe, proposed rule**. Federal Register 62, v.74, p. 18937-18964, 1997.

FRANCIS, G. A.; THOMAS, C.; O'BEIRNE, D. The microbiological safety of minimally processed vegetables. Review article. **International Journal of Food and Science Technology**, v. 34, p. 1-22, 1999.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. 424p.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI,M. B.; TAGHIZADEH, M.; ALIPOOR ASTANEH, S.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v. 102, p. 898–904, 2007.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborn pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 675-682, 2007.

GARCIA, A.; MOUNT, J. R.; DAVIDSON. P. M. Ozone and chlorine treatment of minimally processed lettuce. **Food Microbiology and Safety**, v. 68, p. 2747-2751, 2003.

GERSHMAN, M. D.; KENNEDY, D. J.; NOBLE-WANG, J.; KIM, C.; GULLION, J.; KACICA, M.; JENSEN, B.; PASCOE, N.; SAIMAN, L.; MCHALE, J.; WILKINS, M.; SCHOONMAKER-BOPP, D.; CLAYTON, J.; ARDUINO, M.; SRINIVASAN, A. Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 1372-1379 , 2008

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 1-9, 2006.

GIMÉNEZ, M.; OLARTE, C.; SANZ, S.; LOMAS, C.; ECHÁVARRI, J. F.; AYALA, F. Relation between spoilage and microbiological quality in minimally processed artichoke packaged with different films. **Food Microbiology**, v. 20, p. 231-242, 2003.

GLEESON, E.; O'BEIRNE, D. Effects of process severity on survival and growth of Escherichia coli and Listeria innocua on minimally processed vegetables. **Food Control**, v. 16, p. 677-685, 2005.

GUAN, T.Y.; BLANK, G.; ISMOND, A.; ACKER, R. V. Fate of foodborn bacterial pathogens in pesticide products. **Journal of the science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 503-512, 2001.

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**, v. 26, p. 142-150, 2009.

GUTIERREZ, J.; RODRIGUEZ, G.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Efficacy of plant essential oils against food-born pathogens and spoilage bacteria associated with ready to eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 1946-1854, 2008.

GUTTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 91-97, 2008.

HAGENMAIER, R. D.; BAKER, R. A. A survey of the microbial population and ethanol content of bagged salad. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 357-359, 1998.

HAMILTON-MILLER, J. M. T.; SHAH, S. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, p. 81-83, 2001.

HAO, Y. Y.; BRACKETT, R. E.; BEUCHAT, L. R.; DOYLE, M. P. Microbiological quality and production of botulinal toxin in film-packaged broccoli, carrots, and green beans. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 499-508, 1999.

HOLLEY, R.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273-292, 2005.

IBGE. **Normas de apresentação tabular.** 3 ed. Rio de Janeiro, 1993. 62p.

ICMSF – INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods:** microbiological testing in food safety management. New York: Kluwer Academic Plenum. v. 7, cap. 11, 2002. 6362p.

IFPA – INTERNATIONAL FRESH-CUT PRODUCE ASSOCIATION. **More than 50 years of growth.** Washington, DC, EUA, p. 18-25, 1999.

JACQUES, M. A.; MORRIS, C. E. Bacterial population-dynamics and decay on leaves of different ages of ready-to-use broad-leaved endive. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 30, p. 221–236, 1995.

JACXSENS, L.; DEVLIEGHERE, F.; RAGAERT, P.; VANNESTE, E.; DEBEVERE, J. Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 263–280, 2003.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KALOUSTIAN, J.; CHEVALIER, J.; MIKAIL, C.; MARTINO, M.; ABOU, L.; VERGNES, M.F. Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. **Phytothérapie**, v. 6, p. 160-164, 2008.

KISSLING, C.R.; CUTTING, J.H.; LOFTIS, M. K.; KISSLING, V. W.; DATA, A.R.; SOFOS, J.N. Antimicrobial resistance of food retailed *Salmonella* isolates. **Journal of Food Protection**, v.65, p. 603-608, 2002.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; CHISM, G. W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. **Journal of Food Safety**, v. 19, p. 17-34, 1999.

KOIVUNEN, J.; HEINONEN – TANSKI, H. Inactivation of enteric micro-organisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. **Water Research**, v. 39, p. 1519-1526, 2005.

KUNIGK, L; ALMEIDA, M. C. B. Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 38-41, 2001.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.-J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

LEE, S. Y.; BAEK, S. Y. Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. **Food Microbiology**, v. 25, p. 582-587, 2008.

LEONARD, C. M.; VIRIJEVIC, S.; REGINIER, T.; COMBRINCK, S. Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 676-680, 2010.

LI, Y.; BRACKETT, R. E.; SHEWFELT, R. L; BEUCHAT, L. R. Changes in appearance and natural microflora on iceberg lettuce treated in warm, chlorinated water and then stored at refrigeration temperature. **Food Microbiology**, v. 18, p. 299-308, 2001.

LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; ALLENDE, A.; TRUCHADO, P.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TUDELA, J. A.; SELMA, M. V.; GIL, M. I. Suitability of aqueous chlorine dioxide versus sodium hypochlorite as an effective sanitizer for preserving quality of fresh-cut lettuce while avoiding by-product formation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, p. 53-60, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. 1 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 512p.

MACKAY, M. L.; MILNE, K.; GOULD, I. M. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. **International Journal Antimicrobial and Agents**, v. 15, n. 2, p. 125-129, 2000.

McMAHON, M. A. S.; WILSON, I. G. The occurrence of enteric pathogens and Aeromonas species in organic vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p.155-162, 2001.

MAISTRO, L. C. Alface minimamente processada: uma revisão. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 219-224, 2001.

MARCHETTI, R.; CASADEI, M. A.; GUERZONI, M. E. Microbial population dynamics in ready-to-use vegetable salads. **Italian Journal of Food Science**, v. 2, p. 97, 1992.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 187-195, 2001.

MARTÍN-DIANA, A. B.; RICO, D.; BARRY-RYAN, D.; FRIAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M.; BARAT, J. M. Efficacy of steamer Jet-injection as alternative to chlorine in fresh-cut lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 97-107, 2007.

MERCIER, J.; LINDOW, S. E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 369-374, 2000.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. **Microbial Physiology**. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 2002. 736 p.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, p. 907-910, 2006.

MORETTI, C. L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Brasília-DF: Ed. EMBRAPA, 2007. 527p.

MORETTI, C. L.; SARGENT, S. A. Alteração de sabor e aroma em tomates causada por impacto. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 385-388, 2000.

MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce foodborne pathogen. **LWT – Food Science and Technology**, v. 38, p. 565-570, 2005.

MULYANINGSIHA, S.; SPORERA, F.; ZIMMERMANNB, S.; REICHLINGA, J.; WINKA, M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1061-1066, 2010.

NAIGRE, R.; KALCK, P.; ROQUES, C.; ROUX, I.; MICHEL, G. Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. **Planta Medica**, v. 62, p. 275-277, 1996.

NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M. P. L. M.; SILVA, K. C. Effects of different disinfection treatments on the natural microbiota of lettuce. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1697-1700, 2003.

NAZER, A. I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZANA, J. -L.; DUBOISS-BRISSONETA, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, v. 22, p. 391-398, 2005.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Plantas medicinais** – guia para profissional de saúde. São Paulo: Premier, 2002. p. 59-63.

NG, J. P; FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Pesticides as a source of microbial of salad vegetables. **International Journal of food Microbiology**, v. 101, p. 237-250, 2005.

NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 371-401, 1994.

NOSTRO, A.; BISIGNANO, G.; CANNATELLI, M.A.; CRISAFI, G.; GERMANO, M.P.; ALONZO, V. Effects of *Helichysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 517-520, 2001.

ODUMERU, J. A.; BOUTER, J.; KNIGHT, K.; LU, X.; MCKELLAR, R. Assessing of a thermal-chemical process to extend the shelf life of ready-to-use lettuce. **Journal of Food Quality**, v. 26, p. 197-209, 2002.

OLIVEIRA, C. E. V.; STAMFORD, T. L. M.; GOMES NETO, N. J.; SOUZA, E. L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 312-316, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, E. G. A.; BERGAMINI, A. M. M.; MARTINIS, E. C. P. Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PC. **Food Microbiology**, v. 27, 19-23, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, V. M.; BERGAMINI, A. M. M.; MARTINIS, E. C. P. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, p. 1400-1403, 2011.

OLIVOTTO, E.; BORZI', R. M.; VITELLOZZI, R.; PAGANI, S.; FACCHINI, A.; BATTISTELLI, M.; PENZO, M.; XIANG, L.; FLAMIGNI, F.; JUN, L.; FALCIERI, E.; FACCHINI, A.; MARKU, K. B. Differential requirements for IKKa and IKKb in the terminal differentiation of primary human osteoarthritic chondrocytes. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, p. 227–239, 2008.

ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 686–693, 2009.

OMAFRA – ONTARIO MINISTRY OF AGRICULTURE, FOOD AND RURAL AFFAIRS. **Minimally Processed Fruit and Vegetables: Good Manufacturing Practices Guidebook**. Toronto, Canada. 2006. 171p.

ONGENG, D.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; COOSEMANS, J.; RYCKEBOER, J. The efficacy of electrolysed oxidising water for inactivating spoilage microorganisms in process water and on minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 187-197, 2006.

OTTO, C. C. CUNNINGHAM, T. M.; HANSEN, M. R.; HAYDEL, S. E. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, p. 26, 2010.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 414-420, 2006.

OZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of essential oil of Turkish plant splices. **European Food Research Technology**, v. 212, p. 658- 660, 2001.

PARISH, M.; BEUCHAT, L.; SUSLOW, T.; HARRIS, L.; GARRET, E.; FARBER, J.; BUSTA, F. Methods to reduce or eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, p. 161-173, 2003.

PARK, W. P.; LEE, D. S. Effect of chlorine treatment on cut watercress and onion. **Journal of Food Quality**, v.18, p. 415-424, 1995.

PHARMACEUTICAL CODEX. **Monographie: Eucalyptol**. 11th ed. The Pharmaceutical Press, London.1979.

PIANETTI, A.; BATTISTELLI, M.; CITTERIO, B.; PARLANI, C.; FALCIERI, E.; BRUSCOLINI, F. Morphological changes of *Aeromonas hydrophila* in response to osmotic stress. **Micron**, v. 40, p. 426-433, 2009.

PINTO, A. R. C. **Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas: uma revisão.** 2007. 36f. Monografia (Especialização em Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Brasília, Centro de Excelência em Turismo, Brasília, DF, 2007.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, p. 193-210, 2001.

PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S.; Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martini*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 569-575, 2003.

PRUDENT, D.; PERINEAU, F.; BESSIÈRE, J. M.; MICHEL, G. M.; BACCOU, J. C. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.) – evaluation of its bacterioatatic and fungistatic properties. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p. 165-173, 1995.

RAGAERT, P.; DEVLEIGHERE F.; DEBEVERE, J. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v.44, p. 185-194, 2007.

RAGAERT, P.; DEVLEIGHERE, F.; DEVUYST, E.; DEWULF, J.; VAN LANGENHOVE, H.; DEBEVERE, J. Volatile metabolite production of spoilage micro-organisms on a mixed-lettuce agar during storage at 7 °C in air and low oxygen atmosphere. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 162-170, 2006.

RAGAERT, P.; VERBEKE, W.; DEVLEIGHERE, F.; DEBEVERE, J. Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. **Food Quality and Preference**, v. 15, p. 259-270, 2004.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2004. 608p.

RICO, D.; MARTÍN-DIANA, A.; FRÍAS, J.; HENEHAN, G.; BARRY-RYAN, C. Effect of ozone and calcium lactate treatments on browning and texture properties of fresh-cut lettuce. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2179-2188, 2006.

ROBBS, P. G.; BARTZ, J. A.; MCFLIE, G.; HODGE, N. C. Causes of decay of fresh-cut celery. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 444–448, 1996.

RODGERS, S.; CASH, J.; SIDDIQ, M.; RYSER, E. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 721-731, 2004.

RUIZ-CRUZ, S.; ACEDO-FELIX, E.; DIAZ-CINCO, M.; ISLAS-OSUNA M.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. Efficacy of sanitizers in reducing *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. **Food Control**, v. 18, p. 1383-1390, 2007.

SADIQ, R.; RODRIGUEZ, M. J. Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and the predictive models for their occurrence: a review. **Science of the Total Environment**, v. 321, p. 21-46, 2004.

SANT'ANA, A.; AZEVEDO, D. P.; COSTA, M.; MACEDO, V. Análise de perigos no processamento mínimo de vegetais. **Higiene Alimentar**, v. 16, p. 50-55, 2002.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, n. 68, p. 790-795, 2005.

SAPERS, G. M. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 5-11, 2001.

SAPERS, G. M.; SIMMONS, G. Hydrogen peroxide disinfection of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 52, p. 48-52, 1998.

SAPERS, G. M. Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruit and vegetable products. In J. S. NOVAK, G. M. SAPERS, & V. K. JUNEJA (Eds.), **Microbial safety of minimally processed foods**. Boca Raton, FL: CRC Press LLC. 2003. 222p.

SEBRAE – SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Hortaliças minimamente processadas** – Série Mercado. SEBRAE/ESPM, 2008. 39p.

SENATORE, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1327-1332, 1996.

SILVA, E. O.; PUSCHMANN, R.; SOARES, N. F. F.; CARNELOSSI, M. A. G.; MORETTI, C. L.; CENCI, S. A. Processamento mínimo de hortaliças no Brasil. In: SIMPOSIO “ESTADO ACTUAL DEL MERCADO DE FRUTOS Y VEGETALES CORTADOS EN IBEROAMÉRICA”, 2004, San José, Costa Rica. **Anais...** São José: CIAD, p. 87-97. 2004.

SILVA, S. R. P.; VERDIN, S. E. F.; PEREIRA, D. C.; SCHATKOSKI, A. M.; ROTT, M. B.; CORÇÃO, G. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 594-598, 2007.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 309-316, 2008.

SINGH, N.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; STROSHINE, R. L. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. **LWT – Food Science and Technology**, v. 35, p. 720-729, 2002.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Development and evaluation of a model predicting the survival of *E. coli* O157H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various

temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1646-1653, 2000.

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G. J. E. Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 31-35, 2000.

SKOVGAARD, N. New trends in emerging pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 217-224, 2007.

SMALL, D. A.; CHANG, W.; TOGHROL, F.; BENTLY, W. E. Comparative global transcription analysis of sodium hypochlorite, peracetic acid, and hydrogen peroxide on *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 1093-1105, 2007.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Food Microbiology** v. 26, p. 118-122, 1998.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 527-532, 2006.

SOUZA, E.L.; LIMA, E.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUSA, C.P. Inhibition action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 2, p. 245-250, 2005.

SOUZA, E L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, p. 409-413, 2007.

STECCHINI, M. L.; SARAIS, I.; GIAVEDONI, P. Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 406-409, 1993.

STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M.; GLAMOCLJA J.; DZAMIC, A.; CIRIC, A.; RISTIC, M.; GRUBIŠIC, D. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. **Food Chemistry**, v. 128, p. 1017-1022, 2011.

STORIA, A.; ERCOLINI, D.; MARINELLO, F.; PASQUA, R.; VILLANI, F.; MAURIELLO, G. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 164-172, 2011.

SUSLOW, T. **Post harvest chlorination:** basic properties and key points for effective disaffection. University of California. 1997. Disponível em: <<http://danrcs.ucdavis.edu>>. Acesso em: 17 jul. 2010.

SUSLOW, T. **Microbial food safety is your responsibility!** University of California, Vegetable Research Information Center, 2002. 7 p.

- TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. S.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199-1218, 2010.
- TOIVONEN, P.M.A. Non-ethylene, non-respiratory volatiles in harvested fruits and vegetables: their occurrence, biological activity and control. **Postharvest Biology and Technology**, v. 12, p. 109–125, 1997.
- TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 542-545, 2009.
- TURINA, A. V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101-113, 2006.
- TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 205-210, 2010.
- ULTEE, A.; BENNINK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1561-1568, 2002.
- ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 373-378, 2001.
- UYTTENDAELE, M.; NEYTS, K.; VANDERSWALMEN, H.; NOTEBAERT, E.; DEBEVERE, J. Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water, or thyme essential oil solution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 263-271, 2004.
- VANETTI, M. C. D. Controle microbiológico e higiene no processamento mínimo. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 2, 2000, Viçosa, **Palestras...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. p. 44-52.
- VALERO, M., FRANCÈS, E. Synergistic bactericidal effect of carvacrol cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. **Food Microbiology**, v. 23, p. 68-73, 2006.
- VALERO, M., GINER, M.J. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 90-94, 2006.
- VALERO, M.; SALMERON, M. C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 1-2, p.73-81, 2003.
- VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin

B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 145-154, 2003.

VITTI, M. C. D.; KLUGE, R. A.; JACOMINO, A. P. Comportamento da beterraba minimamente processada em diferentes espessuras de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 623-626, 2003.

WAGNER, M.; BRUMELIS, D.; GEHR, R. Disinfection of waste water by hydrogen peroxide or peracetic acid: development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent. **Water Environment Research**, v. 74, p. 33-50, 2002.

WANG, W.; WU, N.; ZU, Y. G.; FU, Y. J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1019-1022, 2008.

WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M.J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 152-158, 1998.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne diseases, emerging**. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en/>>. Acesso em: 04 ago. 2010.

XANTHOPOULOS, V.; TZANETAKIS, N; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Occurrence and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in minimally processed fresh vegetable salads. **Food Control**, v. 21, p. 393–398, 2010.

XU, W.; QU, W.; HUANG, K.; GUO, F.; YANG, J.; ZHAO, H.; LUO, Y. Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 126-133, 2007.

ZAGORY, D. **Sanitation concerns in the fresh-cut fruit and vegetable industry**. In Annual Postharvest Conference & Trade Show, 16, 2000. Washington State University, March 14 & 15, Yakima Convention Center, 2000.

ZHOU, T.; HARRISONM A. D.; McKELLAR, R.; YOUNG, J. C.; ODUMERU, J.; PIYASENA, P. Determination of acceptability and shelf life of ready-to-use lettuce by digital image analysis. **Food Research International**, v. 37, p. 875-881, 2004.

Apêndices

APÊNDICE A – Termo do Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa busca informações acerca da eficácia do processo de higienização, ou seja, redução da carga microbiana, de hortaliças minimamente processadas, por meio do uso de compostos presentes em óleos essenciais (substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas ou especiarias, como por exemplo, orégano, alecrim, cravo, canela e etc.), assim como do seu impacto em características sensoriais desse tipo de produto, e vem sendo desenvolvida por Jossana Pereira de Sousa, aluna da Pós-Graduação em Nutrição (Mestrado) pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob a orientação dos professores doutores Evandro Leite de Souza – UFPB e Margarida Angélica da Silva Vasconcelos - UFPE.

Objetivo do estudo:

Avaliar o potencial de aplicação dos fitoconstituíntes carvacrol e 1,8-cineol, componentes majoritários dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L., respectivamente, como sanitizantes naturais em hortaliças minimamente processadas.

Solicitamos a sua colaboração na avaliação sensorial, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica, bem como da realização de imagens (fotos). Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Só deve participar desta pesquisa quem for consumidor de hortaliças.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o (a) senhor (a) não é obrigado (a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador (a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição.

Os pesquisadores estarão à sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido (a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados.

Assinatura do Participante da Pesquisa
ou Responsável Legal

Assinatura da Testemunha

Contato com o Pesquisador (a) Responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o (a) Pesquisador (a) Jossana Pereira de Sousa.

Telefone: (83) 8882-1506

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – Bloco Arnaldo Tavares, sala 812, CEP – 58051-900, João Pessoa/PB

Telefone: (83) 3216-7791

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Participante

Anexos

ANEXO A – Aceite do Artigo 1

----- Mensagem Original -----

Assunto: Your Submission

De: "Vijay K. Juneja" <vjuneja1207@yahoo.com>

Data: Sab, Dezembro 17, 2011 2:33 pm

Para: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Ms. Ref. No.: FOOD-D-11-00780R2

Title: Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bactéria associated with minimally processed vegetables

International Journal of Food Microbiology

Dear Souza,

I am pleased to inform you that your paper "Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables" has been accepted for publication in International Journal of Food Microbiology.

Further information on the handling of your manuscript as well as the scheduled time of publication may be obtained at: <http://authors.elsevier.com>

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Yours sincerely,

Vijay K. Juneja

Editor

International Journal of Food Microbiology

ANEXO B – Submissão do Artigo 2

----- Mensagem Original -----

Assunto: Submission Confirmation

De: "Food Microbiology" <esubmissionsupport@elsevier.com>

Data: Ter, Janeiro 10, 2012 2:21 pm

Para: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Dear Evandro,

Your submission entitled "Carvacrol and 1,8-cineole applied alone and in combination using subinhibitory amounts cause changes in the morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens*" has been received by Food Microbiology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/fm/>.

Your username is: evandroleitesouza

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/fm/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Food Microbiology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customersupport representatives.

ANEXO C – Normas para apresentação de dissertações e teses



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Nutrição



Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Fone: (81)21268463, Fax: (81)21268473
<http://www.posnutri.ufpe.br>, posnutri@propesq.ufpe.br

DISSERTAÇÃO E TESE

REGULAMENTAÇÃO DA DEFESA E NORMAS DE APRESENTAÇÃO¹

I REGULAMENTAÇÃO DA DEFESA

O aluno do Programa da Pós-Graduação em Nutrição/CCS/UFPE deve:

- 1 Apresentar a **dissertação em formato de artigos***, dos quais pelo menos um artigo deve ser enviado para publicação em revista indexada no mínimo como Qualis Nacional A da CAPES. O formato de apresentação dos artigos segue as normas de “instruções aos autores” das Revistas que serão submetidos. A revisão da literatura pode ser apresentada sob a forma de artigo de revisão a ser submetido à publicação.
- 2 Apresentar a **tese em formato de artigos**, dos quais pelo menos dois artigos devem estar submetidos à publicação em revistas indexadas no mínimo como Qualis Nacional A da CAPES. O formato de apresentação dos artigos segue as normas de “instruções aos autores” das Revistas que são submetidos (apresentar comprovantes para a defesa de tese). A revisão da literatura pode ser apresentada sob a forma de artigo de revisão também submetido à publicação.

¹ Decisão do Colegiado da Pós-graduação em 3 de abril de 2008.

* A emissão do diploma está condicionada ao envio do artigo da dissertação para publicação.

II NORMAS DA APRESENTAÇÃO²

ESTRUTURA	ORDEM DOS ELEMENTOS
1 Pré-textuais Elementos que antecedem o texto com informações que ajudam na identificação e utilização do trabalho.	1.1 Capa 1.2 Lombada 1.3 Folha de rosto 1.4 Errata (opcional, se for o caso) 1.5 Folha de aprovação 1.6 Dedicatória(s) 1.7 Agradecimento(s) 1.8 Epígrafe (opcional) 1.9 Resumo na língua vernácula 1.10 Resumo em língua estrangeira 1.11 Lista de ilustrações 1.12 Lista de tabelas 1.13 Lista de abreviaturas e siglas 1.14 Lista de símbolos 1.15 Sumário
2 Textuais	2.1 Apresentação 2.2 Revisão da literatura (ou artigo de revisão) 2.3 Métodos 2.4 Resultados - Artigo (s) original (ais) 2.5 Considerações finais
3 Pós-textuais Elementos que complementam o trabalho	3.1 Referências 3.2 Apêndice (s) 3.3 Anexo (s)

1 Pré-textuais

1.1 Capa

Proteção externa do trabalho e sobre a qual se imprimem as informações indispensáveis à sua identificação

a) Anverso (frente)

Cor: Verde escura;

Consistência: capa dura

Formatação do texto: letras douradas, escrito em maiúsculas, fonte “Times New Roman”, tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado.

Conteúdo do texto: na parte alta deve ser colocado o nome do doutorando ou mestrand; na parte central deve ser colocado o título e o subtítulo (se houver) da Tese ou Dissertação; na parte inferior deve ser colocados o local (cidade) da instituição e ano da defesa.

²Adaptadas segundo as recomendações da ABNT NBR 14724, 2005

(NBR 14724: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2005).

b) Contracapa

Anverso (Frente)

Cor: branca;

Formatação do texto: letras pretas, escrito em maiúsculas e minúsculas, fonte “Times New Roman”, tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado.

Conteúdo do texto: na parte alta deve ser colocado o nome do doutorando ou mestrand; na parte central deve ser colocado o título e o subtítulo (se houver) da Tese ou da Dissertação, sendo permitida ilustração; na parte inferior deve ser colocados o local (cidade) da instituição e ano da defesa.

Observação: As capas verdes e sólidas serão somente exigidas quando da entrega dos volumes definitivos, após aprovação das respectivas bancas examinadoras e das respectivas correções exigidas.

1.2 Lombada

Parte da capa do trabalho que reúne as margens internas das folhas, sejam elas costuradas, grampeadas, coladas ou mantidas juntas de outra maneira.

De baixo para cima da lombada devem estar escritos: o ano, o título da Tese ou da Dissertação, o nome utilizado pelo doutorando ou mestrand nos indexadores científicos.

1.3 Folha de Rosto

Anverso (frente)

Cor: branca;

Formatação do texto: letras pretas, escrito em maiúsculas e minúsculas, fonte “Times New Roman”.

Conteúdo do texto: os elementos devem figurar na seguinte ordem:

- a) nome do doutorando ou mestrand (na parte alta fonte “Times New Roman”, tamanho 16, alinhamento centralizado);
- b) título da Tese ou Dissertação. Se houver subtítulo, deve ser evidenciada a sua subordinação ao título principal, precedido de dois-pontos (na parte média superior, fonte “Times New Roman”, tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado);
- c) natureza, nome da instituição e objetivo, explícito pelo seguinte texto: “Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor ou Mestre em Nutrição” (na parte média inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, espaço simples entre linhas, devem ser alinhados do meio da mancha para a margem direita);
- d) o nome do orientador e, se houver, do co-orientador (logo abaixo do item c, separados por dois espaços simples, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento à esquerda);
- e) local (cidade) da instituição (na parte inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);
- f) ano da defesa (logo abaixo do item e, sem espaço, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado).

Verso

Descrever a ficha catalográfica, segundo as normas da Biblioteca Central da UFPE.

1.4 Errata

Esta folha deve conter o título (Errata), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento opcional que deve ser inserido logo após a folha de rosto, constituído pela referência do trabalho e pelo texto da errata e disposto da seguinte maneira:

EXEMPLO ERRATA

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
32	3	publicação	publicação

1.5 Folha de Aprovação

Elemento obrigatório, colocado logo após a folha de rosto, escrito no anverso da folha (cor branca), não deve conter o título (folha de aprovação) nem o indicativo numérico, sendo descrito em letras pretas, maiúsculas e minúsculas, fonte “Times New Roman”, constituído pelos seguintes elementos:

- a)** nome do doutorando ou mestrandos (na parte alta fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);
- b)** título da Tese ou Dissertação. Se houver subtítulo, deve ser evidenciada a sua subordinação ao título principal, precedido de dois-pontos (na parte média superior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado);
- c)** data de aprovação da Tese ou Dissertação, exemplo: Tese aprovada em: 27 de março de 2008 (na parte média inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhado à esquerda);
- d)** nome, titulação e assinatura de todos os componentes da banca examinadora e instituições a que pertencem (na parte média inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhado à esquerda);
- e)** local (cidade) da instituição (na parte inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);
- f)** ano da defesa (logo abaixo do item e, sem espaço, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado).

Observação: A data de aprovação e assinaturas dos membros componentes da banca examinadora serão colocadas após a aprovação do trabalho.

1.6 Dedicatória (s)

Elemento opcional, colocado após a folha de aprovação, onde o autor presta homenagem ou dedica seu trabalho. Esta folha não deve conter o título (dedicatória) nem o indicativo numérico.

1.7 Agradecimento (s)

Esta folha deve conter o título (Agradecimento ou Agradecimentos), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento opcional, colocado após a dedicatória, onde o autor faz agradecimentos dirigidos àqueles que contribuíram de maneira relevante à elaboração do trabalho.

1.8 Epígrafe

Elemento opcional, colocado após os agradecimentos. Folha onde o autor apresenta uma citação, seguida de indicação de autoria, relacionada com a matéria tratada no corpo do trabalho. Esta folha não deve conter o título (epígrafe) nem o indicativo numérico. Podem também constar epígrafes nas folhas de abertura das seções primárias.

Observação: o conjunto dos itens relacionados à dedicatória (s), agradecimento (s) e epígrafe deve conter no máximo cinco páginas.

1.9 Resumo na língua vernácula

Esta folha deve conter o título (Resumo), sem indicativo numérico, centralizado, conforme a ABNT NBR 6024, sendo elemento obrigatório, escrito em português, em parágrafo único, de

forma concisa e objetiva dos pontos relevantes, fornecendo a essência do estudo. O resumo deve conter no máximo 500 palavras, espaço simples entre linhas, seguido, logo abaixo, das palavras representativas do conteúdo do trabalho, isto é, palavras-chave e/ou descritores. Estes descritores devem ser integrantes da lista de "Descritores em Ciências da Saúde", elaborada pela BIREME e disponível nas bibliotecas médicas ou na Internet (<http://decs.bvs.br>). Todas as palavras-chave necessitam serem separadas entre si e finalizadas por ponto.

1.10 Resumo na língua estrangeira - Abstract

Esta folha deve conter o título (Abstract), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento obrigatório, escrito em inglês, com as mesmas características do resumo na língua vernácula. O resumo deve conter no máximo 500 palavras, espaço simples entre linhas. Deve ser seguido das palavras representativas do conteúdo do trabalho, isto é, palavras-chave e/ou descritores, na língua.

1.11 Lista de ilustrações

Elemento opcional, que deve ser elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com cada item designado por seu nome específico, acompanhado do respectivo número da página. Quando necessário, recomenda-se a elaboração de lista própria para cada tipo de ilustração (desenhos, esquemas, fluxogramas, fotografias, gráficos, mapas, organogramas, plantas, quadros, retratos e outros). Esta folha deve conter o título (Lista de ilustrações), sem indicativo numérico, centralizado.

1.12 Lista de tabelas

Elemento opcional, elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com cada item designado por seu nome específico, devidamente numeradas, acompanhado do respectivo número da página. Esta folha deve conter o título (Lista de tabelas), sem indicativo numérico, centralizado.

1.13 Lista de abreviaturas e siglas

Elemento opcional, que consiste na relação alfabética das abreviaturas e siglas utilizadas no texto, seguidas das palavras ou expressões correspondentes grafadas por extenso. Esta folha deve conter o título (Lista de abreviaturas e siglas), sem indicativo numérico, centralizado.

A abreviatura é a redução gráfica de um nome ou de uma seqüência de nomes, resultando em um outro único nome conciso com o mesmo significado.

É necessário que, antes da primeira aparição no texto de uma abreviação ou sigla, se coloque por extenso o nome ou seqüência de nomes que a originou, colocando o nome abreviado entre parênteses. Em seguida, deve-se usar sempre a sigla ou abreviação. Deve-se evitar, todavia, a utilização de siglas ou abreviaturas nos títulos.

1.14 Lista de símbolos

Elemento opcional, que deve ser elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com o devido significado. Esta folha deve conter o título (Lista de símbolos), sem indicativo numérico, centralizado.

1.15 Sumário

Esta folha deve conter o título (Sumário), sem indicativo numérico, centralizado e os elementos pré-textuais não devem figurar neste item.

O sumário é a enumeração das principais divisões, seções e outras partes do trabalho, na mesma ordem e grafia em que a matéria nele se sucede, deve ser localizado como o último

elemento pré-textual, considerado elemento obrigatório, cujas partes são acompanhadas do(s) respectivo(s) número(s) da(s) página(s).

Exemplo:

12 Aspectos Clínicos da Amebíase..... 45

2 Textuais – Modelo de Tese ou Dissertação com Inclusão de Artigos

2.1 Apresentação

Texto preliminar no início do manuscrito que servirá de preparação aos estudos. Deve conter a caracterização e a relevância do problema (argumentos que estabelecem a legitimidade do estudo científico), a hipótese/pergunta condutora da pesquisa (proposição que visa a fornecer uma explicação verossímil para um conjunto de evidências e que deve estar submetida ao controle da experiência), os objetivos da tese ou da dissertação (finalidades que devem ser atingidas), os métodos adequados para testar as hipóteses. Os objetivos devem ser claramente descritos, com frases curtas e concisas, e as informações sobre os artigos, relacionando com os objetivos e referência ao periódico que será/foi submetido.

Observação: neste item, havendo citação de autores no texto seguir as normas vigentes da ABNT NBR 10520 (Informação e documentação - Citações em documentos – Apresentação).

2.2 Revisão da Literatura (estudo quantitativo) / Referencial Teórico (estudo qualitativo)

A revisão da literatura é um levantamento que focaliza os principais tópicos dos temas a serem abordados. Esta revisão deverá dar subsídios para as hipóteses levantadas pelo autor.

O referencial teórico ancora, explica ou comprehende o objeto do estudo sendo construído a partir de uma teoria ou por construtos: “idéias e termos categoriais, princípios condutores, opiniões influentes ou conceitos essenciais adotados, em uma teoria ou área de estudo”(Carvalho, 2003, p.424)³. Desta forma esta construção deve articular ao objeto do estudo com alguma teoria ou alguns construtos vindos de uma revisão de literatura.

A revisão da literatura ou o referencial teórico pode ser um capítulo da dissertação ou da tese ou ser um artigo de revisão sobre o tema da tese, submetido ou publicado em revista indexada pelo doutorando ou mestrandos, como autor principal. Neste caso, o artigo inserido deve seguir as normas da revista, onde foi publicado ou submetido. Se for o caso, a comprovação da submissão deverá ser incluída no item: anexos.

Neste capítulo deve seguir as normas vigentes da ABNT: referências (Conjunto padronizado de elementos descritivos retirados de um documento, que permite sua identificação individual - **NBR 6023**) e **apresentação de citações** (Menção, no texto, de uma informação extraída de outra fonte - **NBR 10520**). **Em caso do artigo de revisão ser submetido ou publicado, seguir as normas de instruções aos autores da revista.**

2.3 Métodos (estudo quantitativo) / Caminho Metodológico (estudo qualitativo)

³ CARVALHO, Vilma de. Sobre construtos epistemológicos nas ciências: uma contribuição para a enfermagem. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, 2003 . Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-1169200300040003&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 18 Mar 2008.

Detalhar o necessário para que o leitor possa reproduzir o estudo, criticar e analisar as soluções encontradas pelo mestrando ou doutorando frente aos problemas surgidos na execução do projeto. A análise dos dados deve ser escrita de modo a permitir a avaliação crítica das opções feitas. Portanto, espera-se, com este capítulo, que o aluno demonstre as etapas de desenvolvimento do seu trabalho de campo e/ou de laboratório e das análises utilizadas, justificando as suas opções para se chegar aos resultados e conclusões do estudo. Neste item, quando se tratar de estudo qualitativo a expressão “Métodos” pode ser substituída pelas expressões: “Caminho Metodológico”, “Percorso Metodológico”, entre outras.

2.4 Resultados — Artigos Originais

Neste capítulo deverão ser colocados os artigos originais resultantes do trabalho de Tese ou de Dissertação, sendo, o autor principal, preferencialmente, o aluno da Pós-Graduação. Estes trabalhos deverão ser submetidos ou publicados em revistas científicas indexadas (formatados de acordo com as normas do periódico que foi/será submetido pelo doutorando ou mestrando como autor principal). No caso do doutorando, a comprovação da submissão dos artigos deverá ser incluída no item: anexos.

2.5 Considerações Finais

Neste capítulo deve-se expor as consequências das observações realizadas. É o momento de emitir eventuais generalizações. Não deve ser repetições dos resultados, mas sim uma boa síntese deles. Constitui-se de respostas às indagações feitas, isto é, às enunciadas na introdução e detalhada nos objetivos. O autor deverá se posicionar frente ao problema estudado e poderá incluir recomendações, inclusive discutir novas hipóteses e consequentemente novos estudos e experimentos.

3 Pós-textuais

3.1 Referências

Conjunto padronizado de elementos descritivos, retirados de um documento, que permite sua identificação individual. Esta folha, elemento obrigatório, deve conter o título (Referências), sem indicativo numérico, centralizado. As referências são alinhadas à esquerda, devendo seguir as normas da ABNT NBR 6023, exceto as dos capítulos que foram enviados para publicação.

Neste item são citadas **apenas** as referências da introdução, dos métodos/procedimento metodológico e da revisão bibliográfica (quando não for um artigo que será submetido a uma Revista indexada). As referências dos artigos estão contempladas nos próprios artigos, conforme as normas de “instruções aos autores”.

3.2 Apêndice

Textos ou documentos elaborados pelo autor da dissertação/tese com a finalidade de complementar sua argumentação, sem prejuízo da unidade nuclear do trabalho. Esta folha, elemento opcional, deve conter o título (**Apêndice**), sem indicativo numérico, centralizado.

O (s) apêndice (s) é identificado por letras maiúsculas consecutivas, travessão e pelos respectivos títulos. Excepcionalmente utilizam-se letras maiúsculas dobradas, na identificação dos apêndices, quando esgotadas as 23 letras do alfabeto.

Exemplo:

APÊNDICE A – Avaliação numérica de células inflamatórias totais aos quatro dias de evolução

APÊNDICE B – Avaliação de células musculares presentes nas caudas em regeneração

3.3 Anexos

Texto ou documento não elaborado pelo autor e que serve de fundamentação, comprovação ou ilustração. Esta folha, elemento opcional, deve conter o título (Anexo), sem indicativo numérico, centralizado.

O (s) anexo (s) são identificados por letras maiúsculas consecutivas, travessão e pelos respectivos títulos. Excepcionalmente utilizam-se letras maiúsculas dobradas, na identificação dos anexos, quando esgotadas as 23 letras do alfabeto.

Exemplo:

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B – Documentação de encaminhamento do artigo ao periódico

III REGRAS GERAIS DE FORMATAÇÃO

4 Formato

Os textos devem ser apresentados em papel branco, formato A4 (21 cm x 29,7 cm), digitados na frente das folhas, com exceção da folha de rosto cujo verso deve conter a ficha catalográfica, impressos em cor preta, podendo utilizar outras cores somente para as ilustrações.

O projeto gráfico é de responsabilidade do autor do trabalho.

Recomenda-se, para digitação, o texto na cor preta, sendo que as gravuras podem ser cores livres. A fonte Times New Roman, tamanho 12 para todo o texto, excetuando-se as citações de mais de três linhas, notas de rodapé, paginação e legendas das ilustrações e das tabelas que devem ser digitadas em tamanho menor e uniforme.

No caso de citações de outros autores, com mais de três linhas, um recuo de 4 cm da margem esquerda do texto deve ser observado.

O alinhamento para o texto é justificado.

5 Margem

As folhas devem apresentar margem esquerda e superior de 3 cm; direita e inferior de 2 cm.

6 Espacejamento

Todo o texto deve ser digitado ou datilografado com espaço 1,5, excetuando-se as citações de mais de três linhas, notas de rodapé, referências, legendas das ilustrações e das tabelas, ficha catalográfica, natureza do trabalho, objetivo, nome da instituição a que é submetida e área de concentração, que devem ser digitados ou datilografados em espaço simples. As referências, ao final do trabalho, devem ser separadas entre si por dois espaços simples.

Os títulos das seções devem começar na parte superior da mancha e ser separados do texto que os sucede por dois espaços 1,5, entrelinhas. Da mesma forma, os títulos das subseções devem ser separados do texto que os precede e que os sucede por dois espaços 1,5.

Na folha de rosto e na folha de aprovação, a natureza do trabalho, o objetivo, o nome da instituição a que é submetido e a área de concentração devem ser alinhados do meio da mancha para a margem direita.

7 Notas de rodapé

As notas devem ser digitadas ou datilografadas dentro das margens, ficando separadas do texto por um espaço simples de entrelinhas e por filete de 3 cm, a partir da margem esquerda.

8 Indicativos de seção

O indicativo numérico de uma seção precede seu título, alinhado à esquerda, separado por um espaço de caractere.

9 Paginação

Todas as folhas do trabalho, a partir da folha de rosto, devem ser contadas seqüencialmente, mas não numeradas.

A numeração é colocada, a partir da primeira folha da parte textual, em algarismos arábicos, no canto superior direito da folha, a 2 cm da borda superior, ficando o último algarismo a 2 cm da borda direita da folha. Havendo apêndice e anexo, as suas folhas devem ser numeradas de maneira contínua e sua paginação deve dar seguimento à do texto principal.

10 Numeração progressiva

Para evidenciar a sistematização do conteúdo do trabalho, deve-se adotar a numeração progressiva para as seções do texto. Os títulos das seções primárias, por serem as principais divisões de um texto, devem iniciar em folha distinta. Destacam-se gradativamente os títulos das seções, utilizando-se os recursos de negrito, itálico ou grifo e redondo, caixa alta ou versal, e outro, no sumário e de forma idêntica, no texto.

Recife, 03 de abril de 2008.

**Profa. Mônica Maria Osório
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição**