

GEÍZA ALVES DE AZERÊDO

Potencial de aplicação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como sanitizantes naturais em hortaliças minimamente processadas

Recife
2011

GEÍZA ALVES DE AZERÊDO

Potencial de aplicação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como sanitizantes naturais em hortaliças minimamente processadas

Tese 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 em Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Co-orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

Recife
2011

Azerêdo, Geíza Alves de

Potencial de aplicação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como sanitizantes naturais em hortaliças minimamente processadas / Geíza Alves de Azerêdo. – Recife: O Autor, 2011.

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

Orientador: Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2011.

Inclui bibliografia, apêndice e anexos.

1. Vegetais minimamente processados. 2. Atividade antibacteriana. 3. Viabilidade celular. 4. Aplicação combinada. I. Stamford, Tânia Lúcia Montenegro. II. Título.

GEÍZA ALVES DE AZERÊDO

Potencial de aplicação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como sanitizantes naturais em hortaliças minimamente processadas

Aprovada em 07 de novembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Leonie Asfora Sarubbo
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Professora Dra. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Nutrição

Professora Dra. Janete Magali de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos

Professor Dr. Eduardo José Nepomuceno Montenegro
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Fisioterapia

Professora Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Nutrição

Recife
2011

A **Fernando**, meu esposo, meu amor.

AGRADECIMENTOS

“Invoque o seu Anjo da guarda, pois ele te iluminará e te guiará no caminho de Deus. Deus o deu a você. Então o use.”

Padre Pio.

Agradeço a **DEUS** pelos Anjos da guarda que ELE me deu. E eu usei. Agora, venho agradecer.

À prof. Dra Tânia Lúcia Montenegro Stamford, pela segunda orientação, pela crença e fé mais uma vez depositadas, pelos valiosos ensinamentos técnicos e, sobretudo, humanos. Uma professora abençoada por Deus em sabedoria, humildade, generosidade e amor ao próximo. Uma pessoa que não vê limites entre o aprender e o ensinar.

Ao prof. Dr Evandro Leite de Souza, um profissional responsável e super dedicado ao que se propõe a fazer. Sua ajuda esteve sempre presente. Prontamente atendeu às minhas necessidades e dúvidas. Minha admiração!

À prof. Dra Maria Lúcia da Conceição (‘caldo’ MLC), minha primeira orientadora, pessoa primeira que me apresentou o mundo dos micro-organismos, fonte de sabedoria, humildade e gentileza.

A D. Tezinha, minha mainha – generosidade, humildade, fé em DEUS e em Nossa Senhora, e o amor incondicional aos filhos, inclusive a mim (rs), são suas maiores virtudes.

A Fernando, muito mais que um esposo, um presente de DEUS! O homem que mudou minha forma de pensar a vida e que me proporciona, a cada dia, viver plenamente o amor. Um companheiro para todos os momentos. Não é a toa que a ele dedico essa conquista.

Aos meus 12 irmãos, cada um com uma história a acrescentar em minha vida pessoal e profissional, em especial a Genival, Genilda, Givanildo, Gilvaneide, Gilvanice, Jaucele e Maria, pelo exemplo de vida e força de sempre. Vocês são muito queridos e amados!

À Vaneide, pela generosidade em ler a tese, revisar as referências, enfim, por todo o apoio e carinho.

À Genilda, pelos esclarecimentos (no inglês) sempre tão gentis.

Aos meus sobrinhos, em especial a Cecília, Marina e Mariana, que partilharam comigo alguns momentos de aperreio e souberam, com um abraço ou um sorriso, acalantar o meu coração.

À família de Fernando: D. Vilma, sua mãe, pelas orações e pelo abrigo em seus lares, de João Pessoa e Recife. Sem sua ajuda, teria sido complicado transitar quase que semanalmente entre os dois Estados. A Janine e Samara, pela acolhida tão afetuosa e ainda pela generosidade quando precisei de seus espaços/equipamentos, cedidos sempre de forma tão gentil. A Pedro Augusto, pelas sábias palavras e pelos momentos de descontração muito agradáveis.

Aos bolsistas Nelson Justino Gomes Neto e Polyana Campos Nunes (e também aos voluntários Nadja Lais e Janilson) pela ajuda nos experimentos, pelos momentos de cansaço compartilhados e, sobretudo, pela amizade e carinho. Minha eterna gratidão!

À Polyana, por me permitir fazer parte do seu seletto grupo de pessoas queridas.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Bromatologia da UFPB: Polyana, Nelson, Jossana, Nereide, Camila, Rayanne, Eduardo, Isabelle, Quênia, Wanessa, Ilsa, Elieidy, Estefânia, Tatiane, Ana Júlia, Heloisa, Rilávia, Helena, Larissa, Adassa, pelos momentos de descontração, companhia e solidariedade.

A Elieidy, pela inestimável ajuda na avaliação sensorial.

A Jossana, parceira de tema, pelo convívio, palavras de incentivo e carinho.

A Jailane, pela amizade, ajuda e estímulo.

A Rosinha, minha ex-aluna querida do IFPE – Vitória, que sempre torceu, acreditou e orou tanto por mim.

Aos colegas da minha turma do doutorado: Manuela, Amanda, Celso, Tereza e Karina, pelo convívio, solidariedade e amizade compartilhados durante esse tempo.

Aos pesquisadores e técnicos do CETENE: Karina, Katarina Raposo, Francisco Rangel, Ceíça, Gabi, Jose e Carol, pela agilidade e gentileza.

Ao prof Dr Luiz Fernando, do Centro de Ciências da Natureza, por ter me indicado a parceria com a prof Dra Regina Bressan, com quem tive a oportunidade de realizar a microscopia confocal.

À prof Regina Bressan, pela disponibilidade e acolhida sempre tão gentil!

À prof Dra Beati, do Departamento de Biofísica da UFPE, que me abriu as portas do seu laboratório, atendendo ao pedido de Manuela, a quem também agradeço.

À prof Dra Celiane Gomes Maia, pela amizade e valiosas contribuições na etapa de qualificação.

À prof Dra Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa, que me acompanha desde o mestrado, sempre se interessando e tecendo considerações importantes sobre a pesquisa.

À prof Dra Maria Inês Sucupira, pelas sugestões que acrescentou na etapa de qualificação.

Aos professores da Pós-graduação, em especial a prof Nonete B. Guerra, pelos notáveis ensinamentos.

Aos professores doutores da banca de tese: Débora Catarine Nepomuceno, Leonie Asfora Sarubbo, Janete Magali de Araújo, Tânia Lúcia Montenegro Stamford e Eduardo José Nepomuceno, pelas notáveis considerações que contribuirão para a melhoria da qualidade da tese/artigos.

Ao Programa de Pós Graduação em Nutrição/ UFPE, coordenadora, professores e as funcionárias Cecília Arruda e Neci Nascimento, pela presteza de sempre.

A Roberto Matos e Sônia Pedrosa, do Departamento de Nutrição, pela gentileza dispensada.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco-IFPE, Campus Vitória, pela liberação por 2 anos para cursar integralmente o doutorado.

À FACEPE, pela concessão da bolsa ‘Auxílio à Mobilidade Discente’.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro ao projeto.

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”

São Francisco de Assis.

RESUMO

Considerando que os compostos sintéticos comumente empregados na sanitização de hortaliças vêm apresentando baixo espectro de ação antimicrobiana e ainda acarretando prejuízos à saúde do consumidor, os óleos essenciais surgem como alternativas naturais para aplicação nestes produtos, haja vista os destacáveis resultados na inibição de micro-organismos deteriorantes e patogênicos de interesse em alimentos. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de aplicação dos óleos essenciais de orégano (*O. vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), isolados e combinados em concentrações sub-inibitórias, como sanitizantes naturais em hortaliças minimamente processadas. As hortaliças utilizadas foram alface e acelga e as bactérias-teste foram *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens* e *Aeromonas hydrophila*. Foram realizados ensaios antibacterianos de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), concentração inibitória fracionada (CIF), dinâmica de crescimento bacteriano, interferência dos óleos sobre a microbiota natural e sobre a sobrevivência das bactérias-teste associadas com hortaliças; testes de investigação dos possíveis mecanismos de ação antibacteriana dos óleos essenciais (efeito dos óleos sobre a liberação de material citoplasmático e a utilização de substrato oxidável, e ensaios microscópicos de superfície, ultraestruturais e de viabilidade de membrana); além de avaliação sensorial. Os dados foram analisados pelo programa SigmaStat 3.1, sendo realizadas análise de variância e a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Conforme as concentrações inibitórias mínimas, *P. fluorescens* comportou-se como a bactéria mais resistente, com valores de CIM de 5 e 40 µL/mL para os óleos essenciais de orégano e alecrim, respectivamente, confirmando a maior efetividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano. Quando aplicados em combinação, em concentrações sub-inibitórias, os óleos essenciais tiveram suas ações potencializadas, indicando efeito sinérgico para *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* e *A. hydrophila*, e efeito aditivo para *P. fluorescens*. Isolados ou combinados em concentrações sub-inibitórias, os óleos essenciais de orégano e alecrim promoveram significativos resultados ($p < 0.05$): decréscimo na dinâmica de crescimento bacteriano, tanto em caldo laboratorial como em caldo vegetal de todas as bactérias-teste; redução da microbiota natural das hortaliças; rápida inibição da utilização de glicose como substrato oxidável; distúrbios na permeabilidade das membranas celulares com liberação de constituintes citoplasmáticos; e, por fim, diversas alterações microscópicas de superfície/ultra-estruturais e de membrana, como demonstrado em suas respectivas análises de microscopia eletrônica e de fluorescência confocal. A avaliação sensorial das hortaliças tratadas com os óleos essenciais revelou que os provadores preferiram as hortaliças tratadas com a combinação dos dois óleos essenciais, ao invés da aplicação isolada de um deles, após 72 h de armazenamento refrigerado. Diante dos resultados obtidos, sugere-se a aplicação combinada dos óleos essenciais de orégano e alecrim, em concentrações subinibitórias, na sanitização de hortaliças minimamente processadas.

Palavras-chave: vegetais minimamente processados, atividade antibacteriana, viabilidade celular, aplicação combinada.

ABSTRACT

Considering the fact that the synthetic compounds usually used in the sanitization of vegetables have been presenting a low spectrum of antibacterial action and have still been causing harm to the consumer's health, the essential oils emerge as natural alternatives for application in these products because of their prominent results in the inhibition of spoiling and pathogenic micro-organisms as it concerns food. The purpose of this study was to evaluate the application potential of essential oils from oregano (*O. vulgare* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), isolated and combined in sub-inhibitory concentrations, as natural sanitizers in minimally processed vegetables. The vegetables used were lettuce and chard and the test bacteria were *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens* and *Aeromonas hydrophila*. The following tests were carried out: antibacterial minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericide concentration (MBC), fractional inhibitory concentration (FIC), bacterial kill-time, interference of the oils on the autochthonous microflora and on the survival of the test bacteria associated with vegetables; investigation tests of the possible antibacterial action mechanisms of the essential oils (effect of the oils on the release of cytoplasmic material and use of oxidizable substrate and microscopic assays of surface, ultra-structural and of membrane viability); and sensory evaluation. The data were analyzed through the SigmaStat 3.1 program, and both variance analysis and the average comparisons through the Tukey test at 5% of probability. According to the minimum inhibitory concentrations, *Pseudomonas fluorescens* behaved as the most resistant bacterium, with MIC of 5 and 40 $\mu\text{L/mL}$, for the essential oils of oregano and rosemary, respectively, thus confirming the highest antimicrobial effectiveness of the essential oil of oregano (*O. vulgare* L.). When applied in combination, in sub-inhibitory concentrations, the essential oils had their actions made more potential, indicating synergic effect for *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* and *A. hydrophila*, and additive effect for *P. fluorescens*. Either isolated or in sub-inhibitory concentrations, the essential oils of oregano and rosemary promoted significant results ($p < 0.05$): decrease in bacterial kill-time, both in laboratory broth and vegetable broth of all the test bacteria; reduction of the vegetable autochthonous microflora; rapid inhibition of the use of glucose as oxidative substrate; disturbances in the permeability of the cell membranes with release of cytoplasmic constituents; and finally, various microscopic alterations of surface/ultra-structural and membrane, as demonstrated in their respective electron microscopy and con-focal fluorescence analyses. The sensory evaluation of the vegetables treated with the essential oils revealed that informants who tasted them preferred the vegetables treated with the combination of both essential oils, instead of the isolated application of one of them, after 72 h of cold storage. Considering the results obtained, we suggest the combined application of essential oils of oregano and rosemary, in sub-inhibitory concentrations, in the sanitization of minimally processed vegetables.

Keywords: minimally processed vegetables, antibacterial property, cell viability, combined application.

SUMÁRIO

1. Apresentação	11
2. Objetivos	13
3. Revisão de literatura	14
3.1. Considerações sobre hortaliças minimamente processadas	14
3.2. Micro-organismos de importância em hortaliças minimamente processadas	17
3.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	18
3.2.2. <i>Yersinia enterocolita</i>	22
3.2.3. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	23
3.2.4. <i>Aeromonas hydrophila</i>	26
3.3. Sanitização de hortaliças minimamente processadas	28
3.3.1. Óleos essenciais como alternativas – mecanismos de ação antibacteriana	28
3.3.1.1. Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano)	33
3.3.1.2. Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (alecrim)	35
3.4. Influência da aplicação de óleos essenciais sobre os atributos organolépticos de hortaliças minimamente processadas	38
4. Materiais e Métodos	41
4.1. Materiais	41
4.2. Métodos	42
4.2.1. Ensaios de atividade antimicrobiana	42
4.2.1.1. Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima	42
4.2.1.2. Avaliação do efeito da aplicação combinada dos óleos essenciais	43
4.2.1.3. Interferência dos óleos sobre a dinâmica de crescimento bacteriano	43
4.2.1.4. Efeito dos óleos essenciais sobre a microbiota natural de hortaliças minimamente processadas	44
4.2.1.5. Efeito dos óleos essenciais sobre a sobrevivência de bactérias potencialmente patogênicas em hortaliças minimamente processadas	44
4.2.2. Avaliação dos atributos organolépticos das hortaliças tratadas com óleos essenciais	45
4.2.3. Testes de avaliação dos possíveis mecanismos de atuação dos óleos essenciais	46
4.2.3.1. Efeito dos óleos essenciais sobre a liberação de material citoplasmático	46
4.2.3.2. Efeito dos óleos essenciais sobre a utilização de substrato oxidável	46
4.2.3.3. Microscopia eletrônica de varredura e transmissão	47
4.2.3.4. Microscopia de fluorescência confocal	48
4.2.4. Análises estatísticas	48
5. Resultados e discussão – artigos originais	49
5.1. Combined application of essential oils from <i>Origanum vulgare</i> L. and <i>Rosmarinus officinalis</i> L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables	50
5.2. Combined use of essential oils from <i>Origanum vulgare</i> L. and <i>Rosmarinus officinalis</i> L. at sub-inhibitory concentrations induces changes in cell viability, membrane permeability and morphological characteristics of <i>Aeromonas hydrophila</i> .	58
5.3. <i>Origanum vulgare</i> L. and <i>Rosmarinus officinalis</i> L. singly and combined at sub-inhibitory concentrations cause similar changes in membrane permeability and morphology of <i>Listeria monocytogenes</i>	82
6. Considerações finais	107
7. Perspectivas futuras	108
Referências bibliográficas	109
Apêndice	129
Anexos	132

1 Apresentação

As profundas mudanças ocorridas nas sociedades modernas, de ordem econômica, social, demográfica, cultural e alimentar influenciaram abruptamente o desenvolvimento de novas técnicas de produção, processamento e distribuição de alimentos (SANTOS e CUNHA, 2007; ROSA e CARVALHO, 2000).

Dentro deste contexto, encontram-se as hortaliças minimamente processadas que, além de atenderem aos requisitos naturais e nutricionais, ainda oferecem conveniência ao consumo. Entretanto, a intensa manipulação a que são submetidas tornam-nas susceptíveis à contaminação microbiana, o que compromete sobremaneira a sua qualidade (ABADIAS et al., 2008). Relatos diversos indicam que vegetais crus prontos para o consumo têm sido implicados em surtos de origem alimentar, por serem veiculadores de micro-organismos, muitos dos quais emergentes, como é o caso das bactérias *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas fluorescens* (UYTTENDAELE et al., 2004; ISONHOOD e DRAKE, 2002; SZABO et al., 2000; RICHARDSON et al., 1998).

Esta problemática surge em detrimento das constantes mudanças nas práticas agrícolas e industriais, do aumento das populações de alto risco, do lançamento deliberado e acidental de patógenos na água, do uso excessivo de antibióticos e da aplicação inapropriada de pesticidas. Como se não bastasse, esses micro-organismos apresentam uma acentuada virulência e grande capacidade de sobrevivência perante agentes antimicrobianos e fatores ambientais adversos (SATO, 2005).

Dessa forma, torna-se necessária a execução de medidas com o intuito de prevenir que a contaminação microbiana alcance níveis indesejáveis, como também reduzir de maneira efetiva as contagens iniciais já presentes nestes substratos, por meio de tratamentos de sanitização. Não obstante, os compostos sanitizantes comumente empregados têm apresentado alguns inconvenientes, que vão desde o baixo espectro de ação, até prejuízos à saúde do consumidor (GOMEZ-LÓPEZ et al., 2005).

Em relação à ineficiência na redução da carga microbiana, pode-se dizer que a maior parte dos sanitizantes sintéticos frequentemente utilizados, a exemplo o hipoclorito de sódio, apresenta em sua constituição química radicais polares, o que implica na inacessibilidade à bicamada lipídica bacteriana que é hidrofóbica (GÓMEZ-LOPEZ et al., 2008).

Tomando por base os aspectos supracitados, bem como considerando que a sanitização é uma importante e indispensável etapa para assegurar a qualidade microbiológica de vegetais prontos para o consumo, os óleos essenciais surgem como alternativas de sanitizantes naturais para aplicação nestes produtos. Particularmente, os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) vêm despertando interesse para uso em produtos alimentícios, haja vista os destacáveis resultados de inibição de micro-organismos deteriorantes e patogênicos de interesse em alimentos em meio laboratorial e em ensaios com algumas matrizes alimentares (SOUZA et al., 2007; BARANAUSKIEN et al. 2006; SMITH-PALMER et al., 2001).

Assim, propõe-se neste estudo investigar o potencial de aplicação desses óleos essenciais como alternativas aos compostos clorados na sanitização de hortaliças minimamente processadas, bem como avaliar os possíveis mecanismos envolvidos no estabelecimento de sua propriedade antimicrobiana frente a micro-organismos de importância na contaminação de hortaliças minimamente processadas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de aplicação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L. e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), isolados e em combinação, como sanitizantes naturais em hortaliças minimamente processadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antibacteriano dos óleos essenciais frente a bactérias deteriorantes e patogênicas associadas com hortaliças minimamente processadas.
- Verificar a influência da aplicação dos óleos essenciais sobre atributos organolépticos de hortaliças minimamente processadas.
- Investigar os possíveis mecanismos de ação antibacteriana dos óleos essenciais.

3 Revisão de literatura

3.1 Considerações sobre Hortaliças Minimamente Processadas

Tem sido constatado que uma alimentação rica em vegetais está associada a um baixo risco de desenvolver câncer e doenças cardiovasculares (HOOPER e CASSIDY, 2006). Estes efeitos benéficos à saúde se devem à presença de vitaminas e fitoquímicos como ácido ascórbico, carotenóides, polifenóis e fibras que protegem constituintes biológicos importantes como as lipoproteínas, membranas e DNA (SZETO et al., 2004).

Além da importância dada à saúde física e mental e do bem-estar, aumentam-se as demandas por serviços de qualidade. Isto implica na valorização dos atributos relacionados com a qualidade e com a segurança dos alimentos. Novas exigências são ditadas pelos consumidores. Decisões de compra que antes eram baseadas nos aspectos de variedade, conveniência, estabilidade de preço e valor, agora envolvem, também, a avaliação de características intrínsecas, como o valor nutricional e a segurança alimentar (ROSA e CARVALHO, 2000).

As necessidades mercadológicas apontam mudanças, sobretudo, na procura por alimentos que exijam curto período de tempo para prepará-lo, ou seja, que ofereçam, além dos requisitos supracitados, praticidade e conveniência. Surge, então, a tecnologia de produtos minimamente processados, introduzida na década de 70, nos Estados Unidos, para suprir a indústria de fast-food, e no Brasil, na década de 90, por algumas empresas motivadas pelas tendências de mercado (ODUMERU et al., 2002).

Vegetal minimamente processado é, pois, aquele submetido às etapas de descascamento, corte, centrifugação, com ou sem lavagem, e que não requer nenhum tipo de tratamento adicional (processamento ou cocção) antes do consumo (FDA, 2008).

Na atualidade, o mercado de hortaliças minimamente processadas tem recebido grande aceitação pelos consumidores, de modo que o consumo destes alimentos tem se tornado frequente, haja vista a procura acentuada por preparações rápidas, sobretudo saladas (ALTUNKAYA e GÖKMEN, 2008). No entanto, o fato desses produtos não apresentarem as mesmas respostas fisiológicas que o produto inteiro e, conseqüentemente, serem mais

sensíveis às alterações microbianas, faz com que a indústria de alimentos enfrente o constante desafio de produzir alimentos com elevada qualidade e satisfatório nível de segurança.

Todavia, desde as etapas de pré-colheita, o vegetal está sujeito a diversos fatores de estresse, os quais podem influenciar de forma significativa a atividade microbiológica. Durante a produção agrícola, a contaminação pode ser oriunda do solo, da água de irrigação, do adubo orgânico ou de fezes animais. Na colheita, armazenamento e transporte, pode ocorrer a contaminação cruzada com os operadores, equipamentos e containeres (BEUCHAT, 2002; SHEEN et al., 2011). As operações de descascamento e corte, por sua vez, promovem a liberação de fluidos nutritivos, tornando um ambiente propício não somente à penetração de micro-organismos da superfície para o interior do vegetal, mas principalmente ao seu crescimento e proliferação (IFT e FDA, 2001). Por fim, as condições de distribuição (temperatura, umidade relativa, composição atmosférica e tempo de exposição) também contribuem sobremaneira para a senescência e perda da resistência à deterioração (ARTÉS et al., 2007).

Em suma, diversas são as causas que levam ao curto tempo de vida útil das hortaliças minimamente processadas, que vão desde o número e tipo de micro-organismos contaminantes, até as condições de acondicionamento e armazenamento desses vegetais. Ainda, o comportamento dos micro-organismos contaminantes em associação com a microbiota própria em vegetais precisa ser ainda esclarecido. Segundo Beuchat (2002), os vegetais apresentam diferenças marcantes no tocante à morfologia das superfícies, composição interna dos tecidos e atividades metabólicas de folhas, caules e raízes, vindo a prover, desta forma, uma série de nichos ecológicos seletivos para diversas espécies de micro-organismos.

Apesar de relevante a evolução na busca por novas técnicas de produção de alimentos, a segurança alimentar continua sendo alvo de grande preocupação para a saúde pública, principalmente no que diz respeito à ingestão de alimentos prontos para o consumo que não foram submetidos a tratamento térmico, método considerado eficaz na destruição de micro-organismos patogênicos (MARTINS e GERMANO, 2011).

Em países industrializados foi estimado que até 30% das pessoas sofrem de alguma doença de origem alimentar a cada ano e, apenas em 2005, pelo menos, 1,8 milhão de pessoas morreram de doenças diarréicas em todo o mundo. Uma parcela representativa dessas mortes tem sua causa associada à contaminação de alimentos e água. Nos Estados Unidos, cerca de 76 milhões de casos de doenças de origem alimentar (DTAs), resultando em 325 mil

hospitalizações, são estimados para cada ano (WHO, 2007). No Brasil, no ano de 2010, há registros de aproximadamente 600 surtos, envolvendo cerca de 13.000 pessoas, número considerado impreciso, haja visto que nem sempre estas doenças são identificadas e notificadas aos órgãos competentes. Na Figura 1, pode ser visto que, das causas identificadas, as hortaliças se situaram na 10ª maior causa de toxinfecções alimentares e que os restaurantes representam o 2º local de maior consumo dos alimentos contaminados (Figura 2). Cabe ressaltar, contudo, que os alimentos processados representam mais da metade das ocorrências de DTAs (Figura 1).

Classe de Alimento Envolvido em Surtos Alimentares Brasil, 2000 a 2011*													
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
Frutas, prod de frutas e similares	0	0	0	0	0	0	0	3	14	15	1	1	34
Hortaliças	7	14	13	22	9	14	8	1	2	2	0	4	96
Carne bovina in natura, processados e miúdos	21	51	38	38	21	44	28	25	32	39	15	6	358
Carne de frango, processados e miúdos	14	37	23	17	18	24	29	11	16	22	8	6	225
Carne suína in natura, processados e miúdos	6	26	31	21	14	15	19	15	15	17	5	5	189
Ovos e produtos a base de ovos	101	94	126	83	68	90	72	71	102	91	7	4	909
Pescados, frutos do mar e processados	4	6	8	8	3	7	6	7	18	13	5	2	87
Leite e derivados	12	37	36	25	31	51	16	22	42	50	19	9	350
Cereais, farináceos e prod a base de cereais	18	21	21	7	8	11	16	5	17	16	3	0	143
Edulcorantes	0	0	0	5	0	1	0	0	2	0	0	0	8
Especiarias, temperos secos, condimentos, molhos indust. e similares	0	1	0	36	0	1	0	0	6	5	4	3	56
Gorduras, óleos e emulsões	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bebidas não alcoólicas	0	8	3	0	4	9	5	5	4	4	4	1	47
Doces e sobremesas	27	83	65	0	42	75	27	32	51	67	11	10	490
Gelados comestíveis	5	3	2	0	0	1	1	0	0	5	0	1	18
Produtos a base de soja	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Prod alimentícios para uso especial	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Água	21	42	39	49	41	70	42	26	65	45	19	11	470
Bebidas alcoólicas	0	1	1	0	0	1	0	0	2	0	0	0	5
Alimentos mistos	68	179	200	160	156	156	101	83	156	151	58	34	1502
Ignorado	122	256	198	139	218	334	192	350	644	515	222	231	3421
Inconsistência	0	12	2	2	0	9	0	18	14	36	4	7	104
Inconclusivo	0	0	0	0	0	0	0	37	78	50	34	23	222
Total de alimentos identificados	236	425	406	311	260	414	269	223	388	391	101	63	3487
Total geral	358	693	606	452	478	757	461	628	1124	992	361	324	7234

Fonte: UHA/CGDT/SVS/MS
 *Dados sujeitos a alterações

Inconsistência: Informações não condizentes com o campo de preenchimento
 Inconclusivo: Quando o campo apresenta informações vagas

 Secretaria de Vigilância em Saúde

 Ministério da Saúde

Figura 1. Dados epidemiológicos de Doenças Transmitidas por Alimentos entre 2000 e 2011. Classe de alimentos envolvidos em surtos alimentares (BRASIL, 2011).

Local de Ocorrência Relacionado com o Surto Alimentar.													
Brasil, 2000 a 2011*													
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
Ignorado	94	204	162	127	159	287	173	8	0	10	0	2	1226
Residência	216	313	339	197	188	290	177	340	628	554	205	299	3746
Hospital/US	6	17	9	6	17	7	5	19	53	35	22	3	199
Creche/Escola	58	94	68	60	55	87	24	39	70	73	24	5	657
Asilo	0	2	0	2	0	3	4	0	10	17	6	1	45
Outras instituições	25	24	17	13	16	16	17	58	144	130	54	22	536
Restaurante/Padaria	50	92	124	85	80	126	94	130	251	172	75	17	1296
Evento	2	0	0	1	1	11	9	49	68	89	22	3	255
Casos dispersos no bairro	0	0	0	0	0	0	0	17	32	28	7	4	88
Casos dispersos no município	0	0	0	0	0	0	0	16	24	35	3	2	80
Casos dispersos em mais de um município	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Outros	17	82	30	74	61	44	15	0	0	0	0	0	323
Total	468	828	749	565	577	871	518	676	1280	1143	418	358	8451
Total sem ignorado	374	624	587	438	418	584	345	668	1280	1133	418	356	7225

Fonte: UHA/CGDT/SVS/MS
*Dados sujeitos a alterações

SVS Secretaria de Vigilância em Saúde

Ministério da Saúde

BRASIL

Figura 2. Dados epidemiológicos de Doenças Transmitidas por Alimentos entre 2000 e 2011. Local de ocorrência relacionado ao surto alimentar (BRASIL, 2011).

Assim, neste novo cenário de mudanças nos hábitos alimentares, a conveniência e a praticidade não devem estar dissociadas da finalidade maior a que se destina um alimento minimamente processado, que é promover a saúde e o bem-estar a quem o consome.

3.2 Micro-organismos de importância em hortaliças minimamente processadas

As hortaliças minimamente processadas geralmente são armazenadas sob temperaturas de refrigeração (6 a 10°C), o que propicia o crescimento de diversas espécies microbianas, como as pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (ex. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*), *Aeromonadaceae* (ex. *A. hydrophila*) e *Pseudomonadaceae* (ex. *P. fluorescens*) (RAGAERT et al., 2004).

A capacidade que alguns micro-organismos apresentam de crescer em temperaturas baixas ocorre graças a uma alteração em sua membrana lipídica, provocada pelo frio, necessária para manter a fluidez requerida para atividades enzimáticas, como também para o transporte de solutos através da membrana. Um aumento no grau de ácidos graxos insaturados podem ser os responsáveis por esta fluidez acentuada (BEALES, 2004). Dessa forma, faz-se necessário conhecer os mecanismos envolvidos e as condições requeridas para a sobrevivência e crescimento destes micro-organismos, de forma a estabelecer obstáculos, preferencialmente naturais, para seu efetivo controle.

3.2.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogênica, Gram-positiva, psicrotrófica, anaeróbica facultativa, catalase-positiva, oxidase-positiva e não formadora de esporos. Pode sobreviver sob condições extremas de temperatura (-0.4 a 45 °C), pH (4.4) e em alta concentração de sal (até 10 g / 100 g) (GANDHI e CHIKINDAS, 2007; BARKER e PARK, 2001).

Sua ocorrência no ambiente agrário (solos, fezes de animais e humanos, lodo de esgoto, silagem, esterco, água, lama) torna esse micro-organismo facilmente passível de ser veiculado aos produtos agrícolas (BEUCHAT, 2002). Arelado a isso, há relatos na literatura que comprovam a ineficácia de alguns tratamentos utilizados para controlar o seu crescimento, muitos dos quais adotados pelas indústrias de alimentos, como hipoclorito de sódio, compostos quaternários a base de amônio, ácido peracético e cloreto de benzalcônio (IBUSQUIZA et al., 2011; LUNDEN et al., 2003; TO et al., 2002; ROMANOVA, et al., 2002; MEREGHETTI et al., 2000). Estas condições apontam a provável persistência desse micro-organismo na linha de processamento de alimentos e, por conseguinte, o risco iminente de contaminação pelo consumidor.

A patogenicidade de *L. monocytogenes* se torna preocupante pela sua habilidade de colonizar e formar biofilmes em diferentes superfícies, bióticas e abióticas (JEYASEKARAN et al., 2000). Esta característica se agrava ainda mais pela dificuldade que se enfrenta para controlá-la e removê-la das superfícies, dada à capacidade ampla de crescimento em condições adversas (LEBERT et al., 2007). Por esta razão, biofilmes de *L. monocytogenes*

tem se tornado um constante desafio para quem trabalha com processamento de alimentos (SANDASI et al., 2008), especialmente os que são submetidos à intensa manipulação e sem tratamento adicional, como é o caso das hortaliças minimamente processadas prontas para o consumo.

Biofilmes são reconhecidos como nichos para sobrevivência de patógenos (BEUCHAT, 2002) e os fatores envolvidos na sua formação podem estar relacionados com as características das células microbianas (forma, hidrofobicidade e composição da superfície celular) e condições ambientais, como força iônica e pH (ABBASNEZHAD et al., 2008). Esta organização celular faz com que os biofilmes sejam considerados verdadeiros ecossistemas microbianos, onde as células agem de forma coletiva e sinérgica, que, somado às fortes propriedades aderentes, tornam esse sistema um complexo celular possuidor de destacável resistência à ação de compostos sanitizantes (MIDELET e CARPENTIER, 2004). Isto implica que diversas doenças de origem alimentar podem ser oriundas de biofilmes presentes em vegetais, dentre os quais os verde-folhosos (SIVAPALASINGAN et al., 2004).

A formação de biofilmes se dá a partir de micro-organismos associados a resíduos alimentares presentes em determinada superfície. Envolvidos pelos resíduos, os micro-organismos não são totalmente eliminados durante o processo de sanitização. Inicia-se, assim, o crescimento e proliferação das células microbianas, que adotam a adesão como o primeiro mecanismo de defesa. Essa adesão inicial é um processo reversível. Em seguida, ocorre a produção de material exopolimérico pelas células microbianas, que tem forte poder aderente, e o surgimento de microcolônias, as quais, por meio de sinais emitidos entre elas (regulação genética e '*quorum sensing*'), formam grupamentos tridimensionais denominados biofilmes (Fig 3). Por fim, ocorre a dispersão de células para formar novos biofilmes (SHI e ZHU, 2009; WATNICK e KOLTER, 2000). Salienta-se que neste processo de formação de biofilmes, as características do substrato, do ambiente, da superfície e de regulação genética do micro-organismo exercem importante papel sobre a reversibilidade da adesão, a formação de microcolônias e ainda sobre o tamanho do biofilme (SHI e ZHU, 2009).

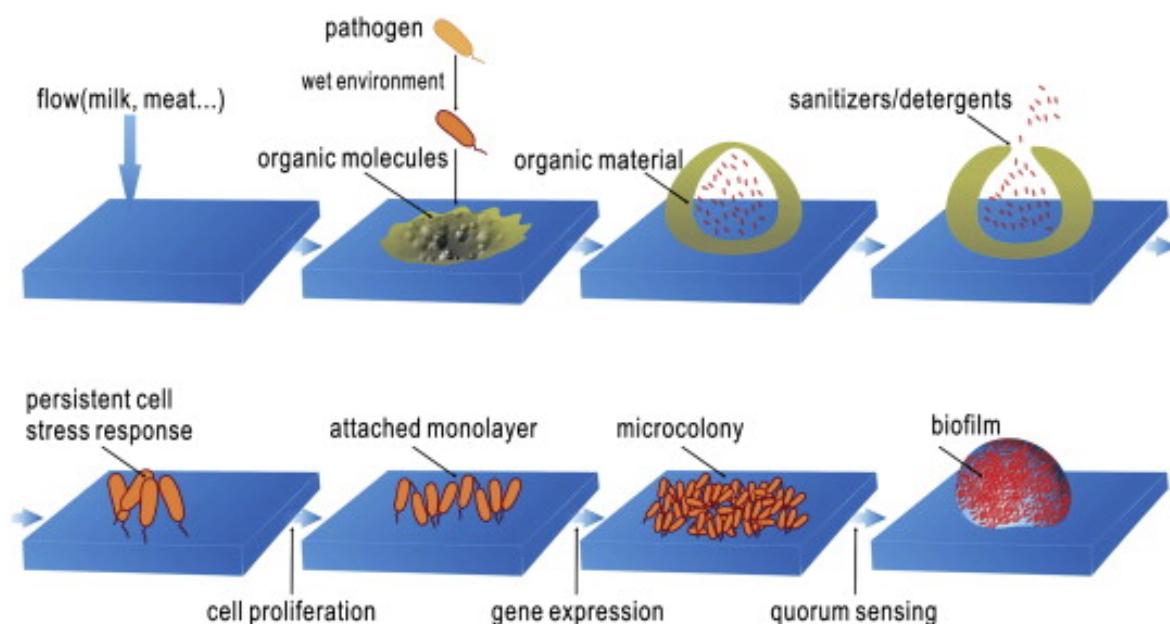


Figura 3. Sequência de eventos que ocorrem durante a formação de um biofilme microbiano sobre superfícies de processamento de alimentos (Shi e Zhu, 2009).

Cordano e Jacquet (2009) pesquisaram, por 6 anos consecutivos, a prevalência com que *L. monocytogenes* ocorria nas saladas que eram comercializadas em supermercados do Chile. Foram ao todo 717 amostras analisadas, distribuídas em 3 grupos: (i) vegetais crus congelados, (ii) vegetais crus ou cozidos prontos para o consumo preparados nos supermercados e (iii) vegetais crus minimamente processados prontos para o consumo adquiridos de uma indústria já embalados, sem adição de conservantes. Das 347 saladas do primeiro grupo, 88 foram positivas para a bactéria; das 216 amostras de saladas preparadas nos próprios supermercados, em 22 detectou-se o micro-organismo; e não foi detectada *L. monocytogenes* em nenhuma das 154 amostras de saladas preparadas na indústria e apenas comercializadas nos supermercados. No Brasil, em estudo recente com hortaliças folhosas minimamente processadas (agrião, couve, repolho, alface, espinafre, cebolinha, chicória, rúcula) adquiridas de 06 supermercados de São Paulo, encontrou-se *L. monocytogenes* em apenas 02 das 162 amostras analisadas (OLIVEIRA et al., 2010).

Não raro, *L. monocytogenes* tem sido implicada em surtos de origem alimentar associados com produtos prontos para o consumo. Tais surtos são denominados de listeriose, doença que pode ser do tipo não-invasiva e invasiva. Não-invasiva pode ocorrer com qualquer pessoa que tenha ingerido um alimento contaminado com este micro-organismo contendo pelo menos 10^3 UFC/g ou mL, e invasiva, quando a contaminação se dá em populações de alto

risco (gestantes, crianças, idosos e demais pessoas imunocomprometidas), que são mais propensas a desencadear quadros de meningite, encefalite, septicemia e aborto (McLAUHLIN et al., 2004; WONG et al., 2000). A preocupação acerca do tema tem despertado a atenção de pesquisadores em todo o mundo, no sentido de buscar alternativas eficazes para o controle desse micro-organismo e alguns dos resultados obtidos vêm sendo satisfatórios, particularmente quando se tratam de antimicrobianos naturais.

Kim et al. (2011) testaram a eficácia do extrato de cravo, nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{L/mL}$, frente a *L. monocytogenes* previamente inoculada em alface (5.31 log UFC/g) e verificaram que nas concentrações maiores foi possível reduzir a contagem inicial em pelo menos 2 ciclos logaritmos, logo após 1 minuto de exposição ao extrato. Os óleos essenciais de tomilho e orégano também reduziram de maneira significativa a contagem de *L. monocytogenes* inoculada experimentalmente em queijos acondicionados sob atmosfera modificada (GOVARIS et al., 2011). Gachkar et al. (2007), por sua vez, encontraram sensibilidade de *L. monocytogenes* frente ao óleo essencial de *R. officinalis* (alecrim

), corroborando com os achados de Bubonja-Songe et al. (2011), Muñoz et al. (2009) e Pandit e Shelef (1994).

Molinos et al. (2009) buscaram potencializar a ação anti-listerial de uma bacteriocina (enterocina AS-48) ao aplicá-la em combinação com outros antimicrobianos, dentre os quais os óleos essenciais de orégano e alecrim. Os resultados evidenciaram que a quantidade de enterocina necessária para causar uma redução na contagem de células de *L. monocytogenes* a níveis abaixo do limite de detecção foi de 40 $\mu\text{g/g}$. Entretanto, quando à enterocina foram associados os óleos de orégano ou alecrim, na proporção de 10 e 20 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente, conseguiu-se uma redução de 25% na quantidade de enterocina necessária para surtir o mesmo efeito.

Sandasi et al. (2008) chamaram a atenção, sobretudo, da necessidade de se realizar estudos que tenham como foco os biofilmes de *L. monocytogenes*, uma vez que são mais resistentes à intervenção terapêutica. Constataram, em seus estudos, que um biofilme pré-formado não foi afetado pela ação dos fitoconstituintes (α -pinene, 1,8-cineol, limoneno, linalool e acetato de geranila), quando aplicados de maneira isolada. Em pesquisa semelhante, Leonard et al. (2010) verificaram capacidade inibitória dos óleos essenciais de *Mentha spicata* (hortelã verde) e *Syzigium aromaticum* (cravo-da-índia) e efeito contrário para os óleos de *Lippia rehmannii* (cambará) e de *Cymbopogon citratus* (capim-santo), que, ao invés de inibirem, promoveram o aumento da biomassa dos biofilmes de *L. monocytogenes*.

3.2.2 *Yersinia enterocolitica*

O gênero *Yersinia* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende uma coleção de 11 espécies bacterianas, das quais 03 são potencialmente patogênicas (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*) (SULAKVELIDZE, 2000). Destas, *Y. enterocolitica* é uma das espécies mais investigadas, uma vez que é considerada um importante patógeno de origem alimentar (COCOLIN e COMI, 2005; BEUCHAT, 2002).

Y. enterocolitica é uma bactéria anaeróbica facultativa, não esporulada, oxidase negativa, fermentadora de glicose com pouca ou nenhuma produção de gás. A temperatura ideal para seu crescimento é entre 25-37°C, porém consegue se multiplicar entre 1,3 e 42°C, sendo, portanto, classificada como psicrotrófica. Consegue se desenvolver em pH 4,6-9,0 e em concentrações inferiores a 7% de NaCl (TENNANT et al., 2003; STERN et al., 1980).

Esta bactéria vem sendo encontrada em uma variedade de alimentos, como leite cru, leite achocolatado, creme de leite, sorvete, carnes cruas e vegetais, como cenouras, alface, tomates, aipo e cogumelos (FILETICI et al., 2000). Cocolin e Comi (2005) também encontraram *Y. enterocolitica* em 03 amostras de vegetais prontos para o consumo. Sakai et al. (2005) relataram um surto de origem alimentar causado pela ingestão de saladas contaminadas por *Y. enterocolitica* O:8, uma das espécies mais patogênicas do gênero. Em outra pesquisa, de um total de 120 amostras de alface minimamente processada, em 71 delas detectou-se *Y. enterocolitica* (SZABO et al., 2000). Lee et al. (2004) encontraram *Yersinia* spp. em 4% dos vegetais estudados. Xanthopoulos et al. (2010) também observaram a baixa frequência de *Y. enterocolitica* em saladas minimamente processadas e Soriano et al. (2001) e Velázquez et al. (2009) não identificaram sua presença nas amostras de vegetais pesquisadas.

Muito embora seja constatado um baixo número de patógenos, como *Y. enterocolitica*, em algumas amostras de vegetais minimamente processados, é sabido que em condições apropriadas e tempo suficiente, as poucas células, quando existentes, alcançam populações numerosas, excedendo 10^7 UFC/mL ou g (VELÁSQUEZ et al., 2009). Provavelmente, isso explica a razão de *Y. enterocolitica* ser comumente implicada em surtos de origem alimentar (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006; FALCÃO et al., 2002).

Com vistas a reduzir a incidência de doenças causadas por *Y. enterocolitica*, alguns autores têm buscado por alternativas naturais para controlar o seu crescimento, particularmente com a aplicação de óleos essenciais. Goñi et al. (2009) verificaram que *Y.*

enterocolitica foi o micro-organismo menos resistente à ação dos óleos essenciais de cravo e canela, aplicados de maneira isolada. Quando usados em combinação, obtiveram uma maior zona de inibição do crescimento. Demirci et al. (2008) compararam a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *Phlomis russeliana* e *Phlomis grandiflora* com aquela dos antimicrobianos ácido cítrico e ácido ascórbico, frente a diversos micro-organismos patogênicos e constataram, conforme as concentrações inibitórias mínimas obtidas, que o maior efeito antimicrobiano contra *Y. enterocolitica* ocorreu para *P. grandiflora*, seguido por *P. russeliana*, ácido cítrico e ácido ascórbico, com as concentrações de 125, 500, 500 e 1000 µg/ml, respectivamente.

3.2.3 Bacterias emergentes

Pseudomonas fluorescens e *Aeromonas hydrophila* são considerados micro-organismos emergentes em hortaliças. A emergência ocorre quando um micro-organismo passa a habitar e a ser encontrado em um determinado produto alimentício, onde até então não havia sido previamente detectado (SANTOS e CUNHA, 2007). A emergência tem sido geralmente associada ao surgimento de novas técnicas de processamento e conservação, que repercutem no provimento de diferentes rotas ecológicas para a contaminação e proliferação de patógenos. Com o advento do processamento mínimo, as hortaliças passaram a figurar no cenário dos alimentos capazes de causar surtos de doenças microbianas transmitidas por alimentos.

3.2.3.1 *Pseudomonas fluorescens*

P. fluorescens é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, oxidase positiva e sintetizadora de um pigmento, denominado pioverdina, um tipo de sideróforo verde-amarelado. A temperatura ideal para seu crescimento é de 25-30°C. É disseminada em ambientes diversos, principalmente devido ao seu curto tempo de geração (WIEDMANN et al, 2000). Trata-se de um micro-organismo extremamente importante em produtos vegetais,

não somente por se envolver em processos de deterioração, mas pela capacidade de formar biofilmes (SIMÕES et al., 2008b; BEUCHAT, 2002).

O gênero *Pseudomonas* é quase sempre dominante em alimentos deteriorados (DEL RIO et al., 2007). Sua habilidade de penetrar nos alimentos se deve à produção de biosurfactantes, os quais diminuem a tensão superficial dos alimentos, propiciando a invasão com posterior utilização de diversas fontes de carbono para lhes fornecer energia (MAIER, 2003; NIELSEN et al., 2002). Em se tratando de vegetais, Holley e Patel (2005) associaram à presença de *P. fluorescens* a redução da vida de prateleira destes produtos. A deterioração em produtos vegetais refrigerados é caracterizada por off-flavors, descoloração, produção de gás e podridão mole (OUSSALAH et al., 2006).

Em relação à propriedade de colonizar superfícies e formar biofilmes, Song e Leff (2006) buscaram investigar a influência da concentração de Mg^{++} (0, 0.1 e 1.0mM $MgCl_2$) sobre a formação de biofilmes por *P. fluorescens*. Inicialmente, foi visto que o magnésio não exerceu influência sobre o crescimento de células planctônicas, porém, durante a formação do biofilme, promoveu um aumento considerável no número de células aderidas. Segundo Fletcher (1988), cátions divalentes, como Mg^{++} e Ca^{++} , podem influenciar na formação de um biofilme, tanto diretamente, por meio de suas interações eletrostáticas, como indiretamente, via processo fisiológico, já que esses cátions são importantes na homeostase celular.

Simões et al. (2008a), também cientes do risco que os biofilmes conferem à saúde, realizaram um estudo com vistas a avaliar o comportamento de células de *P. fluorescens* aderidas em uma superfície de vidro frente a exposição a substâncias biocidas e surfactantes (OPA – orto-ftalaldeído e CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio). Foi verificado que, embora ambos os produtos químicos tenham interagido fortemente com as bactérias, eles não foram capazes de removê-las da superfície. Os autores acreditam que uma camada de células aderidas, mesmo que mortas, pode servir como uma base para que outros micro-organismos colonizem e formem biofilmes. Assim sendo, eles não recomendam a aplicação desses compostos na remoção de biofilmes microbianos.

P. fluorescens apresenta, ainda, alta resistência a diversos antibióticos. Geralmente, quando se discute sobre resistência microbiana a antibióticos, é comum associar com os micro-organismos presentes alimentos de origem animal, deixando de considerar os riscos que os vegetais trazem consigo. Bezanson et al. (2008), preocupados com essa possibilidade, realizaram um estudo com algumas hortaliças folhosas e verificaram que, dos 140 micro-organismos isolados resistentes a um ou mais antibióticos, 93,5% foram resistentes a

ampicilina, 90% a cefalotina, 35,7% ao clorafenicol, 10% a estreptomicina, 4,2% a ácido nalidíxico, 4,2% a canamicina e 2,8% a gentamicina. Destes, 34 tiveram suas espécies identificadas e em sua maioria (n=24) eram membros da espécie *P. fluorescens*. Resultados semelhantes foram obtidos por Hamilton-Miller e Shah (2001), que determinaram, em saladas de vegetais, a resistência de *P. fluorescens* aos 6 antibióticos testados. A detecção desta bactéria em hortaliças deve servir de alerta para o perigo potencial de produtos frescos serem veiculadores dessa resistência aos seres humanos.

Considerando os riscos à saúde que envolve esse micro-organismo, alguns estudos já vêm sendo conduzidos com óleos essenciais de plantas como forma de combater o seu crescimento e proliferação. Ouattara et al. (1997) estudaram os óleos essenciais de canela, cravo, pimenta e alecrim e detectaram forte poder inibitório contra *P. fluorescens*, ao que atribuíram à presença de cinamaldeído nos óleos essenciais. Baranowski e Nagel (1982) já haviam relatado que alilhidroxycinamatos, compostos similares ao cinamaldeído, inibiram *P. fluorescens* por meio de mecanismos que envolvem depleção de energia celular.

Mais recentemente, Tyagi e Malik (2010) verificaram que as concentrações dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Mentha arvensis* (0.567 mg/ml) promoveram efeito bacteriostático contra *P. fluorescens*, ao passo que a concentração do óleo essencial de *Mentha piperita* (1.125 mg/ml) foi considerada bactericida. Estes resultados indicam as possibilidades de uso desses óleos em sistemas alimentares, a exemplo na etapa de sanitização, por meio da qual se busca reduzir a contagem microbiana e prevenir o crescimento de *P. fluorescens*. Em 2011, dando continuidade ao estudo com *Mentha piperita* (óleo mais ativo), os autores verificaram que *P. fluorescens* foi a mais resistente dentre todas as bactérias expostas (*Escherichia coli* aDH5, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) ao óleo essencial (TYAGI e MALIK, 2011).

Muito embora promissores para uso na conservação de alimentos, ainda são escassos os relatos sobre a capacidade de óleos essenciais reduzirem as contagens de *P. fluorescens* em matrizes alimentares. Wan et al. (1998) reduziram a contagem de *P. fluorescens* com a adição de óleo essencial de manjerição na água de lavagem de alface fresco, resultado similar aos obtidos no tratamento com cloro. Azerêdo et al. (2011) também obtiveram resultados satisfatórios com a aplicação combinada dos óleos essenciais de orégano e alecrim na sanitização de hortaliças minimamente processadas.

3.2.3.2 *Aeromonas hydrophila*

O gênero *Aeromonas* faz parte da família *Aeromonadaceae* e consiste de 14 diferentes espécies, uma das quais é a *Aeromonas hydrophila*. Muito embora a temperatura ótima de crescimento seja 30°C, esta bactéria consegue se desenvolver muito bem sob refrigeração (4-5°C), pH 5,3-8,4 e concentração de NaCl até 4,5%. (PALUMBO et al., 1985). É uma bactéria anaeróbica facultativa, logo consegue sobreviver em atmosferas com baixo teor de oxigênio (HERRERA et al., 2007). Esta espécie é considerada um patógeno emergente de origem alimentar, uma vez que tem sido associado com uma variedade de infecções locais e sistêmicas. A maior parte dos casos de doenças está associada ao consumo de produtos prontos para o consumo mantidos sob refrigeração.

As principais doenças causadas por *Aeromonas* spp. são classificadas em 2 grandes grupos: septicemia (principalmente as espécies *A. ueronii* subsp. *sobria* e *A. hydrophila*) e gastroenterites (qualquer *Aeromonas* spp. mesofílica, em especial *A. hydrophila* e *A. veronii*) (MERINO et al., 1995).

A. hydrophila tem sido encontrada em diversos produtos de origem vegetal, sobretudo em saladas (GARCÍA-GIMENO et al., 1996). Callister e Agger (1987), em estudo com hortaliças, detectaram *A. hydrophila* em quase todas as amostras analisadas. McMahon e Wilson (2001) avaliaram a ocorrência de espécies de *Aeromonas* spp. em vegetais orgânicos e detectaram esta bactéria em 41% dos vegetais orgânicos minimamente processados. Destes, 5,8% foram identificadas como sendo *A. hydrophila*.

Sua toxicidade vem também sendo investigada. Amostras de *Aeromonas* isoladas de fontes clínicas e alimentares foram identificadas e seu perfil citotóxico determinado. Foram ao todo 194 isolados de *Aeromonas* spp., sendo 99 a partir de alimentos e 95 de fontes clínicas. 34 (36%) dos isolados humanos e 27 (27%) de origem alimentar foram identificados como sendo *A. hydrophila*, que apresentou capacidade enterotoxigênica e hemolítica (MARTINS et al., 2002). Resultados semelhantes foram obtidos por Ottaviani et al. (2011), que encontraram genes tóxicos em 10 das 29 cepas de *A. hydrophila* isoladas de amostras clínicas, de alimentos e de água de irrigação. Além desta comprovada toxicidade, *A. hydrophila* causa preocupação também porque tem se mostrado resistente a diversos antibióticos utilizados na prática clínica, como ampicilina, bacitracina, cefoxitina, dentre outros (NAGAR et al., 2011). Essa resistência antimicrobiana pode estar relacionada com a presença de plasmídeos, os quais podem

codificar proteínas capazes de formar pili, e a partir destes, as bactérias passam a transferir plasmídeos entre si, contribuindo para a proliferação de estirpes multirresistentes (PALÚ et al., 2006).

A resistência de *A. hydrophila* está associada ainda à sua habilidade de formar biofilmes. Gavín et al. (2003) atribuem tal capacidade à presença de 2 flagelos. Um, permite que a bactéria se mova em meios líquidos e, nos ambientes em que a bactéria não consegue se movimentar, ela faz uso desse segundo, um flagelo lateral (SHIMADA et al., 1985), fenômeno que pode estar associado com a colonização de superfícies, haja vista o forte poder aderente que ele possui.

A este respeito, Elhariry (2011) desenvolveu uma pesquisa com o objetivo de avaliar a capacidade de *A. hydrophila* formar biofilmes nas superfícies foliares das hortaliças couve e alface. Foi verificado comportamento diferenciado dos biofilmes entre as superfícies estudadas. A adesão em folhas de alface se deu mais rapidamente que nas de couve ($p < 0,05$). Segundo Ells e Hansen (2006), a adesão de células bacterianas na superfície das folhas envolve tanto características relacionadas à morfologia da planta, quanto às propriedades físico-químicas de ambos, bactéria e plantas (UKUKU e FETT, 2002).

A morfologia das plantas exerce influência na formação de biofilmes por causa da presença de cavidades, as quais possibilitam não somente a penetração, mas, sobretudo, a proteção dos micro-organismos frente à ação de agentes externos, como os sanitizantes (ELHARIRY, 2011). As propriedades físico-químicas de bactérias e plantas estão relacionadas à hidrofobicidade, isto é, as bactérias que possuem características hidrofóbicas, devido à presença de flagelos, fímbrias e lipopolissacarídeo, apresentam a capacidade de reduzir a força repulsiva entre as superfícies, possibilitando a adesão (SHI e ZHU, 2009) e, em se tratando de substratos folhosos, sua superfície também é hidrofóbica, devido à presença de uma cutícula de cera que o vegetal produz para evitar perdas de água por desidratação (BURNETT e BEUCHAT, 2000).

Assim, diante da facilidade com que *A. hydrophila* pode ser veiculada aos seres humanos, via alimentos e água contaminados, e da patogenicidade que apresenta, alguns estudos vem sendo conduzidos com óleos essenciais, no intuito de reduzir sua contagem nestes produtos. Wan et al. (1998) obteve eficácia com 1 e 10 $\mu\text{L/mL}$ (v/v) de óleo essencial de manjerição sobre a contagem total de *Aeromonas* em alface, resultado semelhante com aquela em que se aplicou 125 ppm de cloro. Uyttendaele et al. (2004) investigaram o potencial de aplicação de água clorada, ácido láctico e óleo essencial de tomilho, no controle

de *Aeromonas* em vegetais minimamente processados. Conforme os resultados, *A. hydrophila* mostrou-se resistente apenas à água clorada (até 0.5mg/L), sendo susceptível à ação do ácido láctico (10 e 20 µL/mL) e do óleo essencial de tomilho (5 µL/mL e 10 µL/mL). Delamare et al. (2007) buscaram comparar as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de *Salvia officinalis* L. e *Salvia triloba* L., espécies cultivadas no Sul do Brasil, contra uma diversidade de micro-organismos patogênicos, dentre os quais *A. hydrophila*. Foi verificado que ambos os óleos foram bactericidas, inclusive em concentrações sub-inibitórias. Cineol e cânfora representam os compostos majoritários destes óleos. Baydar et al. (2004) também já haviam detectado sensibilidade de *A. hydrophila* a óleos essenciais, dentre os quais o de orégano.

Como exposto, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens* e *Aeromonas hydrophila* são micro-organismos que conseguem se desenvolver em baixas temperaturas. Assim, a sobrevivência e multiplicação de determinado micro-organismo em hortaliças são influenciados pelos fatores ecológicos intrínsecos e extrínsecos naturalmente presentes ou impostos em um ou mais pontos durante as etapas de produção, processamento e distribuição (INATSU et al., 2005). Para prolongar a vida de prateleira de vegetais e garantir sua inocuidade, devem, então, ser adotadas medidas de controle frente a essas populações microbianas, por meio de técnicas pós-colheita, como lavagem e sanitização.

3.3 Sanitização de hortaliças minimamente processadas

3.3.1 Óleos essenciais como alternativas - mecanismos de ação antimicrobiana

Em geral, células bacterianas oferecem três importantes regiões para a ação de agentes antibacterianos: a parede celular, a membrana citoplasmática e o citoplasma. A parede celular é composta por uma rede de peptidoglicano (associada a uma camada de lipopolissacarídeo-LPS, quando se trata de bactérias Gram-negativas) e não oferece variados sítios adequados para a ação biocida. A membrana citoplasmática, por sua vez, proporciona uma matriz equilibrada de interações entre fosfolípídeos e proteínas estruturais e enzimáticas, assegurando um controle da impermeabilidade e organização topológica, pelas quais a

homeostase e o metabolismo são mantidos (SINGER e NICOLSON, 1972). Esta multiplicidade de interações faz com que a membrana citoplasmática se torne o principal alvo de ataque por parte dos compostos antibacterianos. Já no citoplasma, onde se encontra todo o arcabouço da replicação bacteriana, existem diversos sítios-alvo para compostos antibióticos, porém, em virtude de apresentar-se envolvido pela membrana citoplasmática, passa a ser a última região de destino do agente antibacteriano (DENYER e STEWART, 1998).

Aplicações de compostos lipofílicos como bactericidas compreendem desde os sabões até detergentes anti-sépticos usados para tratamentos de água potável ou para prevenir a deterioração de produtos alimentícios. Desde o início do século, compostos com amplo espectro antimicrobiano vêm sendo usados como sanitizantes. Estes incluem, principalmente, os compostos quaternários a base de amônio e os compostos clorados (HOUARI e DI MARTINO, 2007)

No que condiz aos compostos clorados, o hipoclorito de sódio é um potente agente sanitizante com propriedades oxidantes, sendo o mais comumente usado pelas indústrias de alimentos para desinfetar tanto produtos, como equipamentos da área de processamento (NIEUWENHUIJSEN et al., 2000). Sua eficácia aumenta em razão da concentração de cloro disponível e, quando adicionado em água, promove formação de ácido hipocloroso, o qual possui propriedade antimicrobiana (BEUCHAT, 2002). Contudo, o hipoclorito de sódio pode, de maneira incompleta, oxidar componentes dos alimentos, com subsequente formação de produtos nocivos à saúde, como clorofórmio, ácido haloacético e outros trihalometanos que têm recebido destacada atenção por seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos (NIEUWENHUIJSEN et al., 2000). Por esta razão, e ainda para satisfazer a exigência dos consumidores por alimentos saborosos, nutritivos e saudáveis, a tendência vem sendo a substituição de aditivos e sanitizantes sintéticos por preservativos naturais (TIWARI et al., 2009; SKANDAMIS et al., 2000).

Compreendem preservativos naturais uma série de produtos oriundos de plantas, animais e micro-organismos que provêm uma significativa fonte de substâncias com o potencial antimicrobiano. Os efeitos da aplicação desses biopreservativos são a redução ou eliminação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, além de prover benefícios à qualidade global dos produtos alimentícios (PONCE et al., 2011).

Diversos são os metabólitos secundários de plantas que exercem esta atividade, como os alcalóides, antraquinonas, terpenóides, saponinas, flavonóides (ácidos fenólicos e flavonas), lactonas e óleos essenciais (RÍOS e RECIO, 2005). Particularmente, os óleos

essenciais são compostos naturais, voláteis e caracterizados por um odor acentuado. Vêm sendo utilizados não somente em produtos farmacêuticos por suas propriedades terapêuticas, mas também nas áreas a) agrária, exercendo um importante papel na proteção das plantas, ora impedindo a ação de agentes fitopatogênicos, ora ajudando na polinização, por meio da atração de insetos que auxiliam na dispersão de polens e sementes; b) alimentícia, como preservativos e aditivos para uso humano e animal; e de c) cosméticos, por suas propriedades antioxidante e flavorizante (GONÇALVES et al., 2012; BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais podem ser sintetizados por diversos órgãos (flores, folhas, caule, sementes, frutos...) e são armazenados em células secretoras, cavidades ou células epidérmicas da planta (BAKKALI et al., 2008). Conforme o método de extração, podem apresentar variações em sua composição química. Okoh et al. (2010), ao investigarem a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim, quando submetido a diferentes métodos de extração, observaram que quando o óleo foi extraído por microondas, livre de solvente, apresentou maior atividade antimicrobiana do que aquele obtido por hidrodestilação. Isto foi devido, provavelmente, à maior quantidade de monoterpenos oxigenados presentes no óleo extraído por microondas, em decorrência de menores impactos térmicos e hidrolíticos, quando comparados à hidrodestilação (LUCCHESI et al., 2004).

Os óleos essenciais de plantas têm atraído interesse pelo fato de caracterizarem-se como produtos naturais reconhecidos como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), possuir amplo espectro de atividade antimicrobiana e apresentar eficácia no controle de bactérias patogênicas e deteriorantes de importância em hortaliças prontas para o consumo (GUTIERREZ et al., 2008b). Conhecidos por suas propriedades anti-sépticas, além de sua característica marcante na fragrância, os óleos essenciais podem ser aplicados em sistemas de conservação de alimentos (CAVAR e MAKSIMOVI, 2012; BAKKALI et al., 2008).

Em relação a suas propriedades biológicas, pode-se dizer que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais não depende apenas de sua composição química, mas também de sua configuração estrutural, grupos funcionais e possíveis interações aditivas e sinérgicas entre seus componentes, que basicamente se dividem em 2 grandes grupos: o grupo principal é representado pelos terpenos e terpenóides (terpenos que contêm oxigênio em sua estrutura) e o outro grupo por constituintes aromáticos e alifáticos, todos de baixo peso molecular (Figura 4).

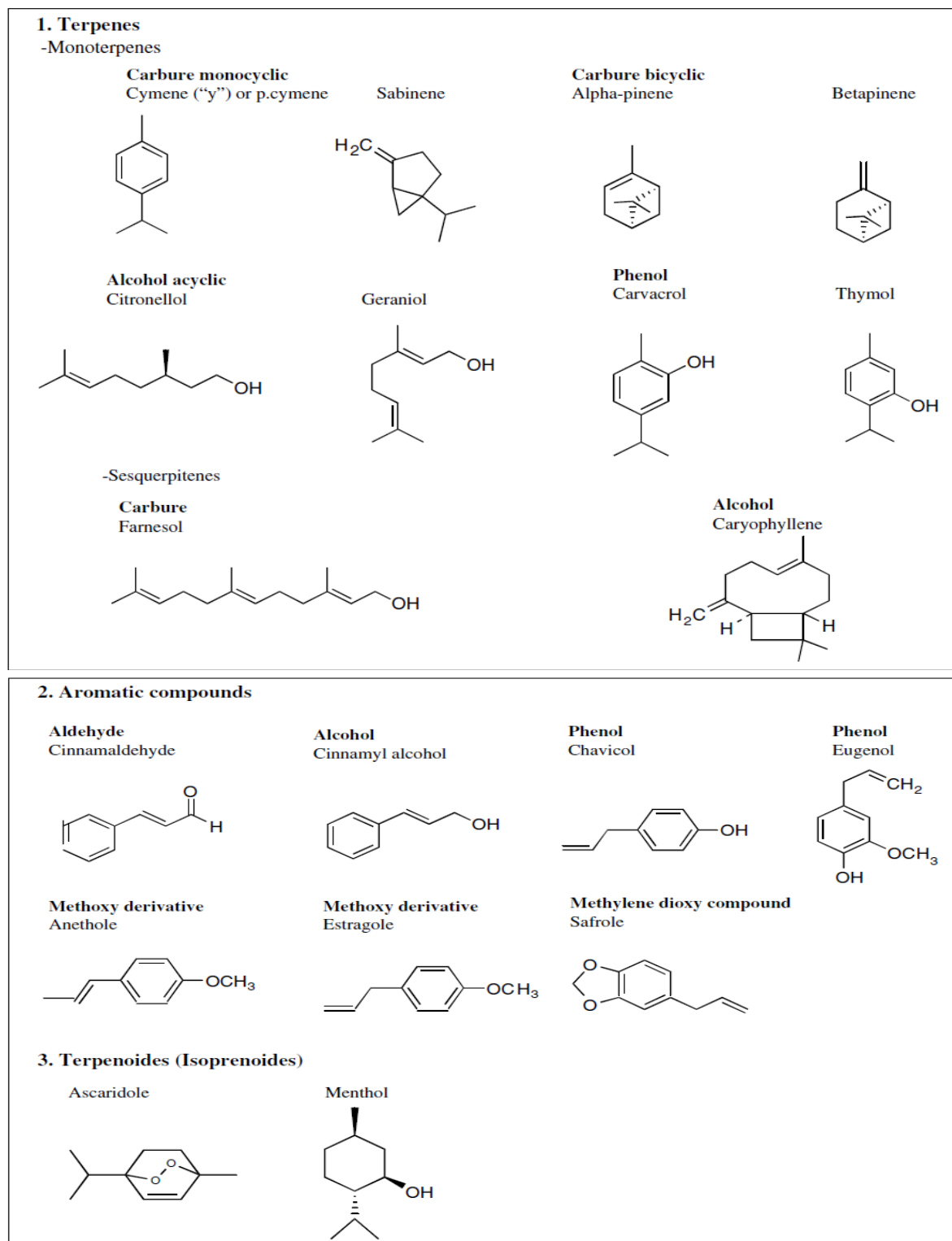


Figura 4. Estrutura química dos principais constituintes dos óleos essenciais (Bakkali et al., 2008).

Os terpenos mais comuns são os monoterpenos e sesquiterpenos, no entanto, hemiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos podem também existir. Boa parte dos

terpenos são hidrocarbonetos, porém quando ocorre a presença de oxigênio em sua estrutura (álcoois, aldeídos ou cetonas), são chamados de terpenóides. Os compostos aromáticos, por sua vez, ocorrem com menos frequência que os terpenos, destacando-se daquele grupo os compostos cinamaldeído e eugenol, possuidores de propriedade antioxidante e antimicrobiana (BAJPAI et al., 2011).

Vem sendo sugerido que os óleos que apresentam compostos fenólicos e terpenos em sua composição são os que exprimem destacado potencial antimicrobiano (TIAN et al., 2012; DORMAN e DEANS, 2000). Corroboraram com essa hipótese Shan et al. (2007), ao encontrarem, em especiarias, uma forte correlação entre a presença desses compostos com as atividades antioxidante e antimicrobiana. Todavia, resultados discordantes foram encontrados por Weerakkody et al. (2010) que, além de não detectarem esse tipo de associação, ainda sugeriram que outras substâncias, como aldeídos e ácidos orgânicos poderiam também contribuir com o efeito antimicrobiano. Segundo Juven et al. (1994), o efeito antimicrobiano dos compostos fenólicos pode ser também dependente da concentração ensaiada, uma vez que, em baixas concentrações, os fenóis afetaram a atividade de enzimas, particularmente aquelas envolvidas na produção de energia, ao passo que em altas concentrações, causaram desnaturação protéica.

Dentre os óleos essenciais mais investigados, àqueles obtidos das folhas de orégano (*Origanum vulgare* L.) tem se revelado como possuidor de destacáveis propriedades antimicrobianas frente a diversos micro-organismos deteriorantes e patogênicos de interesse em hortaliças prontas para o consumo (CARMO et al., 2008; SOUZA et al., 2005). Essa característica aponta o óleo essencial de orégano como um potente sanitizante natural de possível aplicação tecnológica na indústria de alimentos. Contudo, face ao acentuado odor que o óleo essencial de orégano confere aos produtos alimentícios, outras opções vêm sendo investigadas visando minimizar esses inconvenientes sobre os atributos sensoriais, a partir de ensaios que testem a aplicação combinada de óleos essenciais em diferentes proporções. Neste sentido, o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), que embora não faça parte do grupo de óleos essenciais de mais elevado poder antimicrobiano, tem em suas moléculas grupos funcionais com propriedades biológicas, as quais podem, de maneira aditiva ou sinérgica, interagir com os componentes presentes no óleo essencial de orégano. Atrelado a isso, se tem ressaltado a suavidade de odor do óleo de alecrim, indicada como uma vantagem adicional para uso em hortaliças minimamente processadas.

3.3.1.1 Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.)

Origanum vulgare L. é uma das espécies mais importantes da família *Lamiaceae* (VIUDA-MARTOS et al., 2009), utilizada frequentemente na culinária como aromatizante, em sua forma fresca ou desidratada, cujo odor conferido aos produtos alimentícios é bem aceito pelos consumidores em todo o mundo. Sua outra aplicação comercial, de grande relevância nos dias atuais, refere-se a seu óleo essencial, em virtude de seus compostos apresentarem diversas propriedades químicas e biológicas, como antioxidante (CASTILHO et al., 2012; ALBANO e MIGUEL, 2011), antibacteriana (NOSTRO et al., 2004; MOREIRA et al., 2005), antifúngica e antimutagênica (FARIAS et al., 2010; FIGIEL et al., 2010; ÖZBEK et al., 2008; YANISHLIEVA et al., 2006).

Em pesquisas realizadas *in vitro*, Souza et al. (2007) em estudo inicial sobre o potencial antimicrobiano de diferentes óleos essenciais de especiarias de origem nacional, encontrou uma destacável propriedade antimicrobiana de *O. vulgare* sobre uma variedade de bactérias patogênicas e deteriorantes, como também de espécies leveduriformes de interesse em alimentos. Sahin et al. (2004) também detectaram efetividade antimicrobiana deste óleo, uma vez que inibiu o crescimento de *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*.

Os componentes majoritários do óleo essencial de óregano, aos quais se atribui a capacidade antimicrobiana, são o timol e o carvacrol (VALERO e FRANCÊS, 2006). Mesmo sendo reconhecidas as propriedades antimicrobianas deste óleo, ainda não foi possível determinar com clareza os mecanismos de ação que justifiquem tal atividade. Um dos mecanismos já propostos é o de que timol e carvacrol são capazes inibir as etapas iniciais da biossíntese do peptidoglicano ou de remover os íons magnésio que estabilizam o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias Gram-negativas (SIKKEMA et al., 1995).

O LPS presente em bactérias Gram-negativas confere um comportamento hidrofílico, exercendo um papel de barreira à penetração de compostos hidrofóbicos e, por consequência, maior resistência aos antibióticos de característica apolar (NIKAIDO e VAARA, 1985). Entretanto, a membrana externa não é impermeável às moléculas hidrofóbicas que contêm fenóis em sua estrutura, como é o caso do carvacrol e do timol, os quais conseguem penetrar na membrana através das porinas.

Helander et al. (1998) já haviam relatado que o carvacrol e o timol causaram distúrbios em células de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, ao observarem diminuição do conteúdo de ATP intracelular, enquanto simultaneamente era detectado um aumento do ATP extracelular, em células de *E. coli*. Em concordância com Naidu (2000), Helander et al. (1998) atribuíram tais disfunções à capacidade que os fenóis apresentam de alterar a permeabilidade e de desintegrar membranas.

Gill e Holley (2006) também buscaram compreender quais os mecanismos que poderiam estar envolvidos com a geração e consumo de ATP intracelular, quando células de *L. monocytogenes* foram tratadas com cinamaldeído, carvacrol e eugenol. Sugeriram que o mecanismo de ação do eugenol e carvacrol poderiam estar associados com ruptura na membrana, tendo em vista que ocorreu decréscimo do ATP intracelular e aumento no ATP extracelular. Entretanto, o mesmo efeito não ocorreu com o cinamaldeído, que embora tenha provocado o decréscimo no ATP intracelular, o ATP extracelular permaneceu inalterado. A ausência de um aumento deste ATP extracelular poderia sugerir, além de inconsistência com ruptura de membrana, que o cinamaldeído não apresentou atividade inibitória da ATPase, ao contrário do carvacrol e eugenol. Já havia sido postulado por Juven et al. (1994) e Sikkema et al. (1995) que os óleos essenciais poderiam atuar sobre a interação ATPase-lipídeo, rompendo esta ligação e, por conseguinte, causando inatividade enzimática. Estudos mais recentes comprovaram que o óleo essencial de orégano foi capaz de interferir sobre as características fisiológicas de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos, por meio da supressão de enzimas, e que esse efeito foi dependente da concentração ensaiada do óleo essencial (BARROS et al., 2009).

Postula-se, ainda, que o carvacrol e o timol possam exercer efeito deletério sobre as proteínas envolvidas na divisão celular (DI PASQUA et al., 2010), razão pela qual se explica a ocorrência de um maior número de septos celulares em células bacterianas Gram-negativas ou Gram-positivas expostas a óleos essenciais ou a seus fitoconstituintes (LA STORIA et al., 2011). Quanto mais septos, maior a vulnerabilidade das células à ação do óleo essencial (BAKKALI et al., 2008).

Isso motivou a realização de estudos com sistemas alimentares, a partir dos quais se pode observar que o óleo essencial de *O. vulgare* L. pode ser fortemente influenciado pela composição química do alimento, afetando sobremaneira sua efetividade antimicrobiana (GUTIERREZ et al., 2008a,b,c).

3.3.1.2 Óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

Dentre as 3500 espécies dos 200 gêneros da família *Lamiaceae* (BOUSBIA et al., 2009), a especiaria *R. officinalis*, popularmente conhecida como alecrim, é economicamente importante em virtude de suas folhas serem frequentemente utilizadas na culinária, como flavorizante. Não obstante, seu uso também tem sido voltado para a área medicinal, em virtude de suas constatadas propriedades anti-inflamatória, neuroprotetora (BENINCÁ et al., 2011; IZUMI et al., 2007; PENG et al., 2007), hepatoprotetora (SOTELO-FELIX et al., 2002), antioxidante (PÉREZ-FONS et al., 2010), antimutagênica e antimicrobiana (OLUWATUYI et al., 2004), cujas características conferem a essa especiaria um atrativo funcional para uma possível aplicação em indústrias de alimentos.

A atividade antimicrobiana do alecrim é atribuída à presença de flavonóides, ácidos fenólicos e da fração óleo essencial. O óleo, geralmente utilizado pelas indústrias de cosméticos e em técnicas de aromaterapia, contém diversos constituintes em diferentes concentrações, caracterizados por 2 ou 3 compostos majoritários (20 a 70%), representados pelos monoterpenos, e outros presentes em menores concentrações, os sesquiterpenos, podendo sofrer variação a depender da parte extraída, localização geográfica, condições edafoclimáticas, idade e estágio do ciclo vegetativo (GRABER et al., 2010; FAIXOVA e FAIX, 2008). Sob o ponto de vista químico, o óleo essencial de alecrim é basicamente classificado em 3 tipos: cineolífero (possui alto conteúdo de cineol), canforífero (cânfora>20%) e verbenonífero (verbenona>15%) (NAPOLI et al., 2010). Contudo, além destes, muitos outros fitoconstituintes não menos importantes se fazem presentes, como o mirceno, borneol e α -pineno (SANTOYO et al., 2005).

Já foi comprovado que muitos dos seus compostos são inibidores de diversos micro-organismos, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis* e *Shigella sonnei* (SANTOYO et al., 2005; BOZIN et al., 2007).

O óleo essencial de alecrim quando comparado aos de outras especiarias (orégano, sálvia e tomilho) tem se mostrado menos efetivo na inibição do crescimento de diversas espécies microbianas. Acredita-se que esta baixa atividade aconteça quando ocorre nestes óleos a presença majoritária de α -pineno, um hidrocarboneto monoterpênico sem núcleos aromáticos e grupos funcionais polares (Figura 5) (PORTE e GODOY, 2001).

A baixa atividade do α -pineno também foi confirmada por Jiang et al. (2011), quando realizaram estudo a fim de comparar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim com a de alguns de seus compostos isolados (α -pineno e 1,8 cineol). Os autores verificaram que o óleo essencial foi o que apresentou maior atividade, seguido pelo 1,8 cineol, e que este efeito não pode ser atribuído ao composto majoritário ou a alguns de seus compostos, mas sim à diversidade de fitoconstituintes que o compõem, os quais atuam de forma interativa e sinérgica, contribuindo para uma maior amplitude de ação antimicrobiana.

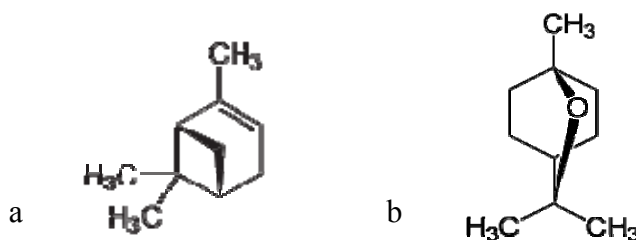


Figura 5. Estrutura química do (a) α -pineno e (b) 1,8 cineol.

A busca por alternativas mais eficazes no controle do crescimento microbiano tem conduzido a constatação de que uma combinação de óleos essenciais e/ou seus fitoconstituintes pode contribuir mais efetivamente que um óleo/fitoconstituente aplicado de maneira isolada. Isto se estende ainda à mistura de óleos essenciais com outros tipos de antimicrobianos (SOLORZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2011). Os efeitos benéficos dessa combinação podem ser aditivos ou sinérgicos, sendo de grande interesse industrial, uma vez que menores concentrações seriam requeridas para atuar como preservativo alimentar. Isto implica que o perfil qualitativo dos compostos fenólicos pode ser mais importante do que a sua quantidade total.

Neste sentido, sugere-se que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim se estabelece em decorrência do efeito sinérgico de diversas substâncias, mesmo que presentes em pequenas quantidades. Em estudo *in vitro*, Van Vuuren et al. (2009) verificaram que diversas concentrações do óleo essencial de alecrim combinadas ao antimicrobiano ciprofloxacina foram efetivas contra *K. pneumoniae*. Resultados semelhantes foram relatados por Dimitrijević et al. (2007), ao detectarem um efeito sinérgico entre o ácido lático e os óleos essenciais de alecrim ou tomilho, quando usados em pequenas concentrações. Fu et al. (2007) também investigaram a possível interação entre os óleos essenciais de cravo e alecrim em

concentrações subinibitórias, e verificaram que o efeito antimicrobiano foi influenciado não apenas pela proporção entre os óleos, mas foi, sobretudo, micro-organismo-dependente, sendo encontrado efeito antimicrobiano aditivo contra *S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. vulgaris* e *P. aeruginosa*, sinérgico para *Candida albicans* e antagônico para *Aspergillus niger*.

Apostolidis et al. (2008) verificaram que embora haja um teor mais elevado de fitoquímicos no óleo essencial de orégano quando aplicado isoladamente, a eficácia antimicrobiana ocorreu de forma mais intensa quando o óleo essencial foi aplicado em combinação com o extrato de *cranberry*. Lv et al (2011) também testaram 04 (quatro) combinações de óleos de diversas especiarias (orégano-manjeriço, manjeriço-bergamota, orégano-perilla e orégano-bergamota) e todas elas levaram à destruição celular de todos os micro-organismos investigados (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. cerevisiae*).

Outras combinações de óleos essenciais e/ou fitoconstituintes com outros antimicrobianos também foram bem sucedidas, a citar: a) óleo essencial de alho (*Allium sativum* L.) com nisina, para inibir o crescimento de *L. monocytogenes* (ROHANI et al., 2011); b) óleos de *Origanum vulgare* e *Pelargonium graveolens* com nistatina, para tratamento de *Candida* (ROSATO et al., 2009); c) óleo de eucalipto e timol em combinação com o anti-séptico gluconato de clorexidina (CHG), contra biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* (KARPANEN et al., 2008); d) timol com ácido acético na sanitização de peito de frango pré-inoculado com *Salmonella* spp. (LU e WU, 2011); e) óleos essenciais de *Satureja montana* e *Pistacia lentiscus* na redução da contagem de *L. monocytogenes* pré-inoculada em carnes (DJENANE et al., 2011); e f) óleos essenciais de orégano-tomilho, orégano-manjerona e tomilho-sálvia contra *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* (GUTIERREZ et al., 2008a).

Muito embora já se tenha bem estabelecido o papel antimicrobiano dos óleos essenciais em estudos *in vitro* e em algumas matrizes alimentares, são ainda escassos os dados acerca de sua atuação e interação com os constituintes dos alimentos. Isto suscita à necessidade da realização de estudos objetivando avaliar a eficácia destes óleos diretamente em produtos alimentícios, tendo em vista que os próprios constituintes alimentares podem reduzir ou potencializar a eficácia antimicrobiana do óleo.

A esse respeito, Gutierrez et al. (2008a) buscaram investigar a influência dos componentes presentes encontrados em alimentos (e suas quantidades) sobre o estabelecimento da ação antimicrobiana de óleos essenciais, e verificaram que quando da presença de maiores

concentrações de gorduras, proteínas e carboidratos, ocorria uma concomitante menor eficácia antimicrobiana do óleo essencial. Esta hipótese vem sendo confirmada nos poucos estudos já realizados com hortaliças folhosas, cujos alimentos se enquadram na categoria acima exposta: pobres em gorduras, proteínas e carboidratos. O efeito antimicrobiano do óleo é ainda potencializado quando outros obstáculos são impostos, como pH e temperatura baixos (abaixo de 6,0), conforme relataram Burt (2004), Cava et al. (2007) e Goñi et al. (2009).

Alguns preservativos a base de óleos essenciais já estão disponíveis no mercado: “DMC Base Natural” foi produzido por uma indústria espanhola e compreende uma mistura de 50% de óleos essenciais de alecrim, sálvia e citrus e 50 % de glicerol (MENDOZA-YEPES et al., 1997) e “Protecta One” e “Protecta Two”, que são uma combinação de extratos vegetais produzidos por uma empresa americana (Apopka, FL, USA), e consistem de um ou mais óleos essenciais dispersos em soluções de citrato de sódio e cloreto de sódio, respectivamente (CUTTER, 2000).

Não apenas a intensidade da propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais deve ser considerada como suficiente para viabilizar a sua aplicação em alimentos, de modo que se faz necessário também considerar o impacto de sua aplicação sobre as características sensoriais dos produtos alimentícios durante o armazenamento, já que tais atributos diretamente norteiam a sua aquisição por parte do consumidor.

3.4 Influência da aplicação de óleos essenciais sobre os atributos organolépticos de hortaliças minimamente processadas

Um dos aspectos que norteiam a aquisição de vegetais minimamente processados é a aparência do produto no momento da compra (RAGAERT et al., 2004). Isto foi também constatado por Ares et al. (2008a,b) e Zhou et al. (2004), quando observaram que o murchamento, escurecimento e necrose das folhas de alface exerceram forte impacto na rejeição do produto. Quando adquirido, os aspectos avaliados pelo consumidor passam a ser o sabor, odor e textura.

Dessa forma, ao se decidir pela aplicação de determinado óleo essencial 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 et al., 2009; NAZER et al., 2005; HSIEH et al., 2001). Recentemente, foi observado que alface tratada, por imersão, com 250ppm de óleo de orégano atendeu aos requisitos antimicrobianos, não apresentando diferença significativa entre aquela que foi submetida a tratamento com cloro, porém foi inaceitável sob o ponto de vista sensorial (GUTIERREZ et al., 2008c).

A técnica de aplicação dos óleos essenciais por imersão, embora proporcione maior superfície de contato do óleo com a matriz alimentar, nem sempre se traduz em eficácia antimicrobiana. Ponce et al. (2011) compararam 03 técnicas de aplicação (imersão, spray e em cápsulas de lactose) dos óleos de cravo, árvore do chá e alecrim, frente à microbiota própria de alface minimamente processada. Conforme os dados obtidos, a técnica que se revelou mais efetiva na redução da contagem microbiana foi a dos óleos encapsulados e essa redução ocorreu apenas após 7 dias de armazenamento, no entanto, a alface foi considerada inaceitável sob o ponto de vista organoléptico. As demais formas de aplicação (imersão e spray) atenderam aos requisitos sensoriais, mas foram ineficazes na inibição do crescimento da microbiota própria, a qual apresentou comportamento similar às amostras controle, não diferindo significativamente.

Com vistas a evitar os efeitos indesejáveis sobre os atributos sensoriais, pesquisas vêm sendo realizadas com mais de uma substância, a exemplo o óleo de orégano com o óleo de tomilho, que juntos apresentaram maior efetividade na inibição microbiana do que quando utilizados isoladamente (GUTIERREZ et al., 2008b; LAMBERT et al., 2001). Estes resultados suportam a idéia de que, quando usados em combinação, as concentrações requeridas podem ser menores, da mesma forma que podem minimizar o impacto sobre os atributos sensoriais (DIMITRIJEVIĆ et al., 2007).

Portanto, para otimizar a aplicação de um novo método de conservação que estenda a vida de prateleira de vegetais minimamente processados, é necessário que análises sensoriais sejam incorporadas ao desenho experimental, com o intuito de monitorar possíveis mudanças nas propriedades organolépticas. Ressalta-se também a necessidade de investigar possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos em células eucarióticas, objetivando simular as consequências de uma ingestão por seres humanos.

A este respeito, são poucos os relatos na literatura sobre os efeitos citotóxicos ou genotóxicos dos óleos essenciais e seus fitoconstituintes sobre organismos eucarióticos. Domaracky et al. (2007), em um estudo *in vivo*, não verificaram efeitos adversos sobre a

formação embrionária em ratos quando foi administrada uma dieta comercial adicionada de óleo de tomilho. Ündeger et al. (2009), muito embora reconheçam que poucos estudos foram conduzidos acerca do tema, também reforçam a hipótese de que o óleo essencial de tomilho não causa risco ao consumidor.

Assim sendo, estes dados sugerem a necessidade de realização de pesquisas científicas voltadas para o estudo da atividade antimicrobiana isolada e combinada dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), dos mecanismos de interação destes óleos com os diferentes parâmetros intrínsecos e extrínsecos, que possam vir a refletir na capacidade metabólica e de crescimento/sobrevivência de diferentes micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes em hortaliças minimamente processadas, e ainda sobre os efeitos adversos à saúde em decorrência de sua aplicação em produtos alimentícios.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

➤ Óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. (tipo *food-grade*) foram obtidos de empresa nacional fornecedora de óleos essenciais (AROMALÂNDIA – MG), a qual obtém os produtos através de processo de arraste por vapor d'água (hidrodestilação) em escala industrial. Os óleos essenciais utilizados no estudo atenderam a todas as especificações exigidas concernentes ao seu controle de qualidade (aparência, cor, impurezas, odor, densidade – 20°C, índice de refração – 20°C) conforme boletim técnico emitido pelo fornecedor.

➤ Hortaliças

As hortaliças alface e acelga foram obtidas em supermercados, tomando-se o cuidado em escolher aquelas que não apresentavam quaisquer sinais de alteração de causa biológica, química e/ou física.

➤ Micro-organismos testes e inóculo microbiano

As cepas tipo padrão (ATCC) de *Listeria monocytogenes* 7644, *Yersinia enterocolitica* 9610, *Aeromonas hydrophila* 7966 e *Pseudomonas fluorescens* 11253 utilizadas como micro-organismos teste nos ensaios antimicrobianos foram adquiridas através da Coleção de Micro-

organismos de Referência, Instituto Nacional de Controle de Qualidade, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. Os inóculos das cepas bacterianas utilizados nos ensaios antimicrobianos foram obtidos através da preparação de suspensão de tais cepas em solução salina (NaCl a 0.85% p/v) estéril a partir de culturas *overnight* cultivadas em ágar nutriente inclinado a 37°C. Tais suspensões tiveram sua turbidez padronizada de acordo com o tubo 0.5 da escala McFarland correspondendo à concentração de aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL).

4.2. Métodos

4.2.1 Ensaios de atividade antibacteriana

4.2.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima dos óleos essenciais

A Concentração Inibitória Mínima – CIM e a Concentração Bactericida Mínima do óleo essencial foram determinadas por meio da técnica de macrodiluição em caldo (NOSTRO et al., 2001). Inicialmente, foi preparada uma solução de óleo essencial, contendo uma concentração de 160 µL/mL de óleo em caldo nutriente (concentração ajustada para 4 mL). A partir deste tubo, prosseguiu-se com as diluições seriadas até a concentração de 0,6 µL/mL. Em seguida, foi adicionado a cada tubo 100 µL de inóculo (10^8 UFC/mL). O tubo controle continha apenas caldo nutriente e inóculo. O sistema foi agitado e incubado a 37 °C por 24 horas. Ao término do período de incubação, a mais baixa concentração (mais alta diluição) do óleo essencial que não apresentou crescimento microbiano visível (turvação) era considerada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Após esta observação, alíquotas de 100 µL dos tubos que não apresentaram crescimento microbiano visível foram inoculadas em ágar Nutriente por 24-48 horas a 37 °C. A CBM foi considerada como a menor concentração, na qual a cepa teste não apresentou capacidade de crescimento em Caldo Nutriente adicionado do óleo essencial, bem como não foi capaz de crescer quando inoculada em Ágar Nutriente.

4.2.1.2 Avaliação do efeito da aplicação combinada dos óleos essenciais

O estudo da natureza do efeito antibacteriano decorrente da aplicação combinada dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *R. officinalis* frente às cepas microbianas teste foi realizado através da determinação da Concentração Inibitória Fracionada (CIF). Para isso, utilizou-se o procedimento de macrodiluição como descrito no item anterior. Os óleos essenciais foram combinados da seguinte forma: $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM; $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{2}$ CIM; $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{3}{4}$ CIM; $\frac{1}{2}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM; $\frac{1}{2}$ CIM + $\frac{1}{2}$ CIM; $\frac{1}{2}$ CIM + $\frac{3}{4}$ CIM; $\frac{3}{4}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM; $\frac{3}{4}$ CIM + $\frac{1}{2}$ CIM; $\frac{3}{4}$ CIM + $\frac{3}{4}$ CIM. O valor de CIF foi calculado como segue: CIF: concentração da combinação dos óleos que inibiu a bactéria/ concentração do óleo puro que inibiu a bactéria. A ocorrência de efeito sinérgico foi definido como $CIF \leq 0,5$; adição como: $CIF > 0,5$ a 4; e antagonismo como $CIF > 4$ (MACKAY et al., 2000).

4.2.1.3 Interferência dos óleos essenciais sobre a dinâmica de crescimento bacteriano

Os ensaios de interferências dos óleos essenciais (isolados e em combinação) sobre a dinâmica de crescimento microbiano foram realizados através do método de contagem de células viáveis. Inicialmente, 10% do inóculo foram adicionados em caldo nutriente e a esta mistura foram acrescentados os óleos essenciais, isolados ou em combinação, em suas concentrações previamente obtidas. O sistema foi incubado a 37 °C. Nos intervalos de 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas pós-incubação, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão foi diluída seriadamente (1:9 v/v) em PBS 0,1% (10^{-1} – 10^{-5}) estéril e uniformemente inoculada em placa de Petri contendo ágar nutriente. No experimento controle, a solução do óleo essencial foi substituída por 5 mL de água destilada estéril. Após o fim do período de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL (BARROS et al., 2009).

Paralelamente, também foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial sobre a dinâmica de crescimento bacteriano no extrato das hortaliças seguindo o mesmo procedimento supracitado, exceção feita ao tipo de substrato para o crescimento bacteriano. Para a obtenção dos extratos das hortaliças, foram utilizadas hortaliças frescas, as

quais foram lavadas com água corrente, seguida por homogeneização em água destilada estéril (1:1 p/v) utilizando *blender* comercial. O material homogeneizado resultante foi centrifugado (10 000 x g, 20 °C, 20 minutos), de modo que em seguida o sobrenadante obtido foi esterilizado por filtração em Millipore (0.22 µm) (WAN et al., 1998).

4.2.1.4 Efeito dos óleos essenciais sobre a microbiota natural de hortaliças minimamente processadas

Porções de 90 g das hortaliças alface e acelga (1:1) foram cortadas manualmente e imediatamente submersas em 250 mL de soluções de óleos essenciais, isolados (CIM) e em combinação ($\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM ou $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{2}$ CIM), mantidos sob agitação leve por 5 min a 28°C, de forma assegurar uma completa cobertura das hortaliças com os óleos essenciais. Em seguida, foi retirada uma porção de 25 g que foi imersa em 225 mL de água destilada estéril e homogeneizada por um período de 60s. Em seguida, procedeu-se a diluição seriada (10^{-2} - 10^{-5}) em solução salina peptonada tamponada (PBS) 0.1 % estéril, e posteriormente o plaqueamento nos meios Plate Count Agar, para contagem de mesófilos aeróbios (24-48 h/37 °C) e bactérias psicrotróficas (7 dias/6 °C), em Eosyne-Metilen-Blue Agar para *Enterobacteriaceae* (37 °C/24h) e Sabouraud Agar para fungos (28 °C/48-72 h). (LOPÉZ-GALVÉZ et al., 2010). Para o grupo controle, o óleo essencial foi substituído por água destilada estéril. Os resultados foram expressos em log de UFC/mL.

4.2.1.5 Efeito dos óleos essenciais sobre a sobrevivência de bactérias potencialmente patogênicas em hortaliças minimamente processadas

Porções de 90 g de um *pool* das hortaliças alface e acelga (1:1) previamente lavadas com água destilada foram cortadas manualmente e inoculadas em 900 mL de um inóculo bacteriano (*L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila* e *P. fluorescens*, aproximadamente 10^8 UFC/mL), mantidos sob agitação leve por 5 min de forma a assegurar completa inoculação dos micro-organismos nas hortaliças, que posteriormente foram postas para secar em uma câmara de biosegurança por 1 h. Em seguida, as hortaliças foram

submersas em 250 mL das soluções de óleos essenciais isolados (CIM) e em combinação ($\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM ou $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{2}$ CIM) por 5 min a 28 °C. Logo após, uma amostra de 25 g das hortaliças foram tomadas assepticamente e transferidas para um saco contendo 225 mL de PBS estéril (1 g/L), levadas ao stomacher e homogeneizadas por 60 s. Procedeu-se com a diluição seriada (10^{-2} - 10^{-5}) em PBS 0.1 % estéril, com posterior inoculação em placas de Petri contendo os meios apropriados para a contagem de *Listeria monocytogenes* (*Listeria* Selective Agar Base + *Listeria* Selective Supplement II - Himedia, Índia - 37 °C/24 h), *Y. enterocolitica* (*Yersinia* Selective Agar Base + *Yersinia* selective supplement - Himedia, Índia - 37 °C/24 h); *A. hydrophilla* (*Aeromonas* isolation Medium + *Aeromonas* Selective Supplement (Himedia, Índia) - 28 °C/48 h); e *Pseudomonas* (Agar Base + CFC Supplement (Himedia, Índia) a 28 °C/48 h) (XU et al., 2007). Para o grupo controle, o óleo essencial foi substituído por água destilada estéril. Os resultados foram expressos em log de UFC/mL.

4.2.2 Avaliação dos atributos organolépticos das hortaliças tratadas com óleos essenciais

A avaliação sensorial foi realizada a partir do teste de aceitação, com 50 provadores pré-selecionados de acordo com o interesse e hábito de consumo de hortaliças frescas. Os painelistas foram postos em cabines individuais, com condições controladas de temperatura e iluminação, próprias para testes sensoriais. Porções de 180g de um *pool* das hortaliças alface e acelga (1:1), previamente lavadas em água destilada estéril, foram cortadas e submersas em uma solução de 500 mL de óleos essenciais, isolados (CIM) e em combinação ($\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM ou $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{2}$ CIM), mantidos sob agitação leve a 28°C por 5 min. Em seguida, as hortaliças foram postas para secar ao ar, onde permaneceram por 30 min. Após esta etapa, foram embaladas e seladas com filme de polipropileno. Após 24, 48 e 72 h de armazenamento a 7 °C, os provadores foram servidos com 20 g de cada amostra, refrigerada, disposta em pratos descartáveis (codificados com números aleatórios de três dígitos), acompanhados da ficha de avaliação sensorial. Os provadores foram instruídos a ingerir, entre uma amostra e outra, bolachas cream-cracker e água, para impedir que houvesse interferência de percepção entre as amostras. A avaliação dos atributos aparência, textura, sabor, odor e percepção geral foram avaliados em uma escala hedônica de 5 pontos, variando de 1 (desgostei muitíssimo) a 5 (gostei muitíssimo). Ainda, os provadores foram questionados sobre a percepção de mais

dois atributos, escurecimento geral e escurecimento das bordas, em escala de 1 (severo) a 3 (nenhum). A intenção de compra foi avaliada usando também uma escala hedônica de 5 pontos, variando de 1 (certamente não compraria) a 5 (certamente compraria). As amostras de hortaliças sem óleos essenciais foram testadas de maneira similar (controle) (GUTIERREZ et al., 2008c). Esta análise obteve prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFPE, sob o número CEP/UFPE n. 360/08 (Anexo A).

4.2.3 Testes de avaliação de possíveis mecanismos de atuação dos óleos essenciais

4.2.3.1 Efeito dos óleos essenciais sobre a liberação de material citoplasmático bacteriano

A medida de material citoplasmático liberado pelas células bacterianas a 260 nm foi obtida a partir de uma solução de PBS, adicionada de óleos essenciais, isolados (CIM) e em combinação ($\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM ou $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{2}$ CIM), e do inóculo bacteriano (100 μ L/mL). Em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 60, 90, 120, 240 e 360 min), as células bacterianas foram separadas do meio de crescimento por centrifugação a 10.000 x *g* por 12 min a 4 °C e o sobrenadante foi quantificado a partir da absorbância a 260 nm verificada em espectrofotômetro (Biochrom Libra S32/S32), como descrito por Carson et al. (2002). O tratamento controle foi analisado de maneira similar.

4.2.3.2 Efeito dos óleos essenciais sobre a utilização microbiana de substrato oxidável

O estudo da interferência do óleo essencial sobre a utilização de substrato oxidável pelas cepas testes foi realizado através da quantificação de glicose em diferentes intervalos de tempo na suspensão microbiana exposta aos óleos essenciais, isolados (CIM) e em combinação ($\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM ou $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{2}$ CIM). Inicialmente, as suspensões das cepas bacterianas foram expostas a soluções apresentando diferentes concentrações do óleo

essencial adicionada de glicose (0,2 g/L) a 30° C, preparadas em PBS. Em diferentes intervalos de tempo (0, 30, 60, 90, 120, 240 e 360 min) uma alíquota da mistura foi removida e a quantificação de glicose (mg/100 mL) estimada a partir da absorbância em 505 nm, através de método enzimático utilizando o Kit Glicose PAP – Liquiform, Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais. Como controle foi feito a quantificação de glicose na suspensão bacteriana sem adição do óleo essencial nos mesmos intervalos de tempo estabelecidos. Os resultados foram expressos como a quantidade de glicose no meio adicionado do produto teste em cada intervalo de tempo em relação ao valor obtido no ensaio controle (TASSOU et al., 1995).

4.2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura e transmissão

Para a visualização de alterações ultra-estruturais em microscópio eletrônico de transmissão (TEM), as células bacterianas expostas aos óleos essenciais, isolados (CIM) e em combinação ($\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM ou $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{2}$ CIM) por 3 e 6 horas, foram colhidas por centrifugação a 10,000 x *g* for 12 min a 4 °C, em PBS, e fixadas com glutaraldeído (0.25 g/L). Após a lavagem no mesmo tampão, as células foram pós-fixadas por 30 min com tetróxido de ósmio (0.01 g/L) em 0.1 M de tampão cacodilato (pH 7.2). As células foram desidratadas gradualmente em etanol e embebidas por 72 h a 60°C em resina 812 (Poly-Bed, PolySciences, Warrington, PA, USA). Secções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo, sendo em seguida observadas em microscópio eletrônico de transmissão, modelo Morgagni 268D (OLIVOTTO et al., 2008). Para microscopia eletrônica de varredura (SEM), as células expostas aos óleos essenciais foram fixadas, pós-fixadas e desidratadas como descrito anteriormente, sendo em seguida submetidas à secagem com CO₂ em Ponto Crítico, em seguida metalizadas com ouro até espessura de 20 nm, e observadas sob o microscópio eletrônico de varredura, modelo FEI Quanta 200 FEG (BATTISTELLI et al., 2005). Células bacterianas não expostas aos óleos essenciais foram tratadas e observadas de maneira similar.

4.2.3.4 Microscopia de Fluorescência Confocal

Células bacterianas tratadas com os óleos essenciais, isolados (CIM) e em combinação ($\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{4}$ CIM ou $\frac{1}{4}$ CIM + $\frac{1}{2}$ CIM) por 15 e 30 min foram coradas com iodeto de propidium (PI) e SYTO9, conforme instruções presentes no kit de viabilidade celular bacteriana LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA). A coloração dupla foi realizada por incubação das amostras com 1.50 μ M PI e 250.5 nM SYTO9 em temperatura ambiente, por 15 min. Uma alíquota da suspensão bacteriana foi submetida a álcool isopropil (700 mL/L) por 1 h para permeabilizar as membranas celulares; tais células foram usadas como controle positivo, indicando morte celular. Células bacterianas não expostas aos óleos essenciais foram tratadas de forma similar quanto à coloração, indicando o controle negativo. As amostras foram observadas em comprimentos de excitação/emissão de 480/500 nm para o corante SYTO 9 e 490/635 nm para o corante PI (Leonard et al., 2010; Otto et al., 2010). As imagens coletadas foram analisadas com software Lite 2.0 e o percentual de células coradas com PI (células rompidas) e SYTO9 (células viáveis) foram determinadas pela contagem direta de células vermelhas e verdes. SYTO9 cora todas as células de verde fluorescente, ao passo que PI penetra apenas nas células cujas membranas celulares tenham sido alteradas, corando-as, assim, com vermelho fluorescente.

4.2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva (média e erro-padrão) e inferencial (teste de Tukey) para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados. Para o tratamento estatístico foi utilizado o software Sigma-Stat 3.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ARTIGO 1:

Título: Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables.

Status do artigo: publicado

Periódico: Food Research International, v.44, p. 1541-1548, 2011.

Qualis Medicina II: A2



Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables

Geíza Alves de Azeredo^a, Tânia Lúcia Montenegro Stamford^b, Pollyana Campos Nunes^c, Nelson Justino Gomes Neto^c, Maria Elieidy Gomes de Oliveira^c, Evandro Leite de Souza^{c,*}

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

^b Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 February 2011

Accepted 8 April 2011

Keywords:

Minimally processed foods

Essential oils

Combined application

Antibacterial property

ABSTRACT

This study assessed the occurrence of an enhancing inhibitory effect of the combined application of *Origanum vulgare* (OV) and *Rosmarinus officinalis* (RO) essential oils against bacteria associated to minimally processed vegetables using the determination of Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index, kill-time assay in vegetal broth and application in vegetable matrices. Moreover, it was determined chemical composition of the essential oils and their effects alone and in mixture on sensory characteristics of minimally processed vegetables. Carvacrol (66.9 g/100 g) was the most prevalent compound in OV essential oil, while for RO was 1.8-cineole (32.2 g/100 g). OV and RO essential oil showed MIC in a range of 1.25–5 and 20–40 µL/mL, respectively. FIC indices of the combined application of the essential oils were 0.5 against *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophilla* suggesting a synergic interaction. Only for *Pseudomonas fluorescens* FIC index was 0.75 purposing additive effect. Application of the essential oils alone (MIC) or in mixture (¼ MIC + ¼ MIC or ¼ MIC + ½ MIC) in vegetable broth caused significant decrease ($p < 0.05$) in bacterial count over 24 h. Mixture of essential oils reduced ($p < 0.05$) the inocula of all bacteria in vegetable broth and in experimentally inoculated fresh-cut vegetables. Similar efficacy was found to reduce the autochthonous microflora in vegetables. Sensory evaluation of vegetables sanitized with essential oils revealed that the scores of the most evaluated attributes fell between like slightly and neither like nor dislike. The combination of essential oils at sub-inhibitory concentrations could mean an interesting approach to sanitize minimally processed vegetables.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Minimally processed foods (MPF) are fresh, raw vegetables and fruits processed in order to supply a ready-to-use product. The process of these products usually involves trimming, peeling, or cutting if necessary, washing and disinfection, followed for packaging in sealed pouches or on plastic trays sealed with polymeric films (Nguyen-the & Carlin, 1994). Regarding the current demand of consumers to convenient a ready-to-use foods possessing a fresh-like quality, the production of MPF has largely increased worldwide (Ragaert, Verbeke, Devlieghere, & Debevere, 2004).

The emergence of pathogenic microorganisms not previously associated with either raw or processed products has enhanced the

potential for foodborne illness outbreaks associated with minimally processed products, since new processing and preservation techniques are able to create new ecology routes to microbial growth (Martin-Belloso, 2007). Fresh vegetables are susceptible to microbial attack after harvest due to the loss of natural resistance and their high water and nutrient content (Gutierrez, Bourke, Lonchamp, & Barry-Ryan, 2009). A wide range of fresh vegetables and unpasteurized juices has been implicated in outbreaks of foodborne diseases (Abadias, Usall, Anguera, Solsona, & Viñas, 2008).

Psychrotrophic pathogens (such as *Aeromonas hydrophilla*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*) and spoilage bacteria (such as *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacteriaceae*) are cited to be the major microbiological concerns in minimally processed vegetables (Beuchat, 2002).

Disinfection using hypochlorite is often applied for MPF to improve safety and shelf-life, but this has presented some limitations and disadvantages, such as reduced antimicrobial efficacy and formation of carcinogenic chlorinated compounds (Gutierrez et al.,

* Corresponding author at: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brazil. Tel.: +55 83 3216 7807; fax: +55 83 3216 7094.

E-mail address: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br (E.L. de Souza).

2009). The inefficacy of hypochlorite in eliminating bacteria in vegetables could be due to different factors: an aqueous hypochlorite solution may not wet the hydrophobic surface of the waxy cuticle of vegetables; the setting of a biofilm could protect the microorganisms against the lethal effects of the hypochlorite; and the contact with host tissue may inactivate hypochlorite (Carrasco, Pérez-Rodríguez, Valero, García-Gimeno, & Zurera, 2008). Contamination by pathogenic bacteria, their survival to disinfection processes and multiplication over refrigerated storage are serious concerns regarding MPF, since these products are consumed without major processing.

Currently there is an increasing consumer pressure for replacing chemically synthesized antimicrobial by natural alternatives in order to ensure food safety (Xu et al., 2007). The development and application of more natural sanitizers with a broad spectrum antimicrobial activity and no toxicity for human in MPF providing enhanced sensory quality and extended shelf-life is of interest to catering industry and consumers (Molinos et al., 2009). This trend prompts a particular increased interest in the use of essential oils as antimicrobial compounds to be applied in MPF.

Early studies showed that *Origanum vulgare* L. (oregano) and *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) essential oils possess interesting antimicrobial activity against spoilage and pathogenic food-related microorganisms (Oliveira, Stamford, Gomes Neto, & Souza, 2010; Souza, Barros, Conceição, Gomes Neto, & Costa, 2009). Early *in vitro* assays with essential oils showed they had promising antimicrobial properties, however when applied to food matrices amounts required to substantially inhibit the bacterial growth were often higher than would be organoleptically acceptable (Naveena, Muthukumar, Sen, Babji, & Murthy, 2006). Regarding that these high concentrations is likely to impart a certain flavor to foods, the addition of sub-inhibitory amounts of essential oils in mixtures may be a way to provide the balance between sensory acceptability and antimicrobial efficacy.

Here we report the investigation of an enhancing antibacterial effect when the essential oils from *O. vulgare* and *R. officinalis* were used in combination against autochthonous microflora and some bacteria associated with the contamination of minimally processed vegetables in food-based broth and food matrices. Moreover, the influence of these essential oils on the sensory attributes of minimally processed vegetables during refrigerated storage was investigated.

2. Material and methods

2.1. Essential oils

The essential oils from *O. vulgare* L. (batch OREORG01; density at 20 °C: 0.90; refractive index at 20 °C: 1.47) and *R. officinalis* L. (batch ROSTUN04; density at 20 °C: 0.94; refractive index at 20 °C: 1.51) were obtained from Aromalândia Ind. Com. Ltda. (Minas Gerais, Brasil) and its quality parameters were described in an accompanying technical report. This supplier extracts essential oils on an industrial scale by steam distillation. The essential oils were assayed at concentrations ranging from 80 to 0.003 µL/mL. Essential oils solutions were prepared in nutrient broth (Himedia, India) using bacteriological agar (1.5 g/L) as stabilizing agent (Souza et al., 2009).

2.2. Bacterial strains

L. monocytogenes ATCC 7644, *Y. enterocolitica* ATCC 9610, *A. hydrophilla* 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 nutrient agar (Himedia, India) slants under refrigeration (6 °C).

Inocula used in antimicrobial assays were obtained from overnight cultures grown on nutrient agar slants at 35 °C for *L. monocytogenes* and *Y. enterocolitica*, and at 28 °C for *A. hydrophilla* and *P. fluorescens*. A

loopfull of the culture was diluted in sterile saline solution (8.5 g/L) to have a final concentration of approximately 10⁸ colony forming unit per mL (cfu/mL) adjusted according to the turbidity of 0.5 McFarland standard tube.

2.3. Preparation of vegetable broth

Iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.), beet (*Beta vulgaris* L. var. cicla, L.) 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 200 g of the vegetal material was mashed with 800 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.

2.4. Essential oil chemical analysis

The chemical composition of the essential oils was analyzed using a gas chromatograph (GC) fitted to a mass spectrometer (MS) (Shimadzu GC/MS-QP5050A) operating in electron-impact (70 eV, *m/z* 50–400) mode; fused silica capillary column used was 5% phenyl dimethylpolysiloxane (DB-5MS, J & W Scientific, Folsom, CA) with length 30 m, 0.25 mm i.d., 0.1 µm film thickness. The analyze of the oil was performed employing the following conditions: sample preparation 1 µL in 1 mL of hexane; injection volume 1 µL; split ratio 1:5; helium flow rate 1.6 mL/min; temperature programme ramp from 60 °C to 200 °C with a gradient of 5 °C/min (holding the initial and final temperature for 5 min); injector temperature 260 °C; detector temperature 280 °C; mass spectra: electron impact 70 eV; mass scanning rate: 40–550 amu; scan time: 0.5 s.

The identification of the essential oil components was performed by retention indexes and comparing their mass spectra with a data bank (System GC-MS, Nist. 62 lib) and literature (Adams, 1995). Retention indexes were obtained by co-injection with a hydrocarbons (C₉–C₂₄) standard mixture using the van Den Dool & Kratz equation (van Den Dool & Kratz, 1963).

2.5. Determination of the minimum inhibitory concentration (mic) and minimum bactericidal concentration (mbc)

MIC values of the essential oils were determined using the macrodilution in broth procedure. Four milliliters of double strength nutrient broth (Himedia, India) was inoculated with 1 mL of the bacterial inocula, mixed with 5 mL of two fold dilutions of the essential oil at concentrations ranging of 160 to 0.06 µL/mL, and followed by shaking for 30 s using vortex. The system was statically incubated for 24 h at 35 °C for *L. monocytogenes* and *Y. enterocolitica*, and at 28 °C for *A. hydrophilla* and *P. fluorescens*. MIC was defined as the lowest concentration of the essential oils required for preventing visible bacterial growth. Control flasks without the essential oils were tested similarly (Nostro, Cannatelli, Musolino, Procopio, & Alonzo, 2002).

2.6. Synergy assays

The assays of synergy of the essential oils were carried out by determining Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index in nutrient broth using the macrodilution method. FIC was calculated as follows: MIC of the combination of the essential oils/MIC of the essential oil alone. Essential oils were combined at MIC + MIC; MIC + ½ MIC; MIC + ¼ MIC; ½ MIC + ½ MIC; ¼ MIC + ¼ MIC; and ½ MIC + ¼ MIC. Synergy was FIC ≤ 0.5; addition was FIC > 0.5 to 4; and antagonism was FIC > 4 (Mackay, Milne, & Gould, 2000; Oliveira et al., 2010).

2.7. Time-kill assay

The effect of the essential oils alone (MIC) and in mixture ($\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{4}$ MIC or $\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{2}$ MIC) on the cell viability of the bacterial strains in vegetable broth over 96 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 essential oils solutions alone (MIC) or in mixture ($\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{4}$ MIC or $\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{2}$ MIC) were added to the system and gently shaken for 30 s. The system was incubated at 37 °C for *L. monocytogenes* and *Y. enterocolitica*, and at 28 °C for *A. hydrophilla* 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 sterile peptone water (1 g/L) and inoculated on nutrient agar Petri dishes for 24 h at 35 °C or 28 °C (Barros et al., 2009). Control flasks without essential oils were tested similarly. The results were expressed in log of cfu/mL.

2.8. Effect of essential oils on survival of bacteria in fresh vegetable

Portions of 90 g of a pool of iceberg lettuce, beet 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*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophilla* and *P. fluorescens*, approximately 10^8 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 essential oils alone (MIC) or in mixture ($\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{4}$ MIC or $\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{2}$ MIC) for 5 min at 28 °C. Then, a 25 g sample of the vegetables was aseptically taken and 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 bacteria enumeration was performed by pour-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; *Yersinia* Selective Agar Base + *Yersinia* selective supplement (Himedia, India) at 37 °C (24 h) for *Y. enterocolitica* count; *Aeromonas* isolation Medium + *Aeromonas* Selective Supplement (Himedia, India) at 28 °C (48 h) for *A. hydrophilla* 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 log of cfu/mL.

2.9. Effect of essential oils on survival of natural flora in fresh vegetable

Portions of 90 g of the lettuce, beet and rocket (in a rate of 1:1:1) were shredded by glove-covered hands and immediately submerged in 250 mL of the essential oils solutions alone (MIC) or in mixture ($\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{4}$ MIC or $\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{2}$ MIC), and softly rotated for 5 min at 28 °C using a sterile glass stem for ensure complete coverage and contact of surfaces with the essential oil solutions. Then, a 25 g sample of the vegetables was aseptically taken and 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 psychotrophic 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 log of cfu/mL (López-Galvéz et al., 2010). Control flasks containing sterile distilled water were tested in the same way.

2.10. Sensory evaluation

Sensory evaluation was performed by the acceptance test using 50 experienced members pre-selected according to interest and fresh leafy consuming habits. Panelists worked in individual booths with controlled conditions of temperature and lighting. Portions of 180 g of a pool of iceberg lettuce, beet 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 essential oils solutions alone (MIC) or in mixture ($\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{4}$ MIC), softly rotated for 5 min at 28 °C using a sterile glass stem for 5 min, air-dried for 30 min in a bio-safety cabinet 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). Still, the panelists were asked to assess the edge vascular tissue browning and overall browning 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 essential oils were tested similarly as control.

2.11. Reproducibility and statistics

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

3. Results

3.1. Essential oil chemical analysis

As shown in Tables 1 and 2, GC-MS analysis resulted in the identification of 16 and 13 compounds in amounts higher than 0.1 g/100 g of the total mass in the essential oil of *O. vulgare* and *R. officinalis*, respectively. Carvacrol (66.9 g/100 g) was the most prevalent compound in *O. vulgare* essential oil, followed for *p*-cymene (13.9 g/100 g) and γ -terpinene (7.8 g/100 g). Other compounds as myrcene (1.9 g/100 g), α -pinene (1.8 g/100 g), α -terpinene (1.6 g/100 g), β -caryophyllene (1.6 g/100 g) and linalool (1.1 g/100 g) were found in minor amounts.

Table 1
GC-MS analysis of the essential oil from *Origanum vulgare* L. leaves.^a

Peaks	Retention index	Compound	Amount in the oil (g/100 g)
1	2489	α -Thujene	0.4
2	2566	α -Pinene	1.8
3	2768	Camphene	0.7
4	3254	β -Pinene	0.6
5	3538	Myrcene	1.9
6	3973	δ -3-Carene	0.1
7	4718	α -Terpinene	1.6
8	4219	<i>p</i> -Cymene	13.9
9	4712	Limonene	0.3
10	4818	1,8-Cineole	0.6
11	5195	<i>cis</i> -Ocimene	0.2
12	5458	<i>trans</i> -Ocimene	0.3
13	5919	γ -Terpinene	7.8
14	6996	Linalool	1.1
15	8273	Carvacrol	66.9
16	8478	β -Caryophyllene	1.6

^a Amounts lower than 0.1 g/100 g were excluded.

Table 2
GC-MS analysis of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. leaves.^a

Peaks	Retention index	Compound	Amount in the oil (g/100 g)
2	2445	α -Pinene	14.2
3	2668	Camphene	8.2
4	3415	β -Pinene	7.0
6	3724	Myrcene	1.8
9	4489	Limonene	5.6
10	4574	1,8-Cineole	32.2
12	4732	α -Terpinene	1.1
14	4812	<i>p</i> -Cymene	3.3
17	5356	Camphor	15.2
19	7138	Bornyl-acetate	1.1
20	8478	β -Cariophyllene	2.3
25	7998	Verbenone	2.3
26	8671	Borneol	1.9

^a Amounts lower than 0.1 g/100 g were excluded.

For the essential oil from *R. officinalis* the compounds found in higher amounts were 1,8-cineole (32.2 g/100 g), camphor (15.2 g/100 g), α -pinene (14.2 g/100 g), camphene (8.2 g/100 g), β -pinene (7 g/100 g) and limonene (5.6 g/100 g). The other identified compounds were in a range of 1.1–3.3 g/100 g.

3.2. MIC of the essential oils

Results of the MIC values of *O. vulgare* and *R. officinalis* essential oils against bacteria associated to minimally processed vegetables are shown in Table 3. *O. vulgare* and *R. officinalis* essential oil showed MIC in a range of 1.25–5 and 20–40 μ L/mL, respectively. Highest MIC values for both oils were found against *P. fluorescens*. MIC values of *R. officinalis* were 8 to 16 fold-higher than those found for *O. vulgare*.

3.3. FIC index of the combined application of essential oils

FIC indexes for the combined application of *O. vulgare* and *R. officinalis* essential oils were 0.5 for *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* and *A. hydrophilla* suggesting a synergic interaction of the essential oils against these bacteria. The oils inhibited the growth of these bacteria when applied in combination of $\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{4}$ MIC. Only for *P. fluorescens*, the FIC index was 0.75 revealing an additive effect. Inhibition of *P. fluorescens* was noted when the essential oils from *O. vulgare* and *R. officinalis* were combined at $\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{2}$ MIC, respectively.

Test strains presented capability to grow at sub-inhibitory concentrations ($\frac{1}{2}$ MIC and $\frac{1}{4}$ MIC) of both oils when applied alone.

3.4. Kill-time assays

Kill-time of bacteria associated to minimally processed vegetables when exposed to *O. vulgare* and *R. officinalis* essential oils alone and in combination in vegetable broth over 24 h is given in Figs. 1 to 4. The oils were assayed at their MIC and at $\frac{1}{4}$ MIC in combination, excepting against *P. fluorescens* where the essential oil of *R. officinalis* was tested at $\frac{1}{2}$ MIC regarding the obtained results of the FIC index.

Table 3
Minimum inhibitory concentrations of the essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. against bacteria associated to minimally processed vegetables.

Bacterial strains	Essential oil (μ L/mL)	
	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis</i>
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	1.25	20
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	2.5	20
<i>A. hydrophilla</i> INQCS 7966	2.5	20
<i>P. fluorescens</i> ATCC 11253	5	40

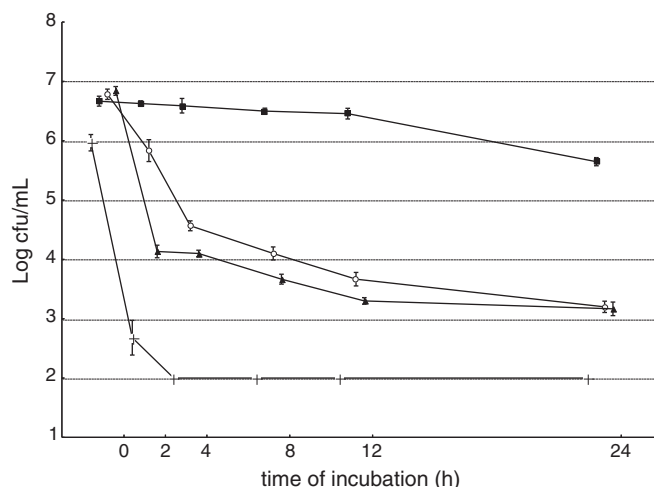


Fig. 1. Survivors curves for *L. monocytogenes* ATCC 7644 in vegetable broth at 37 °C as a function of antimicrobial concentration: (■): control (0 μ L/mL); (+): *O. vulgare* essential oil (MIC: 1.25 μ L/mL); (○): *R. officinalis* essential oil (MIC: 20 μ L/mL); (▲): *O. vulgare* essential oil ($\frac{1}{4}$ MIC: 0.31 μ L/mL) + *R. officinalis* essential oil ($\frac{1}{4}$ MIC: 5 μ L/mL).

Addition of the essential oils from *O. vulgare* and *R. officinalis* at their MIC values resulted in significant drop ($p < 0.05$) in the bacterial counts over 24 h. Values lower than two log cycles were found for *Y. enterocolitica*, *A. hydrophilla* and *P. fluorescens* in broth added of the essential oils alone already after 4 h, and these counts were maintained in the remainder evaluated times. Smaller decrease in viability of *L. monocytogenes* was found in the broth added of the essential oil from *R. officinalis* when counts in a range of 3–4 log cycles were noted from 4 h onward.

The combination of essential oils at sub-inhibitory concentrations reduced the initial inocula of *Y. enterocolitica*, *A. hydrophilla* and *P. fluorescens* to 2 log cycles after a maximum time of 4 h and no recovery in viable count was noted in the remainder evaluated intervals. For *L. monocytogenes*, although the mixture of essential oils had caused a linear and significant reduction ($p < 0.05$) over time, these counts were always higher than 3 log cycles. No significant difference ($p > 0.05$) was found among the counts of *Y. enterocolitica*, *A. hydrophilla* and *P. fluorescens* for the broth added of the essential oils alone or in combination. The counts found for *L. monocytogenes* in the broth added of the essential oil from *O. vulgare* alone were

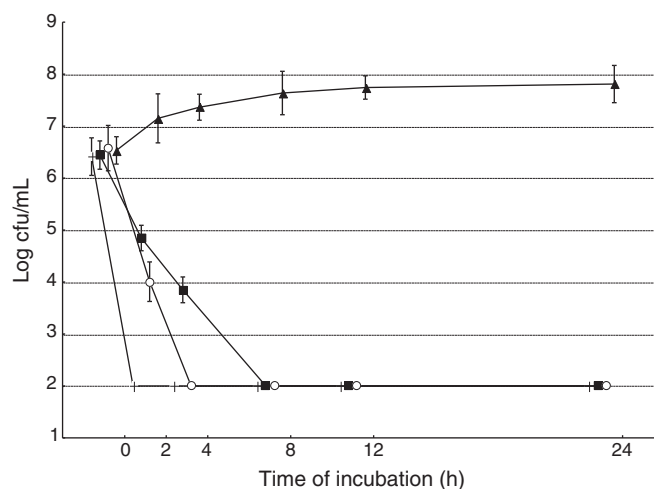


Fig. 2. Survivors curves for *Y. enterocolitica* ATCC 9610 in vegetable broth at 37 °C as a function of antimicrobial concentration: (■): control (0 μ L/mL); (+): *O. vulgare* essential oil (MIC: 2.5 μ L/mL); (○): *R. officinalis* essential oil (MIC: 20 μ L/mL); (▲): *O. vulgare* essential oil ($\frac{1}{4}$ MIC: 0.62 μ L/mL) + *R. officinalis* essential oil ($\frac{1}{4}$ MIC: 5 μ L/mL).

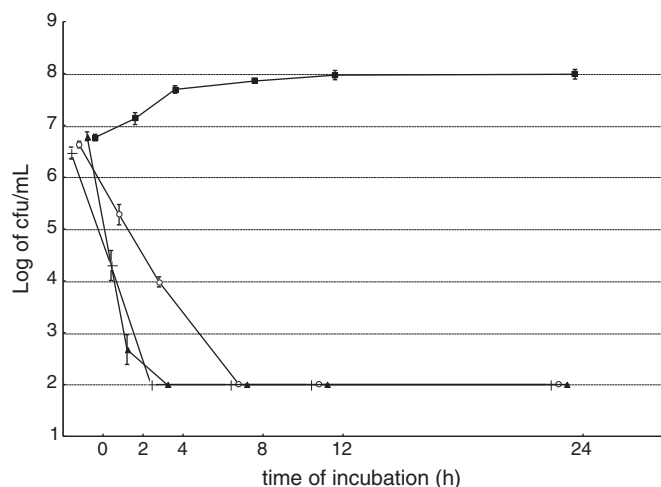


Fig. 3. Survivors curves for *A. hydrophilla* INCQS 7966 in vegetable broth at 28 °C as a function of antimicrobial concentration: (■): control (0 $\mu\text{L/mL}$); (✚): *O. vulgare* essential oil (MIC: 2.5 $\mu\text{L/mL}$); (○): *R. officinalis* essential oil (MIC: 20 $\mu\text{L/mL}$); (▲): *O. vulgare* essential oil (1/4 MIC: 0.62 $\mu\text{L/mL}$) + *R. officinalis* essential oil (1/4 MIC: 5 $\mu\text{L/mL}$).

different ($p < 0.05$) to those obtained for the broth added of the essential oil from *R. officinalis* alone and of both oils in mixture.

The application of the essential oils alone or in mixture caused significant decrease ($p < 0.05$) in bacterial counts over the evaluated intervals in comparison to the control assay.

3.5. Effect of essential oils on survival of bacteria in hand-cut fresh vegetables

Effect of *O. vulgare* and *R. officinalis* essential oils alone and in mixture on the counts of *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophilla* and *P. fluorescens* in experimentally inoculated hand-cut fresh vegetables are shown in Table 4. The application of the essential oils alone (MIC values) or in mixtures (sub-inhibitory concentrations) in vegetables caused significant reduction ($p < 0.05$) in bacterial count in comparison to the control assay. The mixture of essential oils reduced the initial inocula of all tested bacteria from approximately 8 to 5 log cfu/g after 5 min of exposure. Exposure of vegetables to the MIC of *O. vulgare* essential oil (1.25–5 $\mu\text{L/mL}$) provided the more

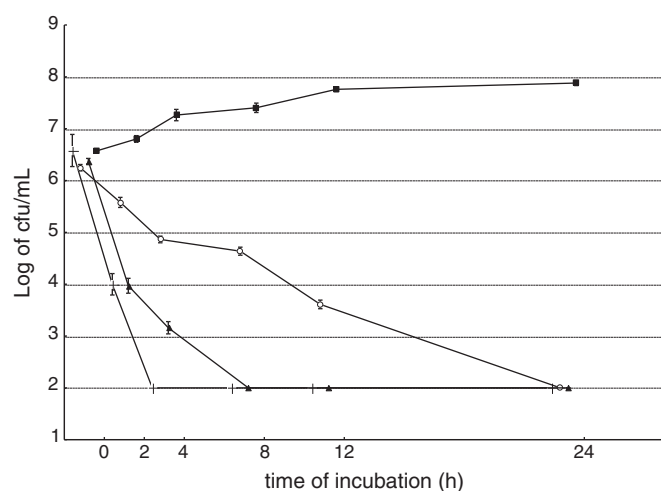


Fig. 4. Survivors curves for *P. fluorescens* ATCC 11253 in vegetable broth at 28 °C as a function of antimicrobial concentration: (■): control (0 $\mu\text{L/mL}$); (✚): *O. vulgare* essential oil (MIC: 5 $\mu\text{L/mL}$); (○): *R. officinalis* essential oil (MIC: 40 $\mu\text{L/mL}$); (▲): *O. vulgare* essential oil (1/4 MIC: 1.25 $\mu\text{L/mL}$) + *R. officinalis* essential oil (1/2 MIC: 10 $\mu\text{L/mL}$).

intense drop in the bacterial counts, which were between <1.0 and 2.7 log cfu/g.

Bacterial counts found for the vegetables exposed to *O. vulgare* essential oil alone were significantly lower ($p < 0.05$) than those obtained for the mixture of essential oils and for *R. officinalis* essential oil alone. No difference ($p > 0.05$) was found for the counts in vegetables exposed to the mixture of essential oils and to *R. officinalis* essential oil alone.

3.6. Effect of essential oils on survival of autochthonous microflora in hand-cut fresh vegetables

Effect of *O. vulgare* and *R. officinalis* essential oils alone and in mixture on the counts of mesophilic bacteria, psychrotrophic bacteria, *Enterobacteriaceae* and fungi in hand-cut fresh vegetables are shown in Table 5. The application of essential oils alone (MIC values) or in mixtures (sub-inhibitory concentrations) caused significant reduction ($p < 0.05$) of the microflora of fresh-cut vegetables. In accordance with the results found in experimentally inoculated vegetables, the application of *O. vulgare* essential oil alone caused the highest decrease in the counts of all assessed groups (or family) of microorganisms. No difference ($p > 0.05$) was found for the microbial counts in vegetables exposed to the mixture of essential oils and to *R. officinalis* essential oil alone, except for mesophilic.

3.7. Sensory analysis

Results of the analysis for sensory scores in vegetables sanitized with *O. vulgare* and *R. officinalis* essential oils alone and in mixture are shown in Table 6. The mean of the most evaluated attributes fell between “like slightly” and “neither like nor dislike” on the hedonic scale for samples treated with essential oils alone and in mixture. At all assessed storage times no significant difference was found for odor and taste in samples sanitized with the mixture of essential oils (1/4 MIC + 1/4 MIC) and control. Still, no significant difference ($p > 0.05$) among these samples was found for all tested attributes after 72 h of storage. In general, small scores ($p < 0.05$) for vegetables sanitized with essential oils alone (MIC) were found after 72 h of storage. The time of storage showed no influence on the sensory attributes of vegetables sanitized with the mixture of essential oils, excepting to cut edge tissue browning.

When asked to report about the purchase intention panelists revealed no difference ($p > 0.05$) only in respect of vegetables treated with the essential oils in mixture and the control after 48 and 72 h of storage attributing scores fell between “maybe would purchase/maybe would not purchase” and “possibly could purchase”.

4. Discussion

The efficacy of the combined use of the essential oils from *O. vulgare* and *R. officinalis* at sub-inhibitory concentrations in inhibiting the survival of some pathogenic and spoilage bacteria and autochthonous associated to minimally processed vegetables was assessed in this study. Although both tested essential oils have been effective in inhibiting all assayed bacterial strains, the MIC values found for the oils were widely different against the same test bacteria.

Lower values (8 to 16 fold) were ever noted to *O. vulgare* essential oil. These results suggest *O. vulgare* essential oil as possessing some compounds able to establish their antibacterial activity in lower amounts in comparison to the compounds found in *R. officinalis*. Smallest MIC values noted to *O. vulgare* could be associated to the phenolic carvacrol, the major component of this oil, which has been related to the highest antibacterial properties of essential oils (Barros et al., 2009; Nostro et al., 2002). The main compounds present in *R. officinalis* essential oil were 1,8-cineole, camphor and α -pinene. *P. fluorescens* presented as the most resistant strain to the tested

Table 4
Counts (log cfu/g) of *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophilla* and *P. fluorescens* in experimentally inoculated fresh-cut vegetables exposed to the essential oils from *O. vulgare* and *R. officinalis* (alone and in mixture) for 5 min (28 °C).

Treatment	Bacterial strains			
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	<i>A. hydrophilla</i> INCQS 7966	<i>P. fluorescens</i> ATCC 11253
<i>O. vulgare</i> essential oil (MIC)	<1.0 ^C	2.4 (± 0.1) ^C	<1.0 ^C	2.7 (± 0.3) ^C
<i>R. officinalis</i> essential oil (MIC)	4.8 (± 0.3) ^B	5.7 (± 0.4) ^B	4.9 (± 0.2) ^B	5.7 (± 0.4) ^B
Mixture of essential oils ^a	5.3 (± 0.2) ^{AB*}	5.6 (± 0.3) ^B	5.4 (± 0.1) ^{B*}	5.3 (± 0.3) ^B
Control/water	7.5 (± 0.3) ^A	7.7 (± 0.3) ^A	7.9 (± 0.3) ^A	7.6 (± 0.2) ^A

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

^a ¼ MIC of *O. vulgare* + ¼ MIC of *R. officinalis* for *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* and *A. hydrophilla*; ¼ MIC of *O. vulgare* + ½ MIC of *R. officinalis* for *P. fluorescens*.

essential oils when regarded the highest MIC values in comparison to the other bacteria. The resistance of *Pseudomonas* spp. to some essential oils has been previously cited for other researchers (Burt, 2004; Holley & Patel, 2005).

The synergy of *O. vulgare* and *R. officinalis* essential oils against bacteria has not been reported before. From our results, FIC indices assays suggested a synergistic effect of the combined application of these oils against *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* and *A. hydrophilla*. Combination of the essential oils was additive only against *P. fluorescens*, which were in accordance with the results of its highest resistance in the assays of MIC determination.

Time-kill curves of the essential oils alone and combined at selected sub-inhibitory amounts in vegetable broth also revealed an interesting inhibition of the viability of all tested strains over 24 h. For the most interactions, the combination of essential oils at sub-inhibitory concentrations caused an inhibition in cell viability similar to that found when the oils were tested individually at their MIC.

Anti-microbial effect of essential oils alone, and mainly when applied in mixtures of sub-inhibitory concentrations, was smaller in fresh-cut vegetables when compared to its addition in vegetable broth. Factors responsible for the smaller efficacy of essential oils as sanitizers in fresh-cut vegetables could be the high initial microbial load; the pre-harvest contamination by which the bacteria have possibility to attach or infiltrate into protective structures of vegetables (lenticels, broken trichomes and bruises) impairing the contact of essential oils with target bacteria; and the presence of other remainder organic material, such as soil particles structures (Burnett & Beuchat, 2001).

Few studies have used FIC calculations for assessing the occurrence of synergy resulting of the mixture of essential oils. Gutierrez, Barry-Ryan, and Bourke (2008) found additive effect of the combination of *O. vulgare* with *Thymus vulgaris* (thyme) essential oils against *B. cereus*, and indifference against *Escherichia coli*, *L. monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*. Gutierrez et al. (2009) found additive effect of the combination of these oils against *Enterobacter cloacae*, *P. fluorescens* and *Listeria innocua*. It seems reasonable that combination of essential oils possessing compounds with similar structures may exhibit additive rather than synergistic effect. The occurrence of

additive interaction of these essential oils could be related to their similar composition possessing phenolics (carvacrol and thymol) as main compounds, suggesting a similar mechanism of action.

It has been hypothesized that these phenolic active compounds, such as carvacrol and thymol, sensitize the membrane, and when saturation of these sites occurs, there is a gross damage and sudden collapse of integrity of the bacterial cytoplasmic membrane and leakage of vital intracellular constituents (Rhayour, Bouchikhi, Tantaoui-Elaraki, Sendide, & Remmal, 2003). Increased concentrations of phenolic compounds in growth media have not represented a progressive increase in their antibacterial activity because of the limitation of their complexation to available targets (amino acids and proteins) in the cells (Juven, Kanner, Schved, & Weisslowicz, 1994).

Previous studies have reported enhanced antimicrobial effect of the combination of different concentrations of plant substances as essential oils, extracts or phytochemicals. Fu et al. (2007) noted increased antimicrobial effect caused by the combined use (1:5, 1:7 and 1:9) of the essential oils of *Syzygium aromaticum* (clove) and *R. officinalis* against *Candida albicans*. In other study, Lin, Labbe, and Shetty (2005) noted increased inhibitory effect toward *Vibrio parahaemolyticus* when aqueous extracts of oregano and cranberry were tested in a ratio of 1:1 in comparison to their application individually.

Regarding the results of percent of each compound in the essential oils and the MIC values it can be suggested an amount of carvacrol (66.9 g/100 g) and 1,8-cineole (32.2 g/100 g) in a range of 0.84–3.35 µL/mL and 12.9–6.45 µL/mL in the solutions of the essential oils of *O. vulgare* and *R. officinalis*, respectively, found as MIC. In the solutions used to the combination of ¼ MIC of *O. vulgare* and ¼ MIC of *R. officinalis* the amount of carvacrol and 1,8-cineole was approximately of 0.42 and 5 µL/mL, respectively, as applied against *Y. enterocolitica* and *A. hydrophilla*, while to *L. monocytogenes* it was 0.31 and 4 µL/mL. In the case of combination of ¼ MIC of *O. vulgare* and ½ MIC of *R. officinalis* as used against *P. fluorescens*, the amount of carvacrol and 1,8-cineole was approximately of 0.84 and 20 µL/mL, respectively.

It is difficult to understand the exact mechanism for the establishment of the synergistic effect caused by the combined application of the essential oils of *O. vulgare* and *R. officinalis*.

Table 5
Counts (log cfu/g) of the microflora of fresh-cut vegetables exposed to essential oils from *O. vulgare* and *R. officinalis* (alone and in mixture) for 5 min (28 °C).

Treatment	Microorganisms			
	Mesophilics	Psychrotrophic	Enterobacteriaceae	Moulds and yeasts
<i>O. vulgare</i> essential oil (MIC)	<1.0 ^D	<1.0 ^C	2.2 (± 0.1) ^C	2.7 (± 0.2) ^C
<i>R. officinalis</i> essential oil (MIC)	3.5 (± 0.3) ^C	3.3 (± 0.2) ^B	4.5 (± 0.3) ^B	5.1 (± 0.3) ^B
Mixture of essential oils ^a	4.6 (± 0.2) ^B	4.1 (± 0.1) ^B	4.7 (± 0.2) ^B	5.2 (± 0.2) ^B
Control (water)	7.3 (± 0.3) ^A	6.6 (± 0.4) ^A	7.1 (± 0.4) ^A	6.7 (± 0.4) ^A

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

^a ¼ MIC + ¼ MIC.

Table 6

Mean sensory scores for minimally processed leafy vegetables sanitized with essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. alone and in mixture over refrigerated storage.

Attributes	Time of storage	<i>O. vulgare</i> (MIC)	<i>R. officinalis</i> (MIC)	FIC index (¼ MIC + ¼ MIC)	Control
Apperance	24	3.46 ± 1.07 ^{Ab}	3.74 ± 0.92 ^{Aab}	3.64 ± 0.96 ^{Ab}	4.14 ± 0.85 ^{Aa}
	48	3.16 ± 1.11 ^{ABb}	3.34 ± 0.98 ^{Ab}	3.42 ± 0.90 ^{Ab}	4.54 ± 0.67 ^{Aa}
	72	2.9 ± 0.95 ^{Bb}	2.5 ± 0.93 ^{Bb}	3.44 ± 0.99 ^{Aa}	3.72 ± 1.03 ^{Ba}
Cut edge vascular tissue browning	24	3.58 ± 1.01 ^{Ab}	3.6 ± 1.03 ^{Ab}	3.64 ± 1.06 ^{Ab}	4.26 ± 0.94 ^{Aa}
	48	3.18 ± 1.04 ^{ABb}	3.5 ± 0.97 ^{Ab}	3.1 ± 0.88 ^{Bb}	4.7 ± 0.50 ^{Ba}
	72	2.7 ± 1.03 ^{Bb}	2.32 ± 0.86 ^{Bb}	3.5 ± 0.86 ^{ABa}	3.68 ± 0.89 ^{Ca}
Overall browning	24	3.66 ± 1.02 ^{Ab}	4.06 ± 0.86 ^{Aab}	3.74 ± 0.98 ^{Aab}	4.22 ± 0.93 ^{Aa}
	48	3.68 ± 0.91 ^{Ab}	3.78 ± 0.86 ^{Ab}	3.68 ± 0.81 ^{Ab}	4.56 ± 0.81 ^{Aa}
	72	2.98 ± 1.00 ^{Bb}	2.62 ± 0.98 ^{Bb}	3.70 ± 0.76 ^{Aa}	3.80 ± 0.88 ^{Ba}
Texture	24	3.90 ± 0.93 ^{Aa}	4.02 ± 1.04 ^{Aa}	4.12 ± 0.98 ^{Aa}	4.34 ± 0.74 ^{Aa}
	48	3.80 ± 1.08 ^{Ab}	3.84 ± 0.91 ^{ABb}	3.96 ± 0.94 ^{Ab}	4.74 ± 0.44 ^{Ba}
	72	3.88 ± 0.91 ^{Aab}	3.44 ± 0.95 ^{Bb}	4.04 ± 0.85 ^{Aa}	4.12 ± 0.84 ^{ACa}
Taste	24	3.62 ± 1.17 ^{Aa}	3.64 ± 1.30 ^{Aa}	3.76 ± 1.06 ^{Aa}	3.92 ± 0.94 ^{Aa}
	48	3.64 ± 0.94 ^{Ab}	3.54 ± 1.21 ^{Ab}	3.9 ± 1.03 ^{Aab}	4.4 ± 0.75 ^{Ba}
	72	3.68 ± 0.97 ^{Aa}	3.1 ± 1.09 ^{Ab}	3.98 ± 0.95 ^{Aa}	4.1 ± 0.95 ^{ABa}
Odor	24	3.92 ± 1.04 ^{Aa}	4.06 ± 1.26 ^{Aa}	3.82 ± 0.91 ^{Aa}	4.0 ± 0.72 ^{Aa}
	48	3.76 ± 0.91 ^{Aa}	3.84 ± 1.07 ^{Aa}	3.86 ± 0.85 ^{Aa}	4.16 ± 0.71 ^{Aa}
	72	3.56 ± 1.09 ^{Aab}	3.12 ± 1.20 ^{Bb}	3.86 ± 1.05 ^{Aa}	4.06 ± 0.91 ^{Aa}
General perception	24	3.66 ± 0.96 ^{Aa}	3.72 ± 1.10 ^{Aa}	3.72 ± 0.85 ^{Aa}	4.0 ± 0.75 ^{Aa}
	48	3.52 ± 0.86 ^{Ab}	3.4 ± 0.90 ^{Ab}	3.72 ± 0.88 ^{Ab}	4.58 ± 0.57 ^{Ba}
	72	3.4 ± 0.96 ^{Ab}	2.84 ± 0.86 ^{Bc}	3.74 ± 0.80 ^{Aab}	4.08 ± 0.82 ^{Aa}

^{a-c} Different superscript lowercase letters, within a column, denote significant differences ($p < 0.05$) between the values obtained for the different treatments according to Duncan test.

^{A-B} Different superscripts capital letters, with a row, denote significant differences ($p < 0.05$) between values obtained for different days of storage for each treatment according to Duncan test.

However, the increased antimicrobial activity caused by the mixture of these essential oils could be partially explained considering the different compounds found for each essential oil individually. Generally, essential oils having strongest antibacterial activity contain high amounts of carvacrol and/or thymol, such as *O. vulgare*. Regarding that hydroxyl groups enhance the antibacterial properties of essential oils, 1,8-cineole, which was the most prevalent compound in *R. officinalis*, may have also contributed to the establishment of the fast and steady antimicrobial effect achieved with the combination of the oils (Elgayyar, Draughon, Golden, & Mount, 2000). Camphor, one of the main components of *R. officinalis*, possesses oxygen functions in its structure and these functions are known to increase the antimicrobial properties of terpenoids (Naigre, Kalck, Roques, Roux, & Michel, 1996).

Synergy is not only influenced for major compounds of essential oils, because minor components may have a more critical role to this effect than the main components mixed (Gutierrez et al., 2009). Hydrocarbons (such as α -pinene, camphene, myrcene, α -terpinene and *p*-cymene), which have very weak antibacterial activity, found in *R. officinalis* in amounts higher than 1 g/100 g appear to swell bacterial cell to greater extent than carvacrol does, so these compounds enables carvacrol to be more easily transported into the cell (Gutierrez et al., 2008). Dorman and Deans (2000) state that as antimicrobial activity depends not only on chemical composition, but also on the lipophilic properties and the potency of functional groups or aqueous solubility, the mixture of compounds with different biochemical properties may enhance the efficacy of essential oils.

Regarding 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 the essential oils of *O. vulgare* and *R. officinalis* alone (MIC) and in mixture (¼ MIC + ¼ MIC) on the sensory characteristics of minimally processed leafy vegetables over refrigerated storage. Although the essential oils when tested alone were effective in inhibiting the microbial growth in vegetables-based broth and in food matrices, their use to sanitize vegetables caused undesirable effects on sensory attribute mainly after 72 h of storage. Otherwise, the vegetables sanitized with mixture of the essential oils at sub-inhibitory concentrations showed a further acceptability of the most sensory attributes after 72 h of storage.

The results presented in this study showed a synergistic effect of the essential oils of *O. vulgare* and *R. officinalis* on the base of FIC index, kill-time assay and application in fresh leafy vegetables. These essential oils combined at sub-inhibitory concentrations were effective in inhibiting the growth and survival of pathogenic and spoilage microorganisms associated to minimally processed vegetables, although the underlying mode of action remains to be explored in the future. Sensory evaluation suggested that application of the essential oils in mixture at sub-inhibitory concentrations as sanitizer in vegetables would be acceptable to consumers, mainly when regarded a more extended storage time. Our findings reinforced that the mixtures of essential oils with different chemical composition at sufficient low concentration could arise as an alternative to replace synthetic sanitizers classically applied in vegetables, and to reach the balance between the demand for the microbial safety and organoleptic acceptability.

Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Brazil) for the financial support, and FACEPE – Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Brazil) for scholarship of the first author.

References

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishment. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 121–129.
- Adams, R. P. (1995). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Carol Stream: Allured Publishing Corporation.
- Barros, J. C., Conceição, M. L., Gomes Neto, N. J., Costa, A. C. V., Siqueira Júnior, J. P., Basílio Júnior, I. D., et al. (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.
- Beuchat, L. R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens. *Microbes and Infection*, 4, 413–423.
- Burnett, S. L., & Beuchat, L. (2001). Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27, 104–110.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.

- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2008). Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Control*, 19, 487–494.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 308–316.
- Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., & Mount, J. R. (2000). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64, 1019–1024.
- Fu, Y., Zu, Y. G., Chen, L. Y., Shi, X. G., Wang, Z., Sun, S., et al. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21, 989–994.
- 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 parameters of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 10, 195–202.
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22, 273–292.
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *The Journal of Applied Bacteriology*, 76, 626–631.
- Lin, Y. T., Labbe, R. G., & Shetty, K. (2005). Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 6, 453–458.
- López-Gálvez, F., Allende, A., Truchado, P., Martínez-Sánchez, A., Tudela, J. A., Selma, M. V., et al. (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, I. M., & Gould, I. M. (2000). Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 15, 125–129.
- Martin-Belloso, O. (2007). Pros and cons of minimally processed foods. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 582–582.
- Molinós, A. C., Abriouel, H., López, R. L., Omar, N. B., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2009). Enhanced bactericidal activity of enterocin AS-48 in combination with essential oils, natural bioactive compounds and chemical preservatives against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salad. *Food Chemistry and Toxicology*, 47, 2216–2223.
- 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.
- Naveena, B. M., Muthukumar, M., Sen, A. R., Babji, Y., & Murthy, T. R. K. (2006). Improvement of shelf-life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. *Meat Science*, 74, 409–415.
- 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., Cannatelli, M. A., Musolino, A. D., Procopio, F., & Alonzo, V. (2002). *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 181–184.
- 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, 308–311.
- Ragaert, P., Verbeke, W., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2004). Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. *Food Quality and Preference*, 15, 259–270.
- Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K., & Remmal, A. (2003). The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 286–292.
- Souza, E. L., Barros, J. C. B., Conceição, M. L., Gomes Neto, N. J., & Costa, A. C. V. (2009). Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 387–393.
- van Den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including line temperature programmed gas liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11, 463–467.
- Xu, W., Qu, W., Huang, K., Guo, F., Yang, J., Zhao, H., et al. (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.

5.2 ARTIGO 2

Título: Combined use of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils at sub-inhibitory concentrations induces changes in cell viability, membrane permeability and morphological characteristics of *Aeromonas hydrophila*

Status do artigo: aceito para publicação

Periódico: Foodborne Pathogens and Disease

Qualis Medicina II: B1

JCR: 2.134

Combined use of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. at sub-inhibitory concentrations induces changes in cell viability, membrane permeability and morphological characteristics of *Aeromonas hydrophila*

Running title: Effects of essential oils on *A. hydrophila*

Geíza Alves de Azerêdo¹, Tânia Lúcia Montenegro Stamford², Evandro Leite de Souza^{3*}

¹*Laboratory of Food Microbiology, Federal Institute of Education, Science and Technology of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil*

²*Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

³*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 aimed to evaluate the antibacterial activities of the essential oils from *Origanum vulgare* L. (OV) and *Rosmarinus officinalis* L. (RO), both singly and in combination at sub-inhibitory concentrations ($\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{4}$ MIC), against *Aeromonas hydrophila* and to investigate the possible mechanisms underlying these activities. Used singly (OV: 2.5 μ L/mL; RO: 20 μ L/mL) or in a mixture (OV: 0.625 μ L/mL + RO: 5 μ L/L), these essential oils led to a significant decrease ($p < 0.01$) in bacterial viability after 24 h of exposure. A decrease in glucose consumption by *A. hydrophila* and release of cellular material were observed immediately after the addition of the essential oils, both singly and as a mixture, and continued for up to 6 h. Electron microscopy of cells exposed to the essential oils revealed severe changes in the plasma membrane, cytoplasmic appearance and cell shape during the 6-h exposure period. OV and RO essential oils combined at sub-inhibitory concentrations could be rationally applied to inhibit the growth of *A. hydrophila* in food products, particularly minimally processed vegetables.

Keywords: minimally processed vegetables, essential oils, combined use, antibacterial properties.

1. Introduction

Aeromonas hydrophila is a psychrotrophic and facultative anaerobe that is capable of growing in conditions with low oxygen concentrations (Francis, Thomas, & O'Beirne, 1999). Detection of this pathogen is widespread in foods such as seafood, poultry products, raw milk and vegetables (Daskalov, 2006). *A. hydrophila* has received increasing attention as an opportunistic pathogenic bacterium in humans (Qadri, Zafar, & Lee, 1991; Chang, Thompson,

Rodman, Bylander, & Thomas, 1997; Pianetti, Battistelli, Citterio, Parlani, Falcieri, & Bruscolini, 2009).

A. hydrophila is capable of growing at low temperatures, such as those used to preserve minimally processed vegetables (MPVs) (Szabo, Scurrah, Borrows, & 2000; Xanthopoulos, Tzanetakis, & Litopoulou-Tzanetaki, 2010). The MPV industry has expanded in the past few years in response to a growing demand for the consumption of convenient, fresh and ready-to-eat foods. However, the emergence of pathogenic microorganisms, including *A. hydrophila*, that have not been previously linked with raw or processed food products has enhanced the potential for outbreaks of foodborne diseases associated with the consumption of MPVs (Monge, Arias-Echandi, & Utzinger, 1998; McMahon & Wilson 2001; Uyttendaele, Neyts, Vanderswalmen, Notebaert, & Debevere, 2004).

To improve the safety and shelf life of MPVs, researchers in the food industry have applied several different sanitizers for controlling the initial amount of spoilage and pathogenic microorganisms in these foods (Gomez-López, Devlieghere, Bonduelle, & Debevere, 2005). Hypochlorite is often applied to MPVs for disinfection, although this procedure has presented some disadvantages, such as the formation of carcinogenic chlorinated compounds and poor antimicrobial efficacy against some microorganisms (Singh, Sing, Bhunia, & Strosine, 2002; Allende, Selma, López-Gálvez, Villaescusa, & Gil, 2008), including *A. hydrophila* (Uyttendaele et al., 2004).

In this context, plant essential oils have received particular interest for their potential as antimicrobial compounds during the treatment of MPVs (Guttierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2008). Early studies have shown that the essential oils from *Origanum vulgare* L. (OV) and *Rosmarinus officinalis* L. (RO) possess antimicrobial activities that combat spoilage and pathogenic food-related microorganisms (Sacchetti, Maietti, Muzzoli, Scaglianti, Manfredini, Radice, & Bruni, 2005; Souza, Stamford, Lima, & Trajano, 2007; Muñoz, Guevara, Palop,

Tabera, & Fernández, 2009; Oliveira, Stamford, Gomes Neto, & Souza, 2010). However, researchers have shown that these essential oils display antimicrobial properties in synthetic media, but the amounts required to substantially inhibit bacterial growth in food matrices are often higher than would be organoleptically acceptable (Naveena, Muthukumar, Sen, Babji, & Murthy, 2006; Souza, Barros, Conceição, Gomes Neto, & Costa, 2009). Because these high concentrations are likely to impart a certain flavor to foods, the addition of sub-inhibitory levels of essential oils as mixtures should be adjusted to find a balance between sensory acceptability and antimicrobial efficacy (Dimirtiević, Mihajlovski, Antonović, Milanović-Stevanović, & Mijin, 2007).

In a previous study, Azerêdo, Stamford, Nunes, Gomes-Neto, Oliveira, & Souza (2011) found MIC values of 2.5 and 20 $\mu\text{L/mL}$ for OV and RO, respectively, against *A. hydrophila* INCQS 7966. In the same study, analysis of the fractional inhibitory concentration index for the combined application of these essential oils suggested a synergistic interaction against this bacterium. The sensory evaluation of vegetables sanitized with a mixture of these essential oils at sub-inhibitory concentrations ($\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{4}$ MIC) indicated increased acceptability of most of the sensory attributes assessed after refrigerated storage when compared to vegetables sanitized with each essential oil independently (at the MIC). In this manuscript, we report further investigations of the effects of OV and RO essential oils, used singly and in combination at sub-inhibitory concentrations, on the cell viability, glucose consumption, membrane permeability and morphology of *A. hydrophila*. To our knowledge, few studies have emphasized the antimicrobial mechanism of the application of a mixture of essential oils at sub-inhibitory concentrations against pathogenic microorganisms that are associated with foods.

2. Materials and methods

2.1 Essential oils

Essential oils from OV (batch OREORG01; density at 20°C: 0.90; refractive index at 20°C: 1.47) and RO (batch ROSTUN04; density at 20°C: 0.94; refractive index at 20°C: 1.51) were obtained from Aromalândia Ind. Com. Ltda. (Minas Gerais, Brazil), and the quality parameters of the oils were described in an accompanying technical report. This supplier extracts the essential oils on an industrial scale by steam distillation. Essential oil solutions were prepared in a nutrient broth (Difco, Brazil) using bacteriological agar (0.15 g/100 mL) as a stabilizing agent (Mann & Markam, 1998; Bennis, Chami, Chami, Bouchikhi, & Remma, 2004).

2.2 Bacterial strains

A. hydrophila INCQS 7966 was obtained from the Brazilian Institute of Quality Control in Health (Rio de Janeiro, Brazil) and used as the test microorganism. A stock culture was kept on nutrient agar (NA) slants under refrigeration ($7 \pm 1^\circ\text{C}$). Inocula used in the antimicrobial assays were obtained from overnight cultures grown on NA slants at 28°C. Unless stated otherwise, the inocula used in the assays were obtained from suspensions of the strain grown to stationary phase and were prepared by inoculating 400 mL of brain heart infusion broth (Difco, Brazil) with two colonies of each strain from an overnight culture on brain heart infusion agar (Difco, Brazil). The newly inoculated culture was then incubated at 30°C for 18 h. After incubation, the bacteria were separated from the growth medium by centrifugation at $10,000 \times g$ for 12 min at 4°C, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), and resuspended in PBS supplemented with Tween 80 (0.01 g/L). Suspensions were adjusted so that the optical density at 620 nm (OD_{620}) of a 1:100 dilution was approximately 0.3, corresponding to approximately 3×10^{10} colony forming

units per milliliter (CFU/mL) (Carson, Mee, & Riley, 2002). The suspension was serially diluted in PBS (10^{-1} to 10^{-3}) to provide a viable cell count of approximately 10^7 CFU/mL.

2.3 Time-kill assays

The effects of the essential oils used singly (OV: 2.5 μ L/mL; RO: 20 μ L/mL) or in combination (OV: 0.625 μ L/mL; RO: 5 μ L/mL – OV/RO) on the cell viability of *A. hydrophila* were evaluated by the viable cell count procedure. For this assay, the bacterial suspension (100 μ L/mL) was inoculated in nutrient broth and then the essential oil single or in combination was added to the mixture. The culture was gently shaken for 30 s and then incubated at 30°C. At several time intervals (0, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h), 1 mL of the suspension was serially diluted (10^{-1} to 10^{-5}) in PBS and used to inoculate sterile nutrient agar Petri dishes, which were subsequently incubated for 24 h at 30°C (Barros, Conceição, Gomes Neto, Costa, Siqueira Júnior, Basílio Júnior, & Souza, 2009). Control flasks without essential oils were tested under the same conditions. The results are expressed as the log of the CFU/mL value.

2.4 Glucose consumption

Aliquots of the bacterial inocula (100 μ L/mL) were exposed to the essential oils singly or in combination in PBS supplemented with glucose (0.2 g/L) at 30°C. At several time intervals (0, 30, 60, 90, 120, 240, and 360 min), an aliquot (1 mL) of the mixture was removed, and the extracellular glucose consumption (mg/100 mL) was estimated using the photometric Glucose PAP Liquiform kit (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brazil). Control flasks without essential oils were also tested (Tassou, Koutsoumanis, & Nychas, 2000).

2.5 Release of cellular material

Measurement of the release of material absorbing at 260 nm from *A. hydrophila* was conducted using 2-mL aliquots of the bacterial inocula (100 μ L/mL) in PBS after the addition of essential oils, either singly or in combination, at 30°C. At several time intervals (0, 30, 60, 90, 120, 240, and 360 min), the bacterial cells were separated from the growth medium by centrifugation at 10,000 $\times g$ for 12 min at 4°C, and the supernatant was examined for leakage of cellular material by measuring the absorbance at 260 nm with a Biochrom Libra S32/S32 spectrophotometer, as described by Carson et al. (2002). Control flasks without essential oils were also tested.

2.6 Ultrastructural analysis

Cells exposed to either individual essential oils or a mixture of the oils for 3 or 6 h were harvested by centrifugation at 10,000 $\times g$ 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). After being washed in the same buffer, the cells were 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 with ethanol followed by critical point drying with CO₂, coated with a 20-nm-thick gold layer, and observed with an FEI Quanta 200 FEG scanning electron microscope (Battistelli, De Sanctis, De Bellis, Cucchiarini, Dacha, & Gobbi, 2005). For transmission electron microscopy, cells exposed to the essential oils were fixed and post-fixed as described above, dehydrated in a graded acetone series, and embedded for 72 h at 60°C in Poly/Bed 812 resin (PolySciences, Warrington, PA, USA). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and were observed with a Morgagni 268D transmission electron microscope (Olivotto, Borzi', Vitellozzi, Pagani, Facchini, Battistelli, Penzo, Xiang, Flamigni, Jun, Falcieri, Facchini, &

Marku, 2008). Bacterial cells that were not exposed to the essential oils were fixed and observed similarly as a control.

2.7 Reproducibility and statistics

All assays were performed in triplicate on two separate occasions, and the results are expressed as an average of the assays. Statistical analysis was performed to determine significant differences ($p < 0.01$) by analysis of variance followed by Tukey's test. For statistical analysis, the SigmaStat 3.1 computer program was used.

3. Results

3.1 Time-kill assays

Individual addition of the essential oil of OV (2.5 $\mu\text{L/mL}$) or RO (20 $\mu\text{L/mL}$) caused a significant drop ($p < 0.05$) in the bacterial count over the evaluated periods of time (Figure 1). Values lower than two log cycles were found for *A. hydrophila* in broth containing only the essential oil of OV after 4 h, and these counts were maintained for the remainder of the analysis.

The combination of both essential oils at sub-inhibitory concentrations (OV: 0.625 $\mu\text{L/mL}$ and RO: 5 $\mu\text{L/mL}$) reduced the initial inocula of *A. hydrophila* by four log cycles after 12 h of exposure, and no recovery in viable bacteria was noted after 24 h of exposure. A smaller decrease in the viability of *A. hydrophila* was found in the broth containing only the RO essential oil. Application of the essential oils both singly or in combination caused a significant decrease ($p < 0.01$) in bacterial counts over the evaluated intervals in comparison to the control assay.

3.2 Effects of essential oils on glucose consumption

The amount of glucose in the broth without essential oils added progressively decreased, indicating rapid consumption of glucose by the *A. hydrophila* cells over time (Figure 2). On the other hand, similar amounts of glucose were found in broth containing essential oils (both singly and in combination) over the assessed time period. These results suggest that the glucose consumption of *A. hydrophila* was affected immediately upon the addition of the essential oils, followed by a steady inhibitory effect. The addition of the essential oils, both singly and in combination, caused a significant decrease ($p<0.05$) in the consumption of glucose by *A. hydrophila* when compared to the control assay.

3.3 Release of cellular material

Measuring the optical density at 260 nm of the suspension of cells that were exposed to the essential oils, both singly and in combination, revealed an increase in the release of material absorbing at 260 nm throughout the period of exposure ($p<0.01$) (Figure 3). These results suggest that increased membrane permeability at least partially underlies the antimicrobial property of the tested essential oils against *A. hydrophila*.

3.4 Ultrastructural analysis

Scanning electron microscopy of *A. hydrophila* cells revealed morphological damage due to the exposure to the essential oils of OV and RO, both singly and in combination for 3 or 6 h (Fig. 4, A-F). Relevant morphological changes occurred in the presence of OV and RO essential oils (both singly and in combination) after only 3 h of exposure. Normal shaped cells disappeared, and elongated and distorted forms appeared after only 3 h of incubation. Microscopy of the cells exposed to the essential oils revealed membrane damage with the

appearance of projecting cellular material. Bacteria grown in control flasks (no essential oils) presented normal bacillary morphology after both 3 and 6 h of incubation (Fig. 4, G-H).

A. hydrophila cells, when exposed to the essential oils both singly and in combination, demonstrated changes to the outer membrane, cytoplasmic appearance, and cell shape (Fig. 5, A-F). Exposure to the essential oil of OV alone caused cell deformation, condensation and loss of cytoplasmic material after 3 h of exposure (Fig. 5A), and after 6 h, the essential oil caused total collapse of the structural integrity of the cells (Fig. 5B). Similar changes were found when the cells were exposed to the essential oils in combination (Fig. 5, E-F). Cells exposed to the RO essential oil displayed detachment of the cell wall from the cytoplasmic membrane, damage to the outer membrane and loss of cytoplasmic material after only 3 h of incubation (Fig. 5C). Cells grown in control flasks (no essential oils) appeared normal in shape, with intact outer membranes and evenly distributed cytoplasm (Fig. 5G-H).

4. Discussion

OV and RO essential oils, used singly and in combination at sub-inhibitory concentrations, severely inhibited the cell viability of *A. hydrophila* INCQS 7966 after 24 h of exposure. Few studies have previously investigated the efficacy of essential oils in inhibiting the cell viability of *A. hydrophila*. Uyttendaele et al. (2004) reported a decrease in the counts of *A. hydrophila* in fresh vegetables when exposed to thyme essential oil at 5 and 10 $\mu\text{L/mL}$.

A. hydrophila cells showed a decrease in glucose consumption after 360 min of exposure to the essential oils of OV and RO, both singly and in combination. According to Tassou et al. (2000), these findings may indicate inhibition of either glucose uptake or the glucose metabolic pathway.

Exposure of *A. hydrophila* cells to essential oils caused a rapid release of material absorbing at 260 nm. Demonstrable leakage of cytoplasmic material is indicative of gross and

irreversible damage to the cytoplasmic membrane (Cox, Gustafson, Mann, Markhan, Liew, Hartlnd, Bell, Warmington, & Wyllie, 1998). In particular, such damage may occur as a result of the disruption of peptidoglycan (Ruiz-Barba, Rios-Sanchez, Fedriani-Iriso, Olias, Rios, & Jimenez-Diaz, 1990) and/or damage to the cell membrane (Hugo, 1991).

Scanning electron microscopy of *A. hydrophila* cells grown in the presence of the essential oils revealed drastic changes in cell morphology with damage to the cytoplasmic membrane accompanied by obvious surface alterations. Cells exposed to the essential oils, both singly and in combination, had elongated shapes after 3 h of exposure. Elongated cells are regarded as viable because they are capable of dividing and forming new, normal rod cells after exposure to stress-inducing conditions (McMahon, McDowell, & Blair, 2007). Researchers have proposed that elongation is a possible strategy for coping with unfavorable conditions (Piuri, Sanchez-Rivas, & Ruzal, 2005; Pianetti, Manti, Boi, Citterio, Sabatini, Papa, Rocchi, & Bruscolini, 2008; Pianetti et al., 2009). No bacteria were observed after 6 h of cultivation in the presence of OV essential oil alone or a mixture of OV and RO essential oils, indicating that these treatments effectively killed *A. hydrophila*.

Observations from transmission electron microscopy suggested that the assayed essential oils also caused changes in the cell wall and outer membrane of *A. hydrophila*. Components of the essential oils could easily enter into the cells through these lesions, facilitating the leakage of cellular components and inducing cell lysis. Visualization of the damage to the cell structure confirms the sensitivity of the outer membrane of *A. hydrophila* to the tested essential oils. These oils may penetrate the cytoplasmic membrane, influencing membrane permeability and resulting in the leakage of cytosolic material over a short period of exposure. These results are in agreement with observations of other gram-negative bacteria, in which stress conditions lead to similar morphological changes (Pianetti et al., 2009; Lacombe, Wu, Tyler, & Edwards, 2010).

We have previously found that carvacrol (66.9 g/100 g) and 1,8-cineole (32.2 g/100 g) are two major compounds (57.71 %) of the essential oils from OV and RO that were assayed here (Azerêdo et al., 2011). It is difficult to understand the exact mechanism underlying the synergistic effect of the combined application of OV and RO essential oils, although the increased antimicrobial activity caused by the mixture of these essential oils may partially be explained by considering the different compounds found in each individual essential oil. Essential oils with the strongest antibacterial activities, such as the essential oil of OV, generally present high amounts of carvacrol and/or thymol. Hydroxyl groups enhance the antibacterial properties of essential oils, and 1,8-cineole, which was the most prevalent compound in the essential oil of RO, may have also contributed to the rapid and steady antimicrobial effect achieved with the combination of the two oils (Elgayyar, Draughon, Golden, & Mount, 2000).

Cineole, one of the main components of the RO essential oil (Azêredo et al., 2011), possesses oxygenated monoterpenes in its structure, and these structures are known to increase the antimicrobial properties of terpenoids (Naigre, Kalck, Roques, Roux, & Michel, 1996). Hydrocarbons (such as α -pinene, camphene, myrcene, α -terpinene and *p*-cymene), which have very weak antibacterial activity, are found in the RO essential oil in lower amounts (Azerêdo et al., 2011) and appear to swell bacterial cells to a greater extent than carvacrol. Therefore, these compounds enable carvacrol to be more easily transported into the cell (Guttierrez et al., 2008).

According to our results, the essential oils from OV and RO, used singly and in combination at sub-inhibitory concentrations, inhibited the cell viability of *A. hydrophila*. The observation of the release of cytoplasmic material, decreased glucose consumption, and altered morphology of the cells suggests that the cell wall and cytoplasmic membrane of *A. hydrophila* are compromised by exposure to these essential oils. Overall, these results reveal that the combination of OV and RO essential oils at sub-inhibitory concentrations could be rationally

applied to inhibit the growth of *A. hydrophila* in food products, particularly in vegetables, to balance the microbial safety and organoleptic acceptability of food products.

5. References

- Allende, A., Selma, M.V., López-Gálvez, F., Villaescusa, R. & Gil, M.I. (2008). Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 155-163.
- Azerêdo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Gomes-Neto, N.J., Oliveira, 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.
- Barros, J.C., Conceição, M.L., Gomes Neto, N.J., Costa, A.C.V., Siqueira Júnior, J.P., Basílio Júnior, I.D., & 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.
- Battistelli, M., De Sanctis, R., De Bellis, R., Cucchiari, L., Dacha', M., & Gobbi, P. (2005). *Rhodiola rosea* as antioxidant in red blood cells: ultrastructural and hemolytic behaviour. *European Journal of Histology*, 49, 243–254.
- Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., & Remma, A. (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 454–458.
- 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 assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1914-1920.

- Chang, C.Y., Thompson, H., Rodman, N., Bylander, J., & Thomas, J. (1997). Pathogenic analysis of *Aeromonas hydrophila* septicemia. *Annals of Clinical and Laboratory Sciences*, 27, 254-259.
- Cox, S.D., Gustafson, J.E., Mann, C.M., Markhan, J.L., Liew, Y.C., Hartlnd, R.P., Bell, H.C., Warmington, J.R., & Wyllie, S.G.(1998). Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 355–358.
- Daskalov, H., 2006. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*, 17, 474-483.
- Dimirtiević, S.I., Mihajlovski, K.R., Antonović, D.G., Milanović-Stevanović, M.R., & Mijin, D.Z. (2007). A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chemistry*, 74, 774–782.
- Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden, D.A., & Mount, J.R. (2000). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64, 1019-1024.
- Francis, G.A., Thomas, C., & O'Beirne, D. (1999). The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 1–22.
- Gomez-López, V.M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., & Debevere, J. (2005). Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 79- 89.
- Guttierrez, 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.
- Hugo, W.B. (1991). A review: a brief history of heat and chemical preservation and disinfection. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 9-18.

- Lacombe, A., Wu, V.C.H., Tyler, S., & Edwards, K. (2010). Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 102-107.
- Mann, C.M., & Markham, J.L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 538-544.
- McMahon, M.A.S., McDowell, D.A., & Blair, I.S. (2007). The pattern of pleomorphism in stressed *Salmonella* Virchow populations in nutrient and growth phase dependent. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 276-281.
- McMahon, M.A.S., & Wilson, I.G. (2001). The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 155-162.
- Monge, R., Arias-Echandi, M.L., & Utzinger, D. (1998). Presence of cytotoxic *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* in fresh vegetables. *Revista Biomédica*, 9, 176-180.
- Muñoz, M., Guevara, L., Palop, A., Tabera, J., & Fernández, O.S. (2009). Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 220-227.
- 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.
- Naveena, B.M., Muthukumar, M., Sen, A.R., Babji, Y., & Murthy, T.R.K. (2006). Improvement of shelf-life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. *Meat Science*, 74, 409-415.

- 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, 308-311.
- 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. (2008). Differential requirements for IKKa and IKKb in the terminal differentiation of primary human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*, 58, 227-239.
- Pianetti, A., Manti, A., Boi, P., Citterio, B., Sabatini, L., Papa, S., Rocchi, M.B.L., & Bruscolini, F. (2008). Determination of viability of *Aeromonas hydrophila* in increasing concentrations of sodium chloride at different temperatures by flow cytometry and plate count technique. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 252-260.
- Pianetti, A., Battistelli, M., Citterio, B., Parlani, C., Falcieri, E., & Bruscolini, F. (2009). Morphological changes of *Aeromonas hydrophila* in response to osmotic stress. *Micron*, 40, 426-433.
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C. & Ruzal, S.M. (2005). Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 84-95.
- Qadri, S.M., Zafar, M. & Lee, G.C. (1991). Can isolation of *Aeromonas hydrophila* from human faeces have any clinical significance? *Journal of Clinical Gastroenterology*, 3, 537-540.
- Ruiz-Barba, J.L., Rios-Sanchez, R.M., Fedriani-Iriso, C., Olias, J.M., Rios, J.L., & Jimenez-Diaz, R. (1990). Bactericidal effect of phenolic compounds from green olives against *L. plantarum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 13, 199-220.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91, 621-632.

- Singh, N., Sing, R.K., Bhunia, A.K., & Strosine, R.L. (2002). Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O147:H7 on lettuce. *Food Microbiology*, 19, 183-193.
- Souza, E.L., Barros, J.C.B., Conceição, M.L., Gomes Neto, N.J., & Costa, A.C.V. (2009). Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 387-393
- Souza, E.L., Stamford, T.L.M., Lima, E.O., & Trajano, V.N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18, 409-413.
- Szabo, E., Scurrah, K., & Borrows, J. (2000). Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 456–460.
- Tassou, C., Koutsoumanis, K., & Nychas, G-J.E. (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33, 273-280.
- 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.
- Xanthopoulos, V., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2010). Occurrence and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in minimally processed fresh vegetable salads. *Food Control*, 21, 393-398.

Figure 1 Survivors curves for *A. hydrophila* INCQS 9610 in nutrient broth at 28°C added with *O. vulgare* (OV) and *R. officinalis* (RO) singly and in mixture: (+) OV: 2.5 µL/mL; (○) RO: 20 µL/mL; (▲) OV: 0.62 µL/mL + RO: 5 µL/mL; (■) control: 0 µL/mL. Detection limit of the assay: 2.0 Log of CFU/mL.

Figure 2 Inhibitory effect on glucose consumption of *A. hydrophila* cells by exposure to essential oils of *O. vulgare* (OV) and *R. officinalis* (RO) singly and in mixture. (+) OV: 2.5 µL/mL; (○) RO: 20 µL/mL; (▲) OV: 0.62 µL/mL + RO: 5 µL/mL; (■) control: 0 µL/mL.

Figure 3 Rate of 260-nm-absorbing material release from *A. hydrophila* exposed to essential oils of *O. vulgare* (OV) and *R. officinalis* (RO) singly and in mixture. (+) OV: 2.5 µL/mL; (○) RO: 20 µL/mL; (▲) OV: 0.62 µL/mL + RO: 5 µL/mL; (■): control: 0 µL/mL.

Figure 4 Scanning electron microscopy of *A. hydrophila* cells incubated with essential oils of *O. vulgare* (OV) and *R. officinalis* (RO) alone and in mixture. (A-B) Cells treated with OV for 3 (A) and 6 hours (B). (C-D) Cells treated with RO for 3 (C) and 6 hours (D). (E-F) Cells incubated with the combination of the two oils. (G-H) Control cells (no essential oils) after 3 (G) and 6 hours of cultivation (H). Bars: a, b, c, d, e, f and g = 5 µm; h = 10 µm.

Figure 5 Transmission electron microscopy of *A. hydrophila* exposed to essential oils of *O. vulgare* (OV) and *R. officinalis* (RO) alone or in combination. (A-B) Cells treated with OV for 3 (A) and 6 hours (B). (C-D) Cells treated with RO for 3 (C) and 6 hours (D). (E-F) Cells incubated with the combination of the two oils. (G-H) Control cells (no essential oils) after 3 (G) and 6 hours of cultivation (H). Bars: a, d, and e = 0.5 µm; b, c, and h = 2 µm; f = 10 µm; and g = 1 µm.

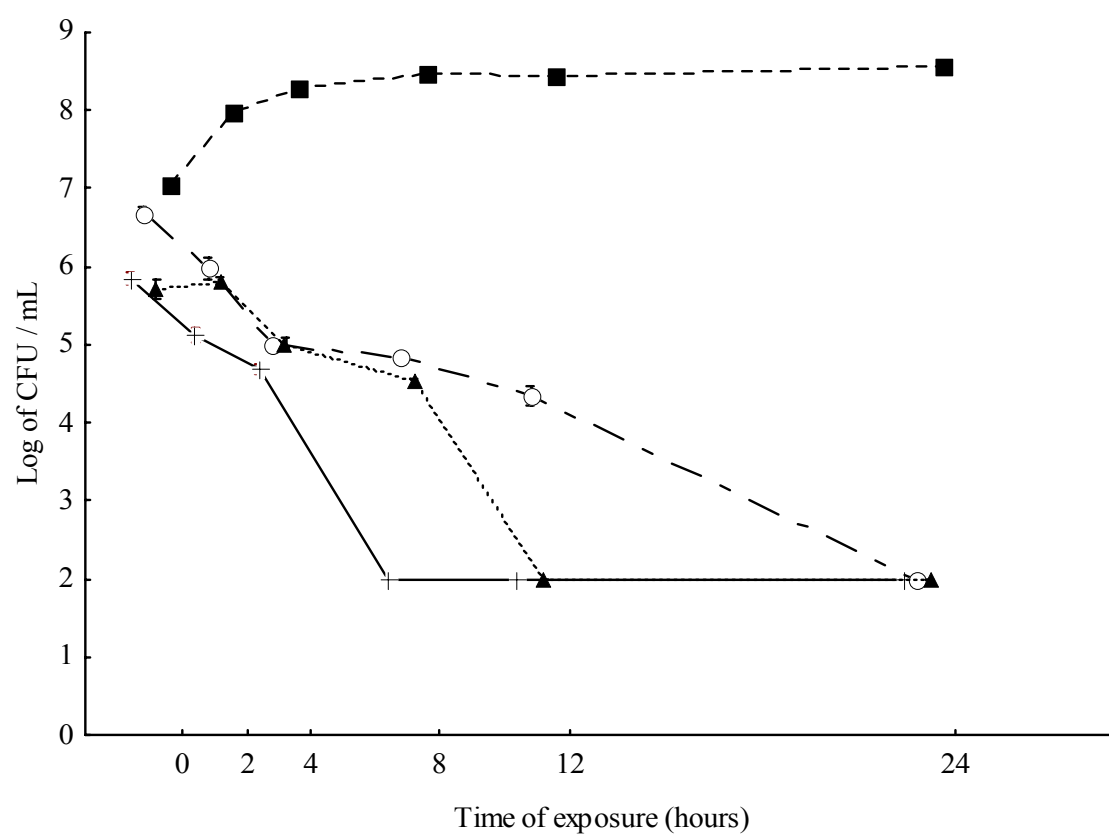


Figure 1.

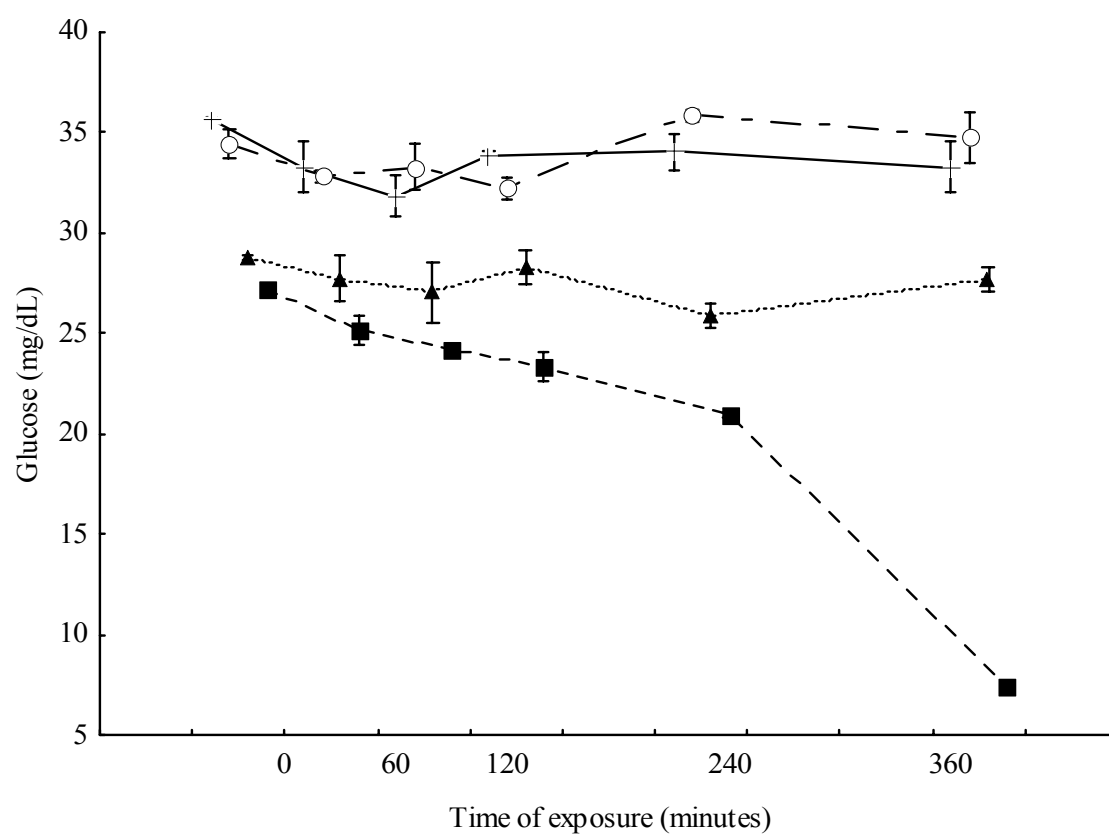


Figure 2.

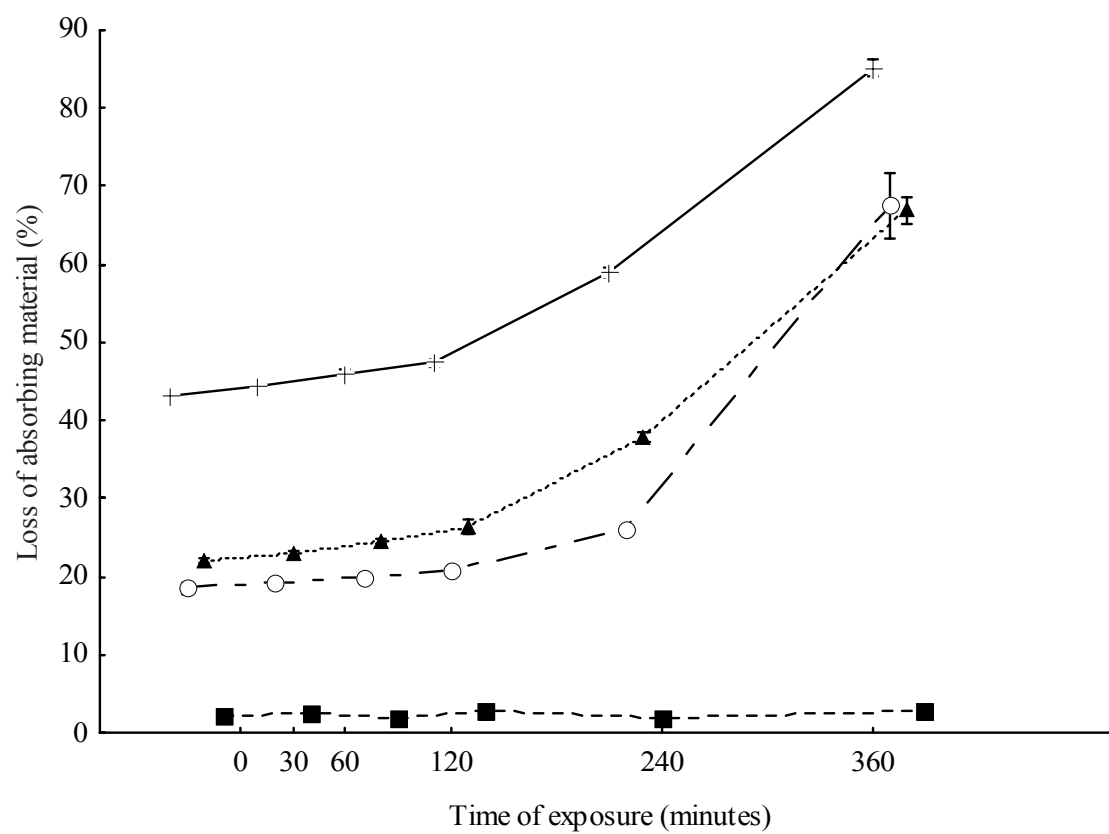


Figure 3.

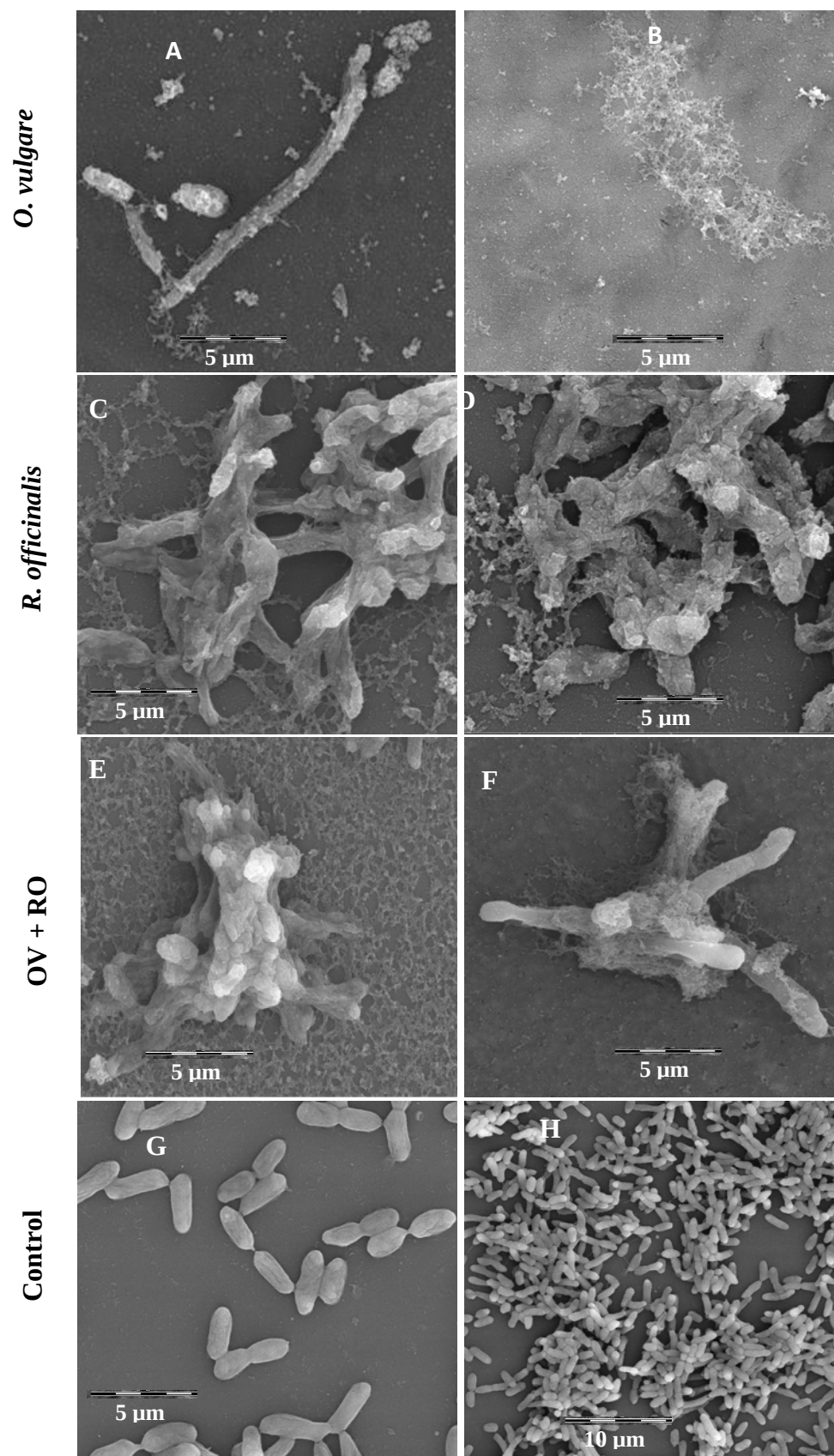


Figure 4.

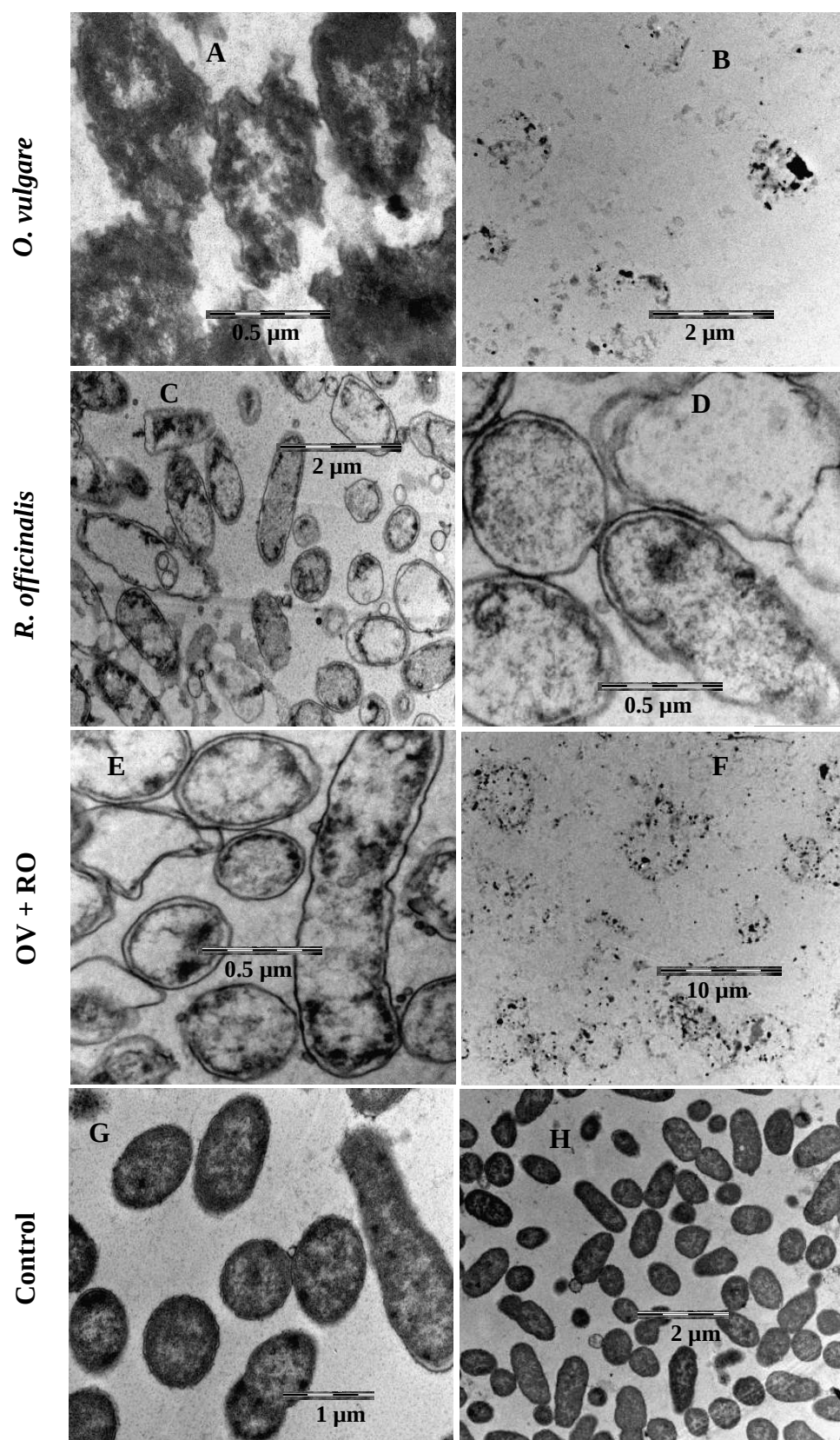


Figure 5.

5.3 ARTIGO 3

Título: *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. singly and combined at sub-inhibitory concentrations cause similar changes in membrane permeability and morphology of *Listeria monocytogenes*.

Status do artigo: enviado para publicação

Periódico: Food Chemical and Toxicology

Qualis Medicina II: B1

JCR: 1.649

Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. singly and combined at sub-inhibitory concentrations cause similar changes in membrane permeability and morphology of *Listeria monocytogenes

Running title: Anti-*L. monocytogenes* effects of essential oils

Geíza Alves de Azerêdo^a, Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo^b, Tânia Lúcia Montenegro Stamford^c, Evandro Leite de Souza^{d*}

^a*Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil*

^b*Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, Brasil*

^c*Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil*

^d*Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil*

* 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 aimed to evaluate the antibacterial activities of two essential oils against *L. monocytogenes* and to investigate the possible mechanism for these activities. The essential oils were derived from *Origanum vulgare* L. (OV) and *Rosmarinus officinalis* L. (RO), and they were applied both singly and in combination at sub-inhibitory concentrations. All tested treatments with the essential oils caused significant inhibition ($p < 0.01$) of bacterial growth. Decreased glucose consumption and the loss of cellular material by *L. monocytogenes* were found immediately after addition of the essential oils alone and in combination, and continued for up to 360 min. Analysis of cells exposed to the essential oils using electron microscopy revealed drastic ultrastructural changes occurring over time, including the rupture of plasma membranes, shrinking of the cytoplasmic content, and leakage of intracellular material, all of which are consistent with diminished bacterial viability. The cell wall integrity was seriously affected by treatments with the essential oils, as evidenced by SYTO/PI staining. Essential oils from OV or RO, either singly or in combination at sub-inhibitory concentrations, could inhibit the growth of *L. monocytogenes* when applied to food products, particularly minimally processed vegetables.

Key-words: essential oils, combination, ultrastructure, cell viability, *Listeria monocytogenes*.

1. Introduction

The increased consumer demand for minimally processed and ready-to-use foods and the globalisation of the food industry have contributed to an increased risk of food-borne diseases (Gandhi and Chikindas, 2007; Martins and Germano, 2011). *L. monocytogenes* is a food-borne pathogen of particular concern in ready-to-use vegetable foods due to its ability to survive and grow at low temperatures. Listeriosis occurs predominantly in pregnant women, the elderly and the immunosuppressed, leading to illness, miscarriages and death (Bento et al., 2011).

Because of the potential threat to public health posed by *L. monocytogenes*, both the Food and Drug Administration (FDA - USA) and the Food Safety and Inspection Service (FSIS – USA) have imposed “zero tolerance” policies for this bacterium in ready-to-use foods (Sheen et al., 2011). The development of novel techniques to control the growth and survival of *L. monocytogenes* in these foods has been largely motivated by such policies (Bubonja-Sonje et al., 2011; Szabo et al., 2000).

Because of consumer demand to decrease the use of chemical preservatives, more attention has been paid to the search for naturally occurring substances able to act as antimicrobials or decontamination agents in or on foods (Nedorostova et al., 2009; Ponce et al., 2008). In this context, essential oils from plants, which are Generally Recognized as Safe (GRAS) and contain non-phytotoxic compounds (Paul et al., 2011), have received increasing interest for their potential use as alternative antimicrobial agents in foods (Souza et al., 2007).

Previous studies have shown that essential oils from *Origanum vulgare* L. (OV) and *Rosmarinus officinalis* L. (RO) possess antimicrobial activities, reducing both spoilage and the levels of pathogenic bacteria in foods (Muñoz et al., 2009; Oliveira et al., 2010; Sacchetti et al., 2005; Souza et al., 2007). However, the amounts required to substantially inhibit bacterial growth in foods are often higher than those that are organoleptically acceptable (Naveena et al., 2006; Souza et al., 2009). The use of sub-inhibitory concentrations of essential oils alone or in combination may be a way to provide a balance between sensory acceptability and antimicrobial efficacy (Dimirtiević et al., 2007).

We have previously determined the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) for OV and RO against *L. monocytogenes* ATCC 7644: 1.25 and 20 µL/mL, respectively. In the same study, the analysis of the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index for the combined application of these essential oils suggested a synergistic interaction against this bacterium, and sensory evaluation of vegetables sanitised with the mixture of these essential oils at sub-inhibitory

concentrations ($\frac{1}{4}$ MIC + $\frac{1}{4}$ MIC) showed a better acceptability for the most commonly assessed sensory attributes during refrigerated storage when compared with vegetables sanitised with each of the essential oils alone (MIC). In this study, we investigated further the mechanism by which these oils, applied both singly and in combination at sub-inhibitory concentrations, act on *L. monocytogenes*, analysing the cell viability, the glucose consumption and the release of cell material by these bacterium. The morphological changes induced by these oils were also observed using electron microscopy.

2. Material and methods

2.1 Essential oils

The essential oils from *Origanum vulgare* L. (OV) (batch OREORG01; density at 20°C: 0.90; refractive index at 20°C: 1.47) and *Rosmarinus officinalis* L. (RO) (batch ROSTUN04; density at 20°C: 0.94; refractive index at 20°C: 1.51), obtained by steam distillation, were purchased from Aromalândia Ind. Com. Ltda. (Minas Gerais, Brazil). Their quality parameters are described in an accompanying technical report. The essential oils were assayed at concentrations ranging from 80 to 0.003 $\mu\text{L/mL}$. The solutions of essential oils were prepared in nutrient broth (Himedia, Indian) using bacteriological agar (1.5 g/L) as a stabilising agent (Souza et al., 2009).

2.2 Bacterial strain

Listeria monocytogenes ATCC 7644 was obtained from the Laboratory of Food Microbiology, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil. A stock culture was kept on nutrient agar (Himedia, Indian) under refrigeration ($7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Unless stated otherwise, the inocula used in the assays were obtained from suspensions of the strain in the stationary phase of growth, and were prepared by inoculating 400 mL of Brain-Heart-Infusion

broth (Himedia, India) with two colonies of the each bacteria from overnight culture on Brain-Heart-Infusion agar. The newly inoculated culture was then incubated at 30°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 supplemented with Tween 80 (0.01 g/L). Suspensions were adjusted so that the optical density at 620 nm (OD₆₂₀) of a 1-in-100 dilution was approximately 0.3, which corresponded to approximately 3 x 10¹⁰ colony forming units per millilitre –(cfu/mL) (Carson et al., 2002). The suspension was serially diluted in PBS (10⁻¹ – 10⁻³) to provide a viable cell count of approximately 10⁷ cfu/mL.

2.3 Time-kill assay

The effects of the essential oils singly (OV: 1.25 µL/mL; RO: 20 µL/mL) or in mixture (OV/RO; OV: 0.3125 µL/mL; RO: 5 µL/mL) on the cell viability of *L. monocytogenes* was evaluated by the viable cell count procedure. For this assay, the bacterial suspension (100 µL/mL) was inoculated in nutrient broth and then the essential oil single or in combination was added to the mixture. The culture was gently shaken for 30 s, and then incubated at 30°C. At different time intervals (0, 1, 2, 4, 8 12 and 24 h), 1 mL of the suspension was serially diluted (10⁻¹ – 10⁻⁵) in PBS, and used to inoculate sterile nutrient agar Petri dishes, which were then incubated for 24 h at 30°C (Barros et al., 2009). Control flasks without essential oils were tested similarly. The results were expressed in log of cfu/mL.

2.4 Glucose consumption

Aliquots of the bacterial inocula (100 µL/mL) were exposed to essential oils singly or in mixture in PBS with glucose (0.2 g/L) at 30 °C. At different time intervals (0, 30, 60, 90, 120, 240 and 360 min), an aliquot (1 mL) of the system was removed, and the extracellular glucose

consumption (mg/100 mL) was estimated using the photometric Glucose PAP Liquiform kit (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brazil). Control flasks without essential oils were tested similarly (Tassou et al., 2000).

2.5 Release of cellular material

Measurement of the release of 260-nm-absorbing material from *L. monocytogenes* was conducted using 2-mL aliquots of the bacterial inocula (100 µL/mL) in PBS after addition of the essential oils either singly or in mixture at 30°C. At different time intervals (0, 30, 60, 90, 120, 240 and 360 min), the bacterial cells were separated from the growth medium by centrifugation at 10,000 x *g* for 12 min at 4°C, and the supernatant was examined for leakage of cell material by measuring the absorbance at 260 nm with a Biochrom Libra S32/S32 spectrophotometer as described by Carson et al. (2002). Control flasks without essential oils were tested similarly.

2.6 Ultrastructural assay

Cells exposed to either single essential oils or a mixture of the oils for 3 and 6 h 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). After washing in the same buffer, the cells were post-fixed for 30 min with osmium tetroxide (0.01 g/L) in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2). The cells were dehydrated in a graded acetone series and embedded for 72 h at 60°C in Poly/Bed 812 resin (PolySciences, Warrington, PA, USA). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and were observed with a Morgagni 268D transmission electron microscope (Olivotto et al., 2008). For scanning electron microscopy (SEM), cells exposed to the essential oils were fixed and post-fixed as described above, and they were 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 an FEI Quanta 200 FEG scanning electron microscope

(Battistelli et al., 2005). Bacterial cells not exposed to the essential oils were fixed and observed similarly as a control.

2.7 Fluorescent staining method

Cells exposed to single essential oils and the combination of oils for 15 and 30 min were stained with SYTO9 and PI from the LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's instructions. Double staining with PI and SYTO9 was performed by incubating the samples with 1.50 μ M PI and 250.5 nM SYTO9 at room temperature for 15 min. One aliquot of the bacterial suspension was exposed to isopropyl alcohol (700 mL/L) for 1 h to permeabilise the cell membranes; these cells were used as a positive control for cell death. Bacterial cells not exposed to the essential oils were tested similarly as a negative control. The samples were observed using a Leica SPII AOBS at the excitation/emission wave lengths for these dyes of 480/500 nm for SYTO 9 stain and 490/635 nm for propidium iodide (Leonard et al., 2010; Otto et al., 2010). The images collected were analysed with Lite 2.0 software, and the percentages of cells stained with PI (damaged cells) and SYTO9 (viable cells) were determined by direct cell counting in the red and green channels. SYTO9 stains all cells fluorescent green, whereas PI penetrates only those cells whose cell membranes have been damaged, staining them red.

2.8 Statistical analysis

All assays were done in triplicate in two independent experiments. The results were expressed as means $\pm$ standard error (SE). Statistical analyses were performed using the Sigma stat 3.1 program (Azerêdo et al., 2011). ANOVA and Tukey's test were used, and a p -value < 0.01 was considered significant.

3. Results

3.1. Time-kill assays

The addition of single essential oils or a combination of the oils at sub-inhibitory concentration to the growth media caused significant decreases ($p < 0.01$) in the bacterial counts over the evaluated intervals in comparison to the controls (Fig. 1). Incubation of bacteria with the OV (1.25 $\mu\text{L/mL}$) and RO (20 $\mu\text{L/mL}$) essential oils caused significant decreases ($p < 0.05$) in the bacterial viability in a time-dependent manner. Viable cell counts lower than two log cycles were found for *L. monocytogenes* exposed to the essential oils from OV after 4 h, and no viable cells were detected at the remaining time points. Values lower than two log cycles were found for bacteria exposed to the RO essential oil alone and to the OV/RO mixture after 24 and 12 h of exposure, respectively.

3.2. Effects of essential oils on the consumption of glucose and the release of cellular material

The amount of glucose in the broth containing no essential oils progressively decreased (fast consumption) over the incubation period (Fig. 2). Amounts of glucose close to the added amounts were found over the assessed period in the broths to which the essential oils had been added, suggesting that glucose consumption by *L. monocytogenes* was affected by exposure to essential oils in a time-dependent manner. The DO values of bacterial cultures exposed to the essential oils revealed an increase over time in the release of 260-nm-absorbing material ($p < 0.01$) (Fig. 3).

3.3. Ultrastructural assays

Ultrastructural analyses of *L. monocytogenes* exposed to single essential oils from OV and RO and a combination of these oils revealed drastic morphological changes, including shrinkage and condensation of the cytoplasmic content, and detachment of the cell wall from the plasma membrane. These effects were observed in the first three hours of incubation (Figs. 4C and 4E-2H). Moreover, some bacteria were destroyed, and their cell walls were disrupted, resulting in leakage of intracellular material, especially in the cultures treated with OV and OV/RO (Figs. 4E-2H). Interestingly, the rupture of the cell walls occurred preferentially at the site of the cell septum in dividing cells (Fig. 4F). No bacteria were observed after 6 h of cultivation in the presence of OV or OV/RO, indicating that these treatments effectively destroyed *L. monocytogenes* cells (data not shown). Control groups presented high bacterial population densities (Fig. 4A), homogeneous electron-dense cytoplasm, and thick and dense cell walls that were strongly associated with their plasma membranes, with no space between them (Fig. 4A and B), throughout the cultivation period. Scanning electron microscopy analysis of the control (Fig. 5a-b) and treated cells (Figs 5c-h) corroborated the deleterious effects of the OV, RO and OV/RO essential oils on the cell wall of *L. monocytogenes*. Treatment of bacteria with essential oils induced the appearance of cell debris, and damaged or ruptured cells were commonly seen in all analysed samples (Fig. 5c-h). Some cells exposed to the essential oils also presented roughened cell walls and increased volumes compared with control cells (Fig. 5a-b). Again, the harmful effects of the essential oils were more pronounced in cells treated with OV and OV/RO than those treated with RO.

3.4. Confocal scanning laser microscopy

Control cells presented a bright green fluorescence indicative of viable and intact cells throughout the incubation period. Red-stained cells (about 2 per field), which probably corresponded to senescent bacteria, were occasionally seen in the control cultures. Exposure to the

essential oils resulted in a significant change in this profile. The cells treated with essential oil from RO presented a gradual shift in the fluorescence signal from green (live cells) to red (dead cells) (Fig. 6C and D). Conversely, all bacteria exposed to essential oil from OV exhibited red fluorescence, indicative of diminished membrane integrity (Fig. 6E and F). Cells exposed to OV/RO exhibited a fluorescence profile similar to cells exposed to RO alone after 15 min. However, after 30 min of exposure to OV/RO, all of the cells turned red (Fig. 6G and H). All of the cells treated with isopropyl alcohol were PI positive.

4. Discussion

The discovery of natural antimicrobial compounds sufficiently safe for use in or on foods is a relevant issue. Scientific interest in the biological properties of essential oils and their constituents has increased markedly, and a number of active components in these oils have been identified. We have previously demonstrated that carvacrol (66.9 g/100 g) is the main constituent of the essential oil of OV assayed in this study, followed by *p*-cymene (13.9 g/100 g) and γ -terpinene (7.8 g/100 g) (Azerêdo et al., 2011). The antibacterial activity of carvacrol has been long known. Due to its hydrophobic nature, the presence of a free hydroxyl group and a delocalised electron system, the carvacrol molecule may interfere with the structural and functional properties of bacterial membranes, which in turn become increasingly permeable to protons, ultimately leading to the loss of integrity. Carvacrol has also been shown to inhibit ATPase (Nostro et al., 2009). We also have previously identified 1,8-cineole (32.2 g/100 g), camphor (15.2 g/100 g), α -pinene (14.2 g/100 g), camphene (8.2 g/100 g), β -pinene (7 g/100 g) and limonene (5.6 g/100 g) as the main constituents of the essential oil of RO used in this study (Azerêdo et al., 2011). It has been reported that some constituents of essential oils, such as the monoterpenes pinene, limonene, and 1,8-cineole, found in higher amounts in RO, and carvacrol, the main constituent of OV, are

responsible for the antibacterial effects of these oils, particularly against *L. monocytogenes* (Barros et al., 2009; Lis-Balchin and Deans, 1997; Mourey and Canillac, 2002; Nostro et al., 2002, 2009).

L. monocytogenes exposed to the essential oils of OV and RO singly or in combination at sub-inhibitory concentrations (OV/RO) showed a decrease in glucose consumption over time. These findings could indicate an inhibition of either glucose uptake or the glucose metabolic pathway. Disturbances in glucose utilisation could be related to the inhibition of enzymes involved in glycolysis, resulting in the inhibition of the tricarboxylic acid cycle (Gill and Holley, 2004).

The loss of 260-nm-absorbing material indicates major changes in the cytoplasmic membrane of *L. monocytogenes* when exposed to the essential oils of OV and RO either singly or in combination at sub-inhibitory concentrations. Marked leakage of cytoplasmic material is indicative of drastic and irreversible damage to the cytoplasmic membrane, and of the loss of various substances, such as ions, ATP, nucleic acids and amino acids (Cox et al., 1998; Souza et al., 2010).

To better visualise the morphological changes induced in *L. monocytogenes* cells by exposure to essential oils, scanning and transmission electron microscopy were utilised. Our results confirm the deleterious effects of essential oils on the cell walls and/or the plasma membranes of bacteria. Due to their lipophilic nature, the essential oils may accumulate in cell membranes, causing diminished integrity and the leakage of vital intracellular constituents (Bakkali et al., 2008; Carson et al., 2002; Cowan, 1999), as observed in this study. Cells treated with essential oils displayed severe injuries in their cell walls, and most of them were ruptured at the time of analysis by scanning and transmission electron microscopy. An interesting finding was that the rupture of the cell wall usually occurred near the septum of dividing cells, indicating that the bacteria were more susceptible to treatment with essential oils during cell division.

Because treatment with essential oils induced significant ultrastructural changes within three hours and the complete destruction of most bacterial cells after 6 h, the viability and permeability

of treated cells was further investigated to determine if the same effects could be produced in a shorter incubation time. The cells were treated with essential oils for 15 or 30 minutes, and cell viability was investigated by confocal scanning laser microscopy using a fluorescent staining method. The incubation of cells with single essential oils and a combination of essential oils at sub-inhibitory concentration rapidly killed the bacteria. Within 15 minutes of incubation, the majority of cells treated with the essential oils of RO or OV/RO were red, whereas all of the cells treated with the essential oil of OV were PI positive in both assessed intervals. These data corroborate the observation that treatment with the tested essential oils alone and in combination at sub-inhibitory concentrations leads to the loss of integrity in both the cell wall and cell membrane, causing cell death even after short incubation times.

According to the results presented herein, the essential oils of OV and RO, either singly or in combination at sub-inhibitory concentrations strongly inhibit the growth of *L. monocytogenes*. This antimicrobial property is due to cell wall degradation, membrane damage and the impairment of some enzymatic step of cell metabolism leading to the inhibition of glucose uptake. Essential oils from OV or RO, either singly or in combination at sub-inhibitory concentrations, could be applied to food products, particularly minimally processed vegetables, to prevent the growth of *L. monocytogenes*.

5 References

Azerêdo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C.N., 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 Res Intern. 44, 1541-1558.

- Barros, J.C., Conceição, M.L., Gomes Neto, N.J., Costa, A.C.V., Siqueira Júnior, J.P., Basílio Júnior, I.D., 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 Sci Tech. 42, 1139-1143.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem Toxicol. 46,446-475.
- Battistelli, M., De Sanctis, R., De Bellis, R., Cucchiari, L., Dacha, M., Gobi, P., 2005. *Rhodiola rosea* as antioxidant in red blood cells: ultrastructural and hemolytic behavior. Eur J Histochem. 49, 243–254.
- Bento, R. A., Stamford, T.L.M., Stamford, T.C.M., Andrade, S.A.C., Souza, E.L., 2010. Sensory evaluation and inhibition of *Listeria monocytogenes* in bovine pâté added of chitosan from *Mucor rouxii*. LWT - Food Sci Tech. 44, 588-591.
- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., Abram, M., 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. Food Chem. 127, 1821-1827.
- Carson, C.F., Mee, B.J. Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of *Malaleuca artemisia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob Agent Chemother. 46, 1914-1920.
- Cowan, M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 12, 564-582.
- Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djeral, M., Roncalés, P., 2011. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. Food Cont. 22, 1046-105.
- Cox, S.D., Gustafson, J.E., Mann, C.M., Markhan, J.L., Liew, Y.C., Hartlnd, R.P., Bell, H.C., Warmington, J.R., Wyllie, S.G., 1998. Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology 26, 355–358.

- Dimirtiević, S.I., Mihajlovski, K.R., Antonović, D.G., Milanović-Stevanović, M.R., Mijin, D.Z., 2007. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. Food Chem. 74, 774–782.
- Gandhi, M., Chikindas, M. L., 2007 *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. Int J Food Microbiol. 113, 1-15.
- Gill, A.O., Holley, R.A., 2004. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. Appl Environ Microbiol. 70, 5750-5755.
- Leonard, C.M., Virijevic, S., Regnier, T., Combrinck, S., 2010. Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. South Afr J Bot. 76, 676–680.
- Lis-Balchin, M., Deans, S.G., 1997. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. J Appl Microbiol. 82, 759-762.
- Martins. E.A., Germano, P.M.L., 2011. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. Food Cont. 22, 297-302.
- Mourey, A., Canillac, N., 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. Food Cont. 13, 289-292.
- Muñoz, M., Guevara, L., Palop, A., Tabera, J., Fernández, P.S., 2009. Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. LWT-Food Sci. Technol. 42, 220-227.
- Naveena, B.M., Muthukumar, M., Sen, A.R., Babji, Y. Murthy, T.R.K., 2006 Improvement of shelf-life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. Meat Scie. 74, 409–415.

- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J., 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Cont.* 20, 157-160.
- Nostro, A., Cannatelli, M.A., Musolino, A.D., Procopio, F. Alonzo, V., 2002. *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol.* 35, 181-184.
- Nostro, A., Marino, A., Blanco, A.R., Cellini, L., Di Giulio, M., Pizzimenti, F., Roccaro, A.S. Bisignano, G., 2009. In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 791–797.
- 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. *Int J Food Microbiol.* 137, 308-311.
- 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., 2008. Differential requirements for IKKa and IKKb in the terminal differentiation of primary human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism.* 58, 227–239.
- Otto, C. C., Cunningham, T.M., Hansen, M.R., Haydel, S.E., 2010. 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*, 9, 26.
- Paul, S., Dubey, R.C., Maheswari, D.K., Kang, S.C., 2011. *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. *Food Cont.* 22, 725-731.

- Ponce, A.G., Roura, S.I., Del Valle, C.E., Moreira, M.R., 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plants extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Posth Biol Tech.* 49, 294-300.
- Sheen, S., Hwang, C-A., Juneja, V.K., 2011. Modeling the impact of chlorine on the behavior of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. *Food Microbiol.* 28, 1095-1100.
- Souza, E.L., Barros, J.C., Oliveira, C.E.V., Conceição, M.L., 2010. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol.* 137, 308–311.
- Souza, E.L., Barros, J.C., Conceição, M.L., Gomes Neto, N.J., Costa, A.C.V., 2009. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Braz J Microbiol.* 40, 387-393.
- Souza, E. L., Stamford, T.L.M., Lima, E.O., Trajano, V.N., 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Cont.* 18, 409-413.
- Szabo, E., Scurrah, K., Borrows, J., 2000. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. *J Appl Microbiol.* 30, 456-460.
- Tassou, C., Koutsoumanis, K., Nychas, G.J.E., 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Res Int.* 33, 273-280.

Fig. 1 Survivor curves for *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 in nutrient broth at 30°C added of *O. vulgare* (OV) and *R. officinalis* (RO) alone and in mixture (OV/RO): (+) OV – 1.25 µL/mL; (○) RO - 20 µL/mL; (▲) OV - 0.3125 µL/mL + RO - 5 µL/mL; (■) control - 0 µL/mL (detection limit of the assay: 2 log cycles/mL).

Fig. 2 Effect inhibitory on glucose consumption of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 cells by exposure to essential oils of *O. vulgare* (OV) and *R. officinalis* (RO) alone and in mixture (OV/RO). (+) OV – 1.25 µL/mL; (○) RO - 20 µL/mL; (▲) OV - 0.3125 µL/mL + RO - 5 µL/mL; (■) control - 0 µL/mL.

Fig. 3 Rate of 260-nm-absorbing material release from *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 cells by exposure to essential oils of *O. vulgare* (OV) and *R. officinalis* (RO) alone and in mixture (OV/RO). (+) OV – 1.25 µL/mL; (○) RO - 20 µL/mL; (▲) OV - 0.3125 µL/mL + RO - 5 µL/mL; (■) control - 0 µL/mL.

Fig. 4 Transmission electron microscopy of *L. monocytogenes* cells exposed to essential oils of *O. vulgare* (OV) and *R. officinalis* (RO) alone or in mixture (OV/RO) (A and B) Control cells at 3 and 6 h of cultivation, respectively; (C) Low magnification of *L. monocytogenes* culture incubated with RO for 3 h. Note the presence of ghost cells and the condensation of cytoplasm content (inset). (D) Detail of bacterial cells exposed to RO for 6 h showing the ruptured cell walls with releasing of cellular content (arrow). (E-F) General aspect of culture incubated in the presence of OV for 3 h presenting a large number of ruptured cells. Note in (F) the preferential rupture at the septum region with leakage of intracellular material. (G and H) Cells treated with the combination of RO and OV for 3 h. Bars: A, C, E and G = 1µm; B and D = 0.5 µm; F and H=0.2µm. OV – 1.25 µL/mL; RO - 20 µL/mL; OV - 0.3125 µL/mL + RO - 5 µL/mL.

Fig. 5 Scanning electron microscopy of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 cells incubated with essential oils of *O. vulgare* (OV) and *R. officinalis* (RO) alone and in mixture (OV/RO) at sub-inhibitory concentrations. (A-B) Control cells after three (A) and six hours of cultivation (B). (C-D) Cells treated with OV for 3 (C) and 6 h (D). (E-F) Cells treated with RO for 3 h. Note the presence of big holes at the bacteria surface (inset). (G-H) Cells incubated with the combination of the OV/RO essential oils. Bars: a, b, d, e, f and g = 10 μm ; c and h = 5 μm . OV – 1.25 $\mu\text{L/mL}$; RO - 20 $\mu\text{L/mL}$; OV - 0.3125 $\mu\text{L/mL}$ + RO - 5 $\mu\text{L/mL}$.

Fig. 6 - Fluorescence microscopic images of *Listeria monocytogenes* after 15 min (left column) and 30 min (right column) (A-B) control cells, (C-D) RO-treated cells, (E-F) OV-treated cells and (G-H) the combined effect of OV/RO at sub-inhibitory concentrations. The cells were stained with BacLight LIVE/DEAD viability kit. Viable cells are indicated by green fluorescence whereas cells with damaged membranes are indicated by red fluorescence. Bars: 11.9 μm . OV – 1.25 $\mu\text{L/mL}$; RO - 20 $\mu\text{L/mL}$; OV - 0.3125 $\mu\text{L/mL}$ + RO - 5 $\mu\text{L/mL}$.

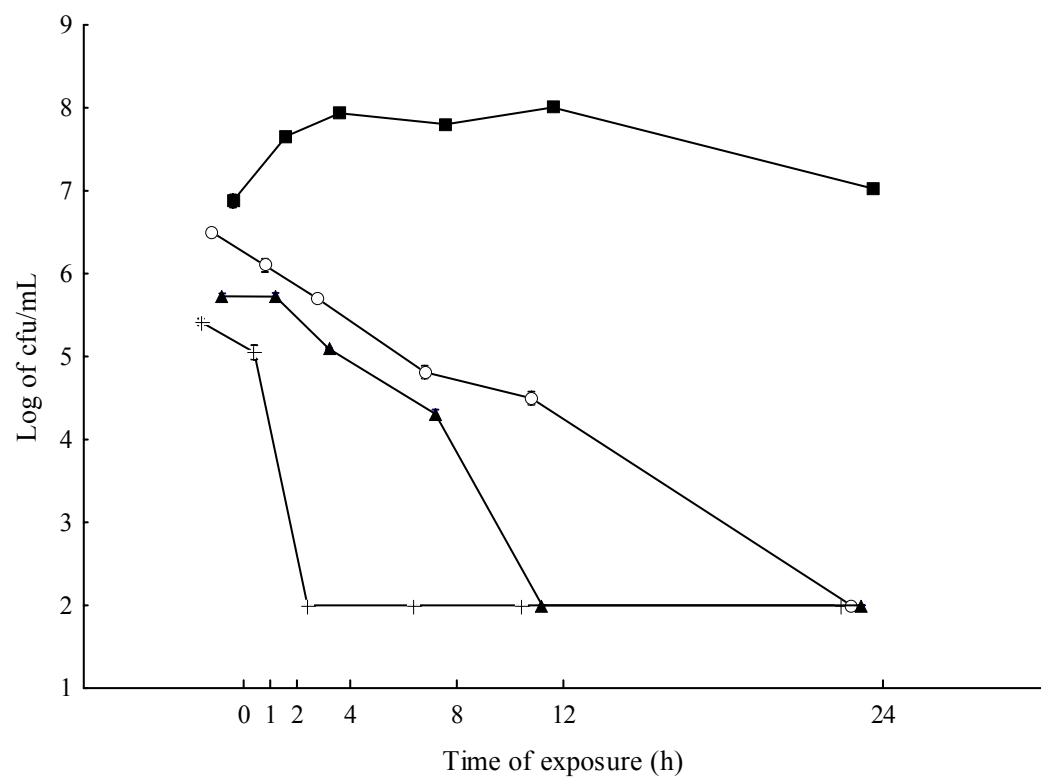


Figure 1.

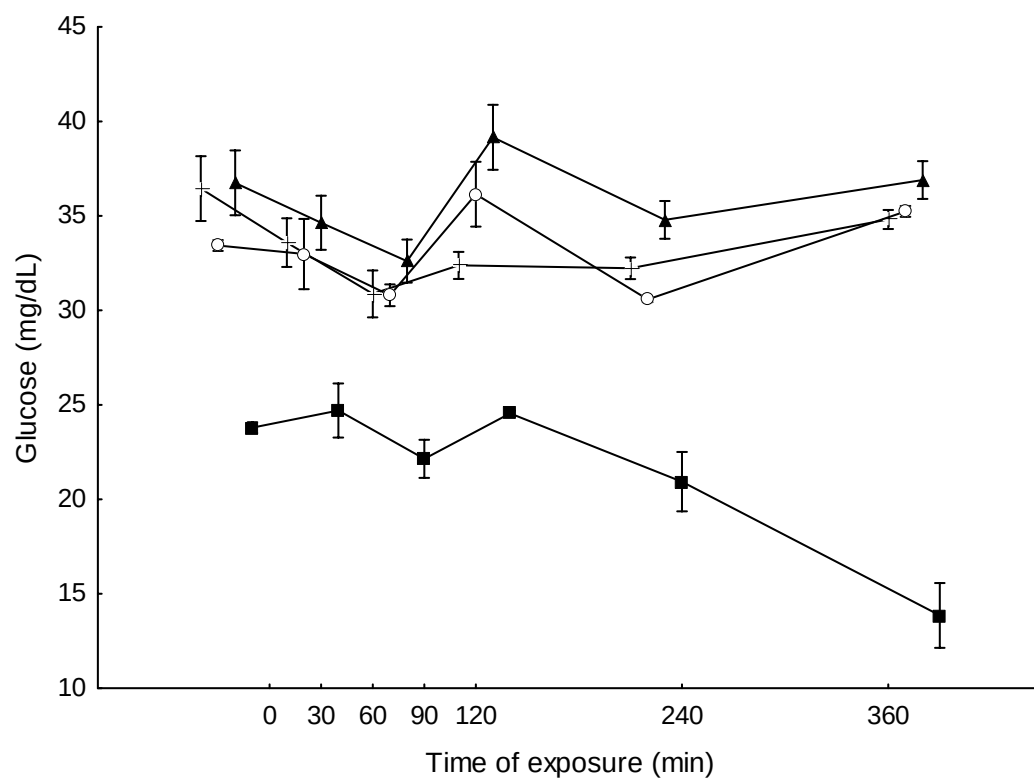


Figure. 2

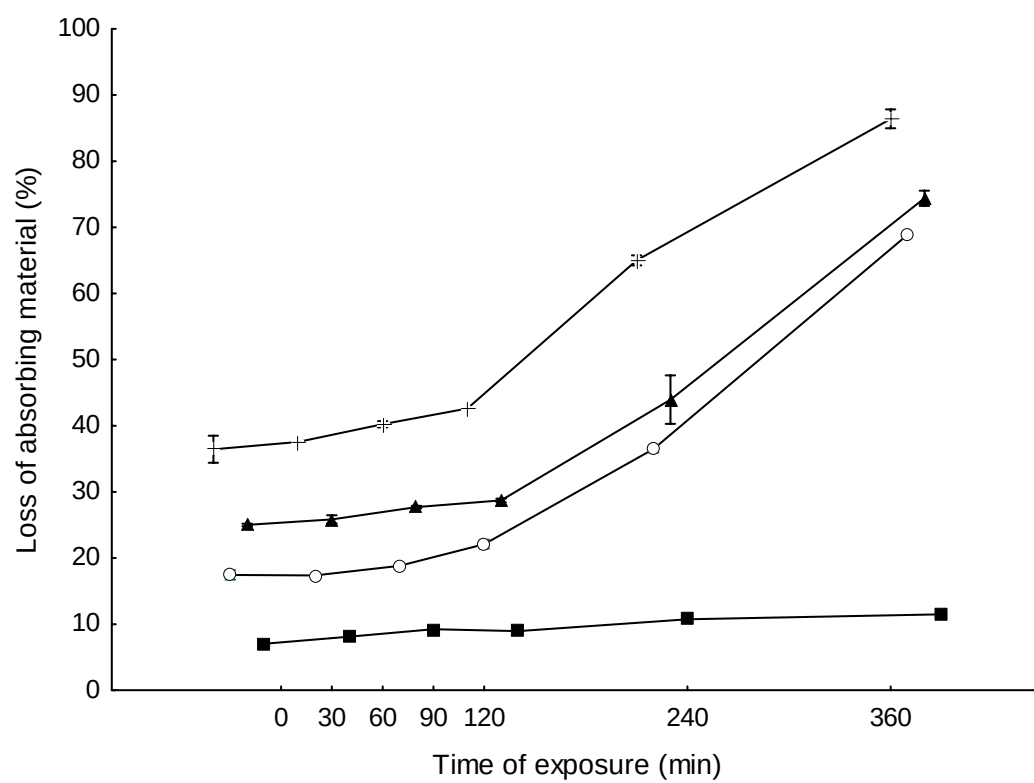


Figure. 3

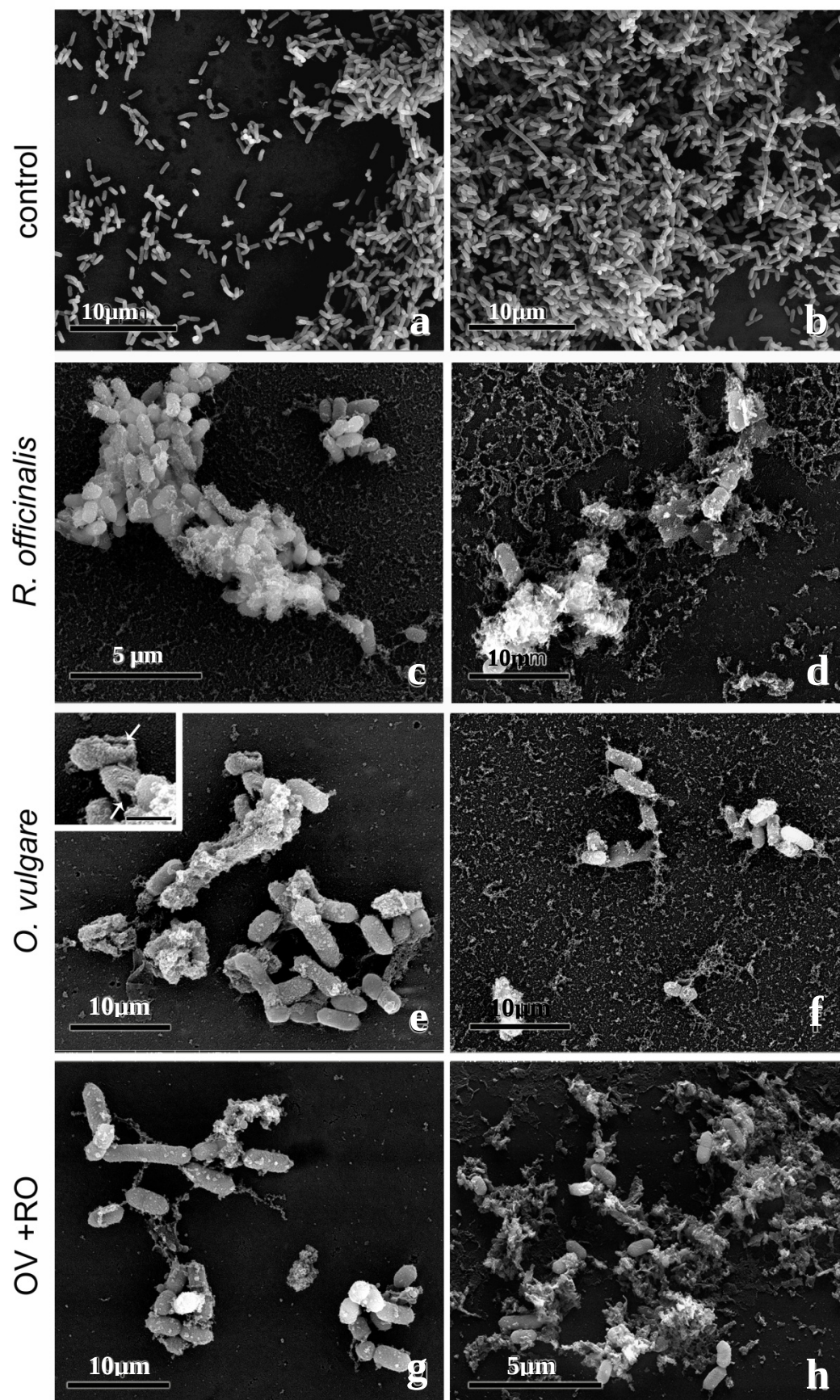


Fig 4.

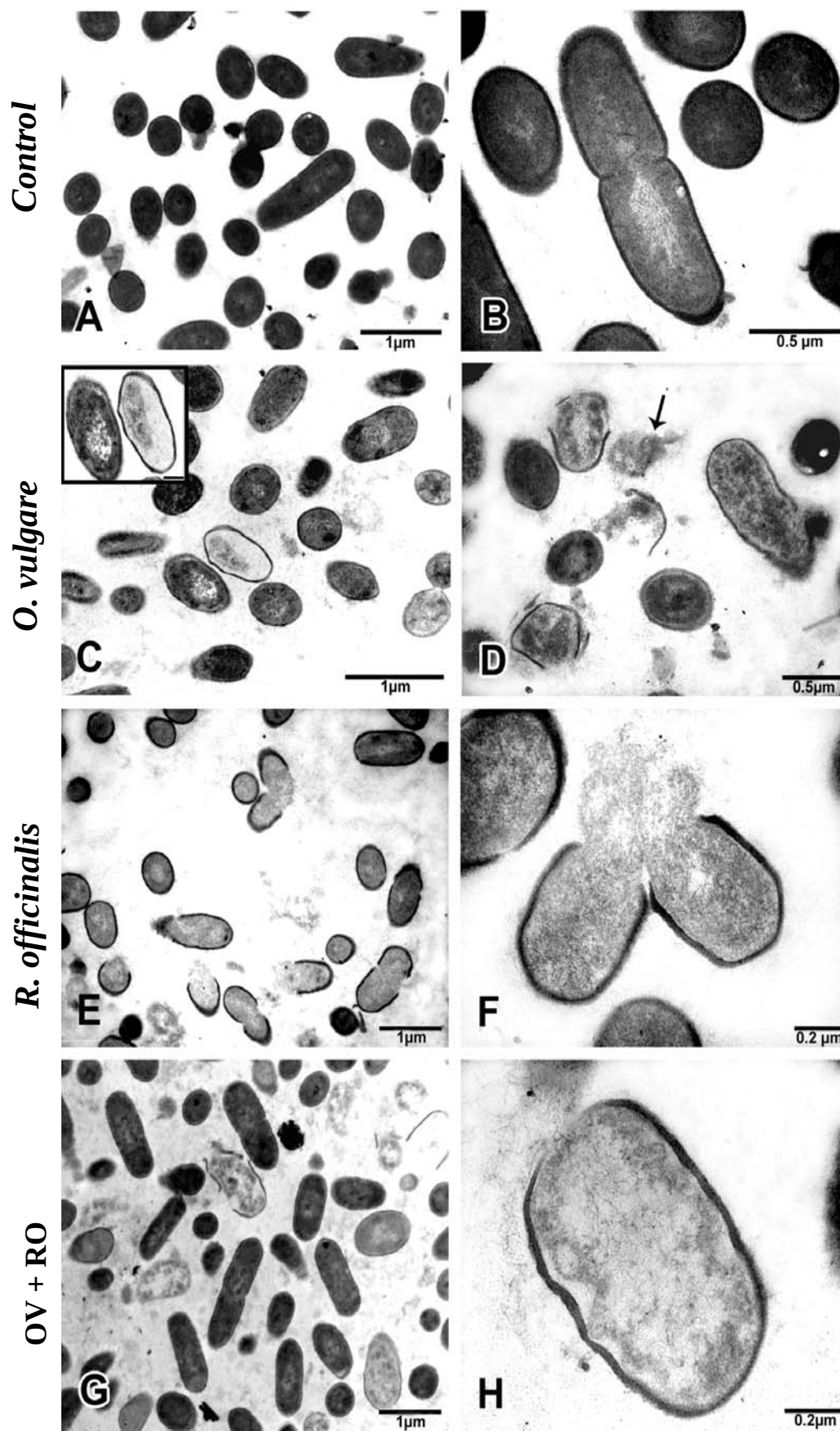


Fig 5.

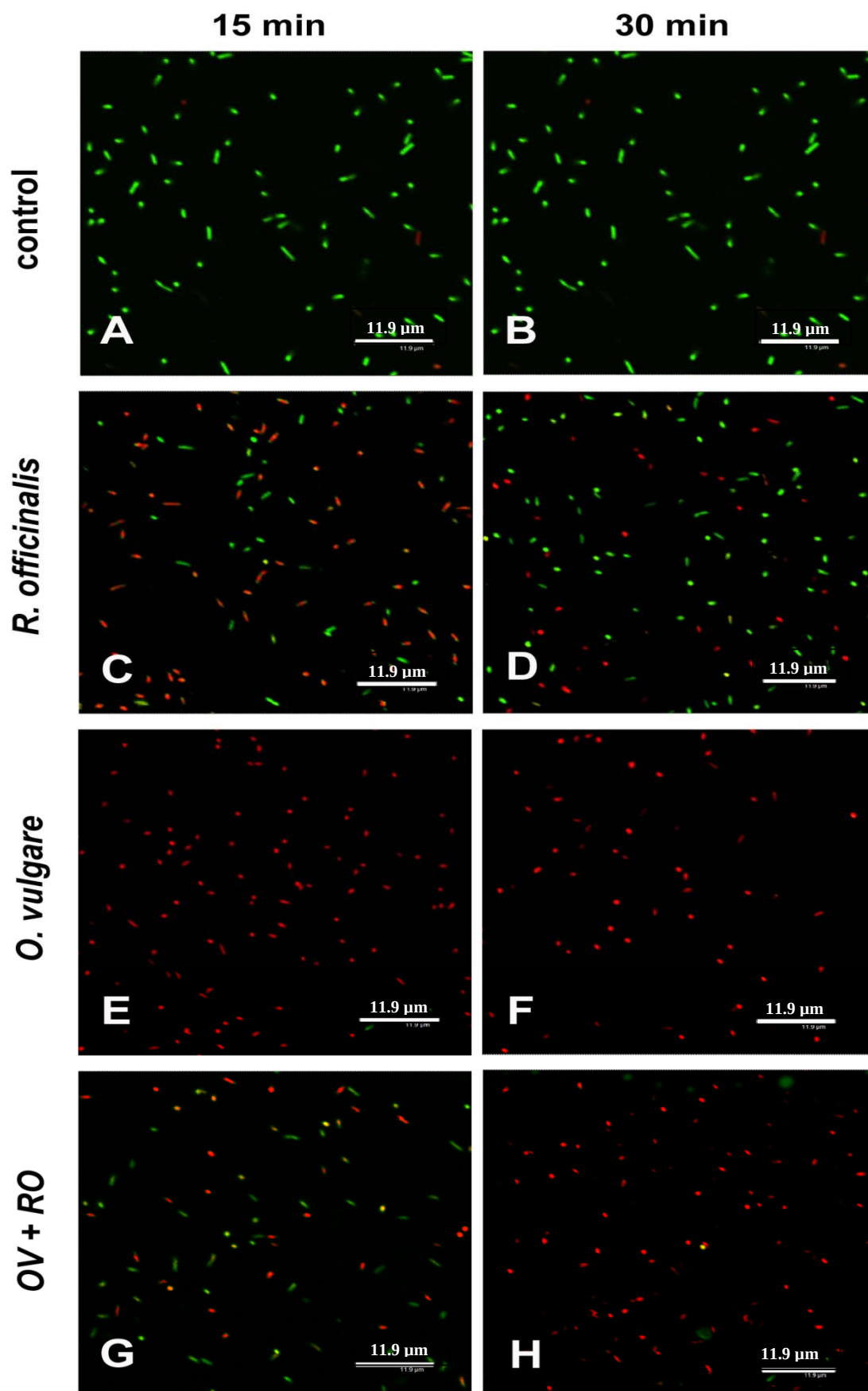


Fig 6.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme os resultados obtidos, pode-se afirmar que os óleos essenciais de orégano (*O. vulgare* L.) e alecrim (*R. officinalis* L.) apresentam o potencial de serem aplicados na sanitização de hortaliças minimamente processadas, principalmente quando utilizados em combinação, em concentrações sub-inibitórias.

Essa afirmação se baseia, inicialmente, em resultados antibacterianos, realizados tanto em ensaios *in vitro*, como diretamente nas hortaliças. A acentuada redução do crescimento de *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *P. fluorescens* e *A. hydrophila* em ensaios *in vitro* e nas hortaliças comprovou que os óleos essenciais de orégano e alecrim são efetivos contra estes micro-organismos deteriorantes e potencialmente patogênicos. Ainda, a capacidade que os óleos essenciais de orégano e alecrim tiveram de interferir sobre a microbiota natural das hortaliças, reduzindo significativamente contagens de mesófilos aeróbios, psicrotróficos e fungos, demonstra a amplitude de ação desses óleos, que vai além da verificada contra as bactérias-teste.

A comprovação dos mecanismos pelos quais os óleos essenciais de orégano e alecrim atuam para exercer sua atividade antibacteriana permitiu elucidar os estágios iniciais de danos às células bacterianas, bem como confirmar que a membrana celular é o principal alvo de ataque desses óleos essenciais. A rápida inibição da utilização de glicose como substrato oxidável sinaliza a ocorrência de distúrbios nos sistemas enzimáticos de *A. hydrophila* e *L. monocytogenes*; a liberação de constituintes citoplasmáticos de células de *A. hydrophila* e *L. monocytogenes* indica prováveis alterações na permeabilidade de suas membranas citoplasmáticas; a penetração de iodeto de propidium nas células de *L. monocytogenes* confirma os sinais de perda da permeabilidade de suas membranas celulares; e ainda, a visualização, sob microscopia eletrônica, de *A. hydrophila* e *L. monocytogenes* expostas aos óleos essenciais, permitiu constatar as drásticas alterações de superfície e ultra-estruturais sofridas pelas células bacterianas após 3 e 6 h de exposição aos óleos essenciais.

Por fim, os resultados da avaliação sensorial consolidam a tese de que os óleos essenciais de orégano e alecrim, quando utilizados em combinação, podem ser aplicados na sanitização de hortaliças minimamente processadas. Os provadores (possíveis consumidores) preferiram as hortaliças tratadas com a combinação dos dois óleos essenciais, ao invés da aplicação isolada de um deles, após 72 h de armazenamento refrigerado.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliar se os efeitos causados pelos óleos essenciais são em decorrência da diversidade de fitoconstituintes presentes ou se apenas devido à ação de seus compostos majoritários;

Investigar a ocorrência de desenvolvimento de tolerância dos microrganismos expostos aos óleos essenciais de orégano e alecrim, em concentrações sub-inibitórias;

Avaliar a interferência de outras técnicas de aplicação sobre a capacidade e amplitude de ação antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano e alecrim;

Expandir o estudo para outras matrizes alimentares, tanto de origem vegetal como animal e ainda com outros micro-organismos deteriorantes e patogênicos;

Realizar ensaios de toxicidade dos óleos essenciais de orégano e alecrim em animais e/ou com células humanas, de modo a assegurar a inocuidade à saúde quando de sua aplicação em produtos alimentícios;

Desenvolver um produto sanitizante a base de óleos essenciais de orégano e alecrim com vistas a pleitear uma possível patente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSONA, C.; VIÑAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p.121-129, 2008.

ABBASNEZHAD, H.; GRAY, M.R.; FOGHT, J.M. Two different mechanisms for adhesion of Gram-negative bacterium, *Pseudomonas fluorescens* LP6a, to an oil-water interface. **Colloids and Surfaces B**, v. 62, p.36-41, 2008.

ALBANO, S.M.; MIGUEL, M.G. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. **Industrial Crops and Products**, v.33, p.338–343, 2011.

ALTUNKAYA, A.; GÖKMEN, V. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Food Chemistry**, v.107, p.1173-1179, 2008.

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.I.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.317-324, 2008.

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, 2008a.

ARES, G.; MARTÍNEZ, 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, 2008b.

ARTÉS, F.; GÓMEZ, P.; AGUAYO, E.; ESCALONA, V.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. **Postharvest Biology and Technology**, v.51, p.287-296, 2007.

AZERÊDO, G.A.; STAMFORD, T.L.M.; NUNES, P.C.N.; GOMES-NETO, N.J.; 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.1541-1558, 2011.

BAJPAI, V.K.; BAEK, K-H.; KANG, S.C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v.xxx, p.xxx–xxx, 2011.

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

BARANAUSKIEN, R.; VENSKUTONIS, P. R.; DEWETTINCK, K.; VERHÉ, R. Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.), and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. **Food Research International**, v.39, p.413-425, 2006.

BARANOWSKI, J.D.; NAGEL, C.W. Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* by hydroxycinnamic acids and their alkyl esters. **Journal of Food Science**, v.47, p.1587–1589, 1982.

BARKER, C., PARK, S.F. Sanitization of *Listeria monocytogenes* to lowpH, organic acid, and osmotic stress by ethanol. **Applied and Environment Microbiology**, v.67, p.1594–1600, 2001.

BARROS, J.C.; CONCEIÇÃO, M.L.; NETO, N.J.G.; DA COSTA, A.C.V.; JUNIOR, J.P.S.; JUNIOR, I.B.; 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.

BATTISTELLI, M.; De SANCTIS, R.; De BELLIS, R.; CUCCHIARINI, L.; DACHA`, M.; GOBBI, P. *Rhodiola rosea* as antioxidant in red blood cells: ultrastructural and hemolytic behaviour. **European Journal of Histology**, v.49, p.243–254, 2005.

BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; ÖZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v.15, p.169–172, 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.

BENINCÁ, J.P.; DALMARCO, J.B.; PIZZOLATTI, M.G.; FRÖDE, T.S. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. **Food Chemistry**, v.124, p.468–475, 2011.

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.

BEZANSON, G.S.; MACINNIS, R.; POTTER, G.; HUGHES, T. Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p.37-42, 2008.

BOUSBIA, N.; VIAN, M.A.; FERHAT, M. A.; PETITCOLAS, E.; MEKLATI, B.Y.; CHEMAT, FARID. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. **Food Chemistry** v.114, p.355-362, 2009.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.557, p.879-7885, 2007.

Brasil, 2011. **Portal da Saúde. Doenças Transmitidas por alimentos. Situação epidemiológica**. <disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1550> (acessado em 03.10.2011).

BUBONJA-SONJE, M.; GIACOMETTI, J.; ABRAM, M. Antioxidant and anti-*Listerial* activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. **Food Chemistry**, doi:10.1016/j.foodchem. 2011.02.071, (2011).

BURNETT, S.L.; BEUCHAT, R.L. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and in difficulties in decontamination. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.25, p.281-287, 2000.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International 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 and Environmental Microbiology**, v.53, p.249-257, 1987.

CARMO, E. S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L. The potential of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.362-367, 2008.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Malaleuca artemifolia* (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.

CASTILHO, P.C.; SAVLUCHINSKE-FEIO, S.; WEINHOLD, T.S.; Gouveia, S. C. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v.23, p.552-558, 2012.

CAVA, R.; NOWAK, E.; TABOADA, A.; MARIN-INIESTA, F. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v.70, p.2757-2763, 2007.

CAVAR, S.; MAKSIMOVI, M. Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Her. **Food Control**, v.23, p.263-267, 2012.

COCOLIN, L.; COMI, G. Use of a culture-independent molecular method to study the ecology of *Yersinia* spp. in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.71– 82, 2005.

CORDANO, A.M.; JACQUET, C. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, p.176-179, 2009.

CUTTER, C.N. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. **Journal of Food Protection**, v.63, p.601–607, 2000.

DEL RIO, E.; PANIZO-MORAN, M.; PRIETO, M.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.201-207, 2007.

DELAMARE, A.P.L.; MOSCHEN-PISTORELLO, I.T.; ARTICO, L.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v.100, p.603–608, 2007.

DEMIRCI, F.; GUVEN, K.; DEMIRCI, B.; DADANDI, M.Y.; BASER, K.H.C. Antibacterial activity of two Phlomis essential oils against food pathogens. **Food Control**, v.19, p.1159–1164, 2008.

DENYER, S.P.; STEWART, G.S.A.B. Mechanisms of action of disinfectants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.41, p.261-268, 1998.

DI PASQUA, R.; MAMONE, G.; FERRANTI, P.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Changes in the proteome of *Salmonella thompson* as stress adaption to sublethal concentration of thymol. **Proteomics** v.10, p.1040-1049, 2010.

DIMITRIJEVIĆ, S.I.; MIHAJLOVSKI, K.R.; ANTONOVIC, D.G.; MILANOVIC-STEVANOVIC, M.R.; MIJIN, D.Z. A study of the synergistic anti-*Listerial* effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, v.104, p.774-782, 2007.

DJENANE, D.; YANGÜELA, J.; MONTAÑÉS, L.; DJERBAL, M.; RONCALÉS, P. Antimicrobial activity of Pistacia lentiscus and Satureja montana essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. **Food Control**, v.22, p.1046-1053, 2011.

DOMARACKY, M.; REHAK, P.; JUHAS, S.; KOPPEL, J. Effects of selected plant essential oils on the growth and development of mouse preimplantation embryos in vivo. **Physiological Research**, v.56, p.97–104, 2007.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.308–316, 2000.

ELHARIRY, H.M. Biofilm Formation by *Aeromonas hydrophila* on Green-Leafy Vegetables: Cabbage and Lettuce. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, p.125-131, 2011.

ELLS, T.C., HANSEN, L.T. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.34–42, 2006.

FAIXOVA, Z.; FAIX, S. Biological effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil. **Folia Veterinaria**, v.52, p.135-139, 2008.

FALCÃO, J. P.; DIAS, A.M.G.; CORREA, E.F.; FALCÃO, D.P. Microbiological quality of ice used to refrigerate foods. **Food Microbiology**, v.19, p.269-276, 2002.

FARÍAS, G.; BRUTTI, O.; GRAU, R.; DI LEO LIRA, P.; RETTA, D.; VAN BAREN, C.; VENTO, S.; BANDONI, A.L. Morphological, yielding and quality descriptors of four clones of *Origanum* spp. (*Lamiaceae*) from the Argentine Littoral region Germplasm bank. **Industrial Crops and Products**, v.32, p. 472–480, 2010.

FDA. **Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables**, 2008. <disponível em <http://www.fda.gov/food/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidancedocuments/prouduceandplanproducts/ucm064458.htm>> (acessado em 29/10/2011).

FIGIEL, A.; SZUMNY, A.; GUTIERREZ-ORTIZ, A.; ANGEL, A. Carbonell-Barrachina. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. **Journal of Food Engineering**, v.98, p.240–247, 2010.

FILETICI, E.M.P.; POURSHABAN, A.; FANTASIA, M. Genotypic and phenotypic characteristics of *Yersinia* spp. isolates from food and man. **Food Microbiology**, v.17, p.261– 267, 2000.

FLETCHER, M. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.2027–2030, 1988.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; KORKEALA, H. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. **FEMS immunology and medical microbiology**, v.47, p.315–329, 2006.

FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; SHI, X.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v.21, p.989-994, 2007.

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 foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.1–15, 2007.

GARCÍA-GIMENO, R.M.; SANCHEZ-POZO, M.D. AMARO-LÓPEZ, M.A.; ZURERA-COSANO, G. Behaviour of *Aeromonas hydrophila* in vegetable salads stored under modified atmosphere at 4 and 15°C. **Food Microbiology**, v.13, p.369–374, 1996.

GAVÍN, R.; MERINO, S.; ALTARRIBA, M.; CANALS, R.; SHAW, J.G.; TOMÁS, J.M. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. **FEMS Microbiology Letters**, v.224, p.77-83, 2003.

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

GOMEZ-LÓPEZ, V.M.; DEVLIEGHERE, F.; BONDUELLE, V.; DEBEVERE, J. Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.79- 89, 2005.

GOMEZ-LÓPEZ, V.M.; RAGAERT, P.; JEYACHCHANDRAN, V.; DEBEVERE, J., DEVLIEGHERE, F. Shelf-life of minimally processed lettuce and cabbage treated with gaseous chlorine dioxide and cysteine. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p. 74-83, 2008.

GONÇALVES, M.J.; CRUZ, M.T.; TAVARES, A.C.; CAVALEIRO, C.; LOPES, M.C.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L. Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. **Industrial Crops and Products**, v.35, p.166– 171, 2012.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v.116, p.982–989, 2009.

GOVARIS, A.; BOTSOGLU, E.; SERGELIDIS, D.; CHATZOPOULOU, P.S. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p.1240-1244, 2011.

GRABER, M.F.; PÉREZ-CORREA, J.R.; VERDUGO, G.; DEL VALLE, J.M. E. Agosin Spinning cone column isolation of rosemary essential oil. **Food Control**, v.21, p. 615– 619, 2010.

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.; 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, 2008a.

GUTIERREZ, J.; BOURKE, P.; LONCHAMP, J.; BARRY-RYAN, C. Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.195-202, 2008c.

GUTIERREZ, J.; RODRIGUEZ, G.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Efficacy of plant essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready to eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. **Journal of Food Protection**, v.71, p.1846-1854, 2008b.

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

HELANDER, L.M.; ALAKONI, H.L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDOHL, T.; POL, L.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3590-3595, 1998.

HERRERA, F.A.; HORTON, K.; SULIMAN, A.; BUNCHE, G.M. *Aeromonas hydrophila* infection causing delayed vascular thrombosis in a nearly amputated finger. **Journal of Hand Surgery**, v.32, p. 1058-1060, 2007.

HOLLEY, R.A.; 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.

HOOPER, L.; CASSIDY, A. A review of the health care potential of bioactive compounds. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v.86, p.1805-1813, 2006.

HOUARI, A.; DI MARTINO, P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. **Letters and Applied Microbiology**, v.45, p.652-656, 2007.

HSIEH, P.C.; MAU, J.L.; HUANG, S.H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, v.22, p.35-43, 2001.

IBUSQUIZA, P.S; HERRERA, J.J.R.; CABO, M.L. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v.28, p.418-425, 2011.

INATSU, Y.; BARI, M.L.; KAWASAK, S.; ISSHIKI, K.; KAWAMOTO, S. Efficacy of acidified sodium chlorite treatments in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on chinese cabbage. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 251-255, 2005.

Institute of Food Technologists (IFT) and FDA. **Analysis and Evaluation of Preventative Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce**, 2001. (acessado em 26/10/2011)

ISONHOOD, J. H.; DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. **Journal of Food Protection**, v.65, p.575-582, 2002.

IZUMI, M.; SATOH, T.; INUKAI, Y.; TUTUMI, Y.; NAKAYAMA, N.; KOSAKA, K.; ITOH, K. Carnosic acid and carnosol as neuroprotective electrophilic compounds. **Neuroscience Letters**, v.58, p.260-265, 2007.

JEYASEKARAN, G.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Effects of sanitizers on *Listeria* biofilm on contact surfaces. **Asian Fisheries Science**, v.13, p.209–213, 2000.

JIANG, Y.; FU, N.W.Y-J.; WANG, W. LUO, M.; ZHAO, C.-J.; ZU, Y.-G.; LIU, X.-L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental toxicology and pharmacology**, v.32 p.63–68, 2011.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **The Journal of applied bacteriology**, v.76, p.626–631, 1994.

KARPANEN, T.J.; WORTHINGTON, T.; HENDRY, E.R.; CONWAY, B.R.; LAMBERT, P. A. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1031-1036, 2008.

KIM, S-Y., KANG, D-H.; KIM, J-K.; HA, Y-G.; HWANG, Y.; KIM, T.; LEE, S-H. Antimicrobial Activity of Plant Extracts Against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on Fresh Lettuce. **Journal of Food Science**, v.76, p.41-46, 2011.

LA STORIA, A.; ERCOLINI, D.; MARINELLO, F.; DI 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.

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.

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, v.24, p.281–287, 2007.

LEE, T. S.; LEE, S.W.; YOO, M.Y.; YOON, J.W.; PARK, B.K.; MOON, K.D.; OH, D.H. Prevalence antibiotic susceptibility and virulence factors of *Yersinia enterocolitica* and related species from ready-to-eat vegetables available in Korea. **Journal of food protection**, v.67, p.1123–1127, 2004.

LEONARD, C.M.; VIRIJEVIC, S.; REGNIER, 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.

LU, Y.; WU, C. Reductions of *Salmonella enterica* on chicken breast by thymol, acetic acid, sodium dodecyl sulfate or hydrogen peroxide combinations as compared to chlorine wash. **International Journal of Food Microbiology**. In Press, Accepted Manuscript, 2011.

LUCCHESI, M.E.; CHEMAT, F.; SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydrodistillation. **Journal of Chromatography A**, v.1043, p.323–327, 2004.

LUNDEN, J.; AUTIO, T.; MARKKULA, A.; HELLSTROM, S.; KORKEALA, H. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.265–272, 2003.

LV, F.; LIANG, H.; YUAN, Q.; LI, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v.xxx, p.xxx–xxx, 2011.

MAIER, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. **Advances in applied microbiology**, v.52, p.101-121, 2003.

MACKAY, M.L., MILNE, I.M., GOULD, I.M. (2000). Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 15, 125-129.

MARTINS, E.A.; GERMANO, P.M.L. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. **Food Control**, v.22, p.297-302, 2011.

MARTINS, L.M.; MARQUEZ, R.F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.32, p.237-242, 2002.

McLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p.15-33, 2004.

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.

MENDOZA-YEPES, M.J.; SANCHEZ-HIDALGO, L.E.; MAERTENS, G.; MARININIESTA, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. **Journal of Food Safety**, v.17, p.47–55, 1997.

MEREGHETTI, L.; QUENTIN, R.; MARQUET-VAN DER MEE, N.; AUDURIER, A. Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5083–5086, 2000.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNGCHEL, S.; TOMB, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v.28 p.157-168, 1995.

MIDELET, G.; CARPENTIER, B. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p. 262-270, 2004.

MOLINOS, A.C.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B.; VALDIVIA, E.; GÁLVEZ, A. Enhanced bactericidal activity of enterocin AS-48 in combination with essential oils, natural bioactive compounds and chemical preservatives against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salad. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.2216–2223, 2009.

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

MUÑOZ, M.; GUEVARA, L.; PALOP, A.; TABERA, J.; FERNÁNDEZ, P.S. Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p. 220-227, 2009.

NAGAR, V.; RAVINDRANATH, S.; BANDEKAR, J.R. Prevalence, Characterization, and Antimicrobial Resistance of *Aeromonas* Strains from Various Retail Food Products in Mumbai, India. **Journal of Food Science**, p.486-492, v.76, 2011.

NAIDU, A. S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC press, Boca Ratton, 818p, 2000.

NAPOLI, E.M.; CURCURUTO, G.; RUBERTO, G. Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. **Biochemical Systematics and Ecology** v.38 p.659–670, 2010.

NAZER, A.I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZANA, J.–L.; DUBOISS-BRISSENETA, 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.

NIELSEN, T.H.; SORENSEN, D.; TOBIASEN, C.; ANDERSEN, J.B.; CHRSTOPHERSEN, C.; GIVSKOV, M.; SORENSEN, J. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3416-3423, 2002.

NIEUWENHUIJSEN, M.J.; TOLEDANO, M.B.; EATON, N.E.; FAWELL, J.; ELLIOTT, P. Chlorination disinfection byproducts in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. **Occupational and Environmental Medicine**, v.57, p.73-85, 2000.

NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.49, p.1-32, 1985.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A. ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A.S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.191-195, 2004.

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.

OKOH, O.O.; SADIMENKO, A.P.; AFOLAYAN, A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v.120 p.308–312, 2010.

OLIVEIRA, M.A. DE.; 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 PCR. **Food Microbiology**, v.27, p. 19–23, 2010.

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, 227–239, 2008.

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G.W.; GIBBSON, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v.65, p.3249-3254, 2004.

OTTAVIANI, D.; PARLANI, C.; CITTERIO, B.; MASINI, L.; LEONI, F.; CANONICO, C.; SABATINI, L.; BRUSCOLINI, F.; PIANETTI, A. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.538–545, 2011.

OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; PIETTE, G.J.-P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.155–162, 1997.

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.

ÖZBEK, T.; GÜLLÜCE, M.; AHIN, F.; ÖZKAN, H.; SEVSAY, S.; BARI, Ö. Investigation of the antimutagenic potentials of the methanol extract of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Turkish Journal of Biology**, v.32, p.271-276, 2008.

PALÚ, A.P.; GOMES, L.M.; MIGUEL, M.A.L.; BALASSIANO, I.T.; QUEIROZ, M.L.P.; FREITAS-ALMEIDA, A.C.; OLIVEIRA, S.S. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. **Food Microbiology**, v. 23, p. 504-509, 2006.

PALUMBO, S.A.; MORGAN, D.R.; BUCHANAN, R.L. Influence of temperature, NaCl, and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Food Science**, v.50, p.1417-1421, 1985.

PANDIT, V.A.; SHELEF, L.A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Microbiology**, v.11, p.57-63, 1994.

PENG, C.H.; SU, J.D.; CHYAU, C.C.; SUNG, T.Y.; HO, S.S.; PENG, C.C.; PENG, R.Y. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** v.71, p.2223–2232, 2007.

PÉREZ-FONS, L.; GARZN, M.T.; MICOL, V. Relationship between the Antioxidant Capacity and Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Polyphenols on Membrane Phospholipid Order. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.161–171, 2010.

PONCE, A.; ROURA, S.I.; MOREIRA, M. DEL R. Essential Oils as Biopreservatives: Different Methods for the Technological Application in Lettuce Leaves. **Journal of Food Science**, v.76, p.34-40, 2011.

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

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

RICHARDSON, S.D.; TRHUSTON Jr., A.D.; CAUGRHAN, T.V.; COLLETTE, T.W. PATTERSON, K.S.; LYKINS Jr., B.W. Chemical By-Products of chlorine and Alternative Disinfectants. **Food Technology**, v.52, p.58-61, 1998.

RÍOS, J. L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.80–84, 2005.

ROHANI, S.M.R.; MORADI, M.; MEHDIZADEH, TOORAJ.; SAEI-DEHKORDI, S.S.; GRIFFITHS, M.W. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p.2260-2265, 2011.

ROMANOVA, N.; FAVRIN, S.; GRIFFITHS, M.W. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat processing industry. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.6405–6409, 2002.

ROSA, O.O.; CARVALHO, E.P. **Características microbiológicas de frutas e hortaliças minimamente processadas**. Campinas: SBCTA, 2000.

ROSATO, A.; VITALI, C.; PIARULLI, M.; MAZZOTTA, M.; PIA, A.M.; MALLAMACI, R. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. **Phytomedicine**, v.16, p.972–975, 2009.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v.15, p.549–557, 2004.

SAKAI, T.; NAKAYAMA, A.; HASHIDA, M.; YAMAMOTO, Y.; TAKEBE, H.; IMAI, S. Outbreak of food poisoning by *Yersinia enterocolitica* serotype O8 in Nara Prefecture: The first case report in Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.58, p.257–258, 2005.

SANDASI, M.; LEONARD, C.M.; VILJOEN, A.M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v.19, p.1070–1075, 2008.

SANTOS, I.; CUNHA, I. Patógenos emergentes em alimentos. **Segurança e Qualidade Alimentar**, v. 2, p.1-6, 2007.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBÁÑEZ, 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**, v.68, p.790-705, 2005.

SATO, M.I.Z. Microrganismos patogênicos de veiculação hídrica. In: Anais do 6º Encontro Técnico Anual da ASEC. **‘Água – Recurso indispensável’**. São Paulo, 2005.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; BROOKS, J.D.; CORKE, H.. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.112–119, 2007.

SHEEN, S.; HWANG, C-A.; JUNEJA, V.K. Modeling the impact of chlorine on the behavior of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. **Food Microbiology**, v.28, p.1095-1100, 2011.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.407-413, 2009.

SHIMADA, T.; SAKAZAKI, R.; SUZUKI, K. Peritrichous flagella in mesophilic strains of *Aeromonas*. **Japanese journal of medical science & biology**, v.38, p.141-145, 1985.

SIKKEMA, J.; BONT, J.A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.59, p.201–222, 1995.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; CLETO, S.; PEREIRA, M.O.; VIEIRA, M.J. The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.335–341, 2008a.

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, 2008b.

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p.720-731, 1972.

SIVAPALASINGAN, S.; FRIEDMAN, C.R.; COHEN, L.; TAUXE, R. V. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. **Journal of Food Protection**, v.67, p.2342-2353, 2004.

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.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, v.18, n.4, p.463-470, 2001.

SOLORZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, p.1–6, 2011.

SONG, B.; LEFF, L.G. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiological Research**, v.161, p.355-361, 2006.

SORIANO, J.M.; RICO, H.; MOLTÓ, MAÑES J.C.J. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. **Food Microbiology**, v.18, p.159-163, 2001.

SOTELO-FÉLIX, J.I.; MARTINEZ-FONG, D.; MURIEL, P.; SANTILLÁN R.L.; CASTILLO, D.; YAHUACA, P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, 2002, p. 145-154, 2002.

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 and Technology**, v.48, 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.

STERN, N.J.; PIERSON, M.D.; KOTULA, A.W. Effects of pH and sodium chloride on *Yersinia enterocolitica* growth at room and refrigeration temperatures. **Journal of Food Science**, v.45, p.64–67, 1980.

SULAKVELIDZE, A. *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. **Microbes and Infection**, v.2, p.497–513, 2000.

SZABO, E.; SCURRAH, K.; BORROWS, J. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Journal of Applied Microbiology**, v. 30, p.456-460, 2000.

SZETO, Y.T.; KWOK, T.C.; BENZIE, I.F. Effects of a long-term vegetarian diet on biomarkers of antioxidant status and cardiovascular disease risk. **Nutrition**, v. 20, p. 863-866, 2004.

TASSOU, C.C.; DROSINOS, E.H. ; NYCHAS, G.J.E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4°C and 10°C. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, p.593-600, 1995.

TENNANT, S.M.; GRANT, T.H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.38, p.127-137, 2003.

TIAN, J.; HUANG, B.; LUO, X.; ZENG, H.; BAN, X.; HE, J.; WANG, Y. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v.130, p.520–527, 2012.

TIWARIT, B.K.; VALDRAMIDIS, V.P.; O' DONNELL, C.P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; BOURKE, P.; CULLEN, P.J. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.5987–6000, 2009. gei, no texto, nao tem o t nao...ta assim: TIWARI, pag 21

TO, M.S.; FAVRIN, S.; ROMANOVA, N.; GRIFFITHS, M.W. Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.5258–5264, 2002.

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.

TYAGI, A.K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food Control**, v.22, p.1707-1714, 2011.

UKUKU, D.O.; FETT, W.F. Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe. **Journal of Food Protection**, v.65, p.1093–1099, 2002.

ÜNDEGER, U.A.; BASARAN, G.H.; DEGEN, N.B. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.2037–2043, 2009.

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.

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.

VAN VUUREN, S.F.; SULIMAN, S.; VILJOEN, A.M. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.440-446, 2009.

VELÁZQUEZ, L. DEL C.; BARBINI, N.B.; ESCUDERO, M.E.; ESTRADA, C.L.; GUZMÁN, A.M.S. de. Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. **Food Control**, v.20, p.262–268, 2009.

VIUDA-MARTOS, M.; NAVAJAS, Y.R.; ZAPATA, E.S.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, p.13-19, 2009.

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.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2675-2679, 2000.

WEERAKKODY, N. S.; CAFFIN, N.; TURNER, M.S.; DYKES, G.A. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. **Food Control**, v.21, p.1408–1414, 2010.

WHO, Food safety and foodborne illness, 2007. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/> Food safety and foodborne illness
Fact sheet N°237 Reviewed March (acessado em 13/08/2009).

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S.S.; MALYEA, R.; BOOR, K. J.
Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* sp. isolated from milk.
Applied and Environmental Microbiology, v. 66, p.2085-2095, 2000.

WONG, S.; STREET, D.; DELGADO, S.I.; KLONTZ, K.C. Recalls of foods and
cosmetics due to microbial contamination reported to the use U.S. Food and Drug
Administration. **Journal of Food Protection**, v.63, p.1113-1116, 2000.

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., 2007.
Postharvest Biology and Technology, 45, 126-133.

YANISHLIEVA, N.; MARINOVA, E.; POKORNÝ, J. Natural antioxidants from herbs
and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.108, p.776–793,
2006.

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.

--- APÊNDICE

Termo do Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa busca informações acerca da sanitização de hortaliças minimamente processadas com óleos essenciais e vem sendo desenvolvida por Geíza Alves de Azerêdo, aluna da Pós-graduação em Nutrição (Doutorado) pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob a orientação dos professores doutores Tânia Lúcia Montenegro Stamford – UFPE e Evandro Leite de Souza - UFPB.

Objetivo do estudo:

Avaliar o potencial de aplicação dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. 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 a 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) Geíza Alves de Azerêdo.

Telefone: (83) 8891-1197

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Participante

Nome: _____

Idade: _____

E-mail: _____ Escolaridade: _____

Data: _____

Teste de Aceitação e Intenção de compra

Você está recebendo 04 amostras codificadas de hortaliças minimamente processadas com óleos essenciais. Prove-as da esquerda para direita, avalie sensorialmente as amostras de acordo com cada atributo nos quadros e escreva o valor da escala que você considera correspondente à amostra (código) no que diz respeito aos atributos avaliados. Antes de cada avaliação, você deverá fazer uso da água.

5 – gostei muitíssimo

4 – gostei moderadamente

3 – nem gostei/nem desgostei

2 – desgostei moderadamente

1 – desgostei muitíssimo

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Código)			
Aparência				
Textura				
Sabor				
Aroma				
Avaliação Global				

5 – nenhum

3 – moderado

1 – severo

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Código)			
Escurecimento geral				
Escurecimento das bordas				

Agora indique sua atitude ao encontrar estas hortaliças no mercado.

5 – certamente compraria

4 – possivelmente compraria

3 – talvez comprasse/ talvez não comprasse

2 – possivelmente não compraria

1 – certamente não compraria

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Código)			
Intenção de Compra				

Comentários _____

ANEXOS



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 028/2009 - CEP/CCS

Recife, 10 de Fevereiro de 2009

Registro do SISNEP FR - 226706

CAAE - 0352.0.172.000-08

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 360/08

Título: "Potencial de aplicação do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. como sanitizante natural em hortaliças minimamente processadas"

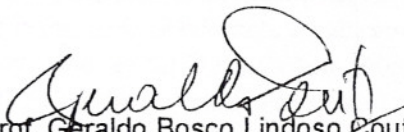
Pesquisador Responsável: Geíza Alves de Azerêdo

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 10 de fevereiro de 2009.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A

Profa. Geíza Alves de Azerêdo
Dep. de Nutrição – CCSUFPE

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

Assunto: Foodborne Pathogens and Disease - Decision on Manuscript ID
FPD-2011-1047.R2

De: soliver@utk.edu

Data: Qui, Novembro 24, 2011 10:10 pm

Para: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

24-Nov-2011

Dear Dr. de Souza:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "THE CYTOTOXIC EFFECT OF ESSENTIAL OILS FROM *Origanum vulgare* L. AND/OR *Rosmarinus officinalis* L. ON *Aeromonas hydrophila*" in its current form for publication in Foodborne Pathogens and Disease.

Please be sure to cite this article to ensure maximum exposure of your work.

The Copyright Agreement form attached to this email should be sent to the publisher as soon as possible. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright.

Please fax the Copyright Agreement form to 914-740-2101.

If preferred, the form may be filled out electronically and submitted via email to copyrightforms@liebertpub.com.

Consider Liebert Open Option to have your paper made Free Online immediately upon publication for a one-time fee. If the paper has NIH funding, it will also be uploaded onto PubMedCentral on behalf of the author. Benefits of Liebert Open Option include: fast track publication; email message highlighting the article; increased readers, citations, and downloads; and an identifying icon in the table of contents if published in print. Subsequent accepted papers are eligible for a reduced fee for Open Option. Please contact Karen Ballen at kballen@liebertpub.com or at (914) 740-2194 for more information.

If your institution is not currently subscribing to this journal, please ensure that your colleagues have access to your work by recommending this title (http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib_rec_form.pdf) to your Librarian.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Foodborne Pathogens and Disease, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Stephen Oliver

Editor-in-Chief, Foodborne Pathogens and Disease

soliver@utk.edu

Assunto: [Fwd: A manuscript number has been assigned: JMIC-D-11-00227]
De: Evandro Leite de Souza (evandroleitesouza@ccs.ufpb.br)
Para: geazeredo@yahoo.com.br;
Data: Segunda-feira, 17 de Outubro de 2011 13:52

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

Assunto: A manuscript number has been assigned: JMIC-D-11-00227
De: "Filip Braet" <filip.braet@sydney.edu.au>
Data: Ter, Outubro 11, 2011 5:23 pm
Para: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Ms. Ref. No.: JMIC-D-11-00227

Title: *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* singly and combined at sub-inhibitory concentrations cause similar changes in membrane permeability and morphology of *Listeria monocytogenes*
Micron

Dear Dr. Evandro Leite de Souza,

Your submission entitled "*Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* singly and combined at sub-inhibitory concentrations cause similar changes in membrane permeability and morphology of *Listeria monocytogenes*" has been assigned the following manuscript number: JMIC-D-11-00227.

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/jmic/>.

Your username is: ELeite de Souza-282

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

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

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Filip C Braet, Ph.D.
Receiving Editor
Micron

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.

Evandro Leite de Souza, PhD
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição - UFPB
Laboratório de Microbiologia de Alimentos

<http://br.mg4.mail.yahoo.com/neo/launch?.rand=8r0t8jronirs2>

6/12/2011