



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
NUTRIÇÃO

RHAYANE IDALYNE CARVALHO

INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES DA MATRIZ
ALIMENTAR E DO pH DO MEIO SOBRE O EFEITO
INIBITÓRIO DO CARVACROL FRENTE *Salmonella*
***Typhimurium* PT4 E *Escherichia coli* O157H:7**

JOÃO PESSOA – PB

2017

RHAYANE IDALYNE CARVALHO

**INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES DA MATRIZ
ALIMENTAR E DO pH DO MEIO SOBRE O EFEITO
INIBITÓRIO DO CARVACROL FRENTE *Salmonella*
Typhimurium PT4 E *Escherichia coli* O157H:7**

JOÃO PESSOA – PB

2017

RHAYANE IDALYNE CARVALHO

**INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES DA MATRIZ
ALIMENTAR E DO pH DO MEIO SOBRE O EFEITO
INIBITÓRIO DO CARVACROL FRENTE *Salmonella***

Typhimurium PT4 E *Escherichia coli* O157H:7

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

ORIENTADOR: Prof. ^a Dra. Marciane Magnani

JOÃO PESSOA – PB

2017

C331i Carvalho, Rhayane Idalyne.

Influência dos componentes da matriz alimentar e do pH do meio sobre o efeito inibitório do carvacrol frente *Salmonella Typhimurium* PT4 e *Escherichia coli* 0157H:7 / Rhayane Idalyne Carvalho. - João Pessoa, 2017.

70 f.: il. -

Orientadora: Marciane Magnani.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/ CCS

1. Nutrição. 2. Salmonella. 3. Escherichia coli.
4. Carvacrol. 5. Eficácia antimicrobiana. I. Título.

RHAYANE IDALYNE CARVALHO

**INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES DA MATRIZ ALIMENTAR E DO pH DO
MEIO SOBRE O EFEITO INIBITÓRIO DO CARVACROL FRENTE *Salmonella***

***Typhimurium* PT4 E *Escherichia coli* O157H:7**

Dissertação _____ em ____ / ____ / 2017

BANCA EXAMINADORA



**Profa. Dra. Marciane Magnani – DEA/ CT/ UFPB
Coordenador da Banca Examinadora**



**Prof. Dr. Evandro Leite de Souza – DN/ CCS/ UFPB
Examinador Interno**

**Profa. Dra. Mônica Tejo Cavalcanti – UATA/ CCTA/ UFCG
Examinador Externo**

**Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino – DN/ CCS/ UFPB
Examinador Suplente Interno**

**Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira – UAS/ CES/ UFCG
Examinador Suplente Externo**

Ao meu pai, André,

Exemplo de determinação e força de vontade.

A minha mãe, Rosário,

*Por tudo que representa em minha vida, razão da minha existência e
personificação dos mais tenros sentimentos.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu inefável amor e compaixão, concedendo-me sabedoria e discernimento para chegar até aqui.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em particular ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN), pela oportunidade e infraestrutura fornecidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A minha querida orientadora, professora Dr.^a Marciane Magnani, por todos os ensinamentos dados e momentos compartilhados. Tê-la como orientadora foi peça chave em minha formação. Muitíssimo obrigada pela oportunidade de trabalharmos lado a lado!

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições, professora Dr.^a Mônica Tejo e, em especial, ao professor Dr. Evandro Leite de Souza, pela disponibilização da estrutura laboratorial durante a realização de parte deste trabalho.

A todos os familiares que torceram e se alegraram junto a mim neste momento. Em especial à minha mãe, Maria do Rosário, que esteve sempre me apoiando, vibrando a cada conquista, sendo instrumento do amor de Deus na terra. Eu te amo!

Ao meu pai, André Carvalho, que apesar de suas ausências familiares, essa vitória também o pertence, pois, se não fossem através de seus esforços cotidianos, eu não teria como me dedicar integralmente a este grau que hoje alcanço.

Ao meu noivo, Lucas Lima, por todo amor, compreensão e paciência. O desejo de formarmos uma família é o que me impulsiona a seguir em frente.

A todos os amigos que o Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos me deu, em especial Maísa Chaves, Rayssa Carvalho, Rodrigo Dutra e ao Grupo das Maravilhosas LPMA. Idalyne ama vocês.

Por fim, as minhas queridíssimas amigas que estão comigo desde sempre, Denise Leite, Edjeyse de Oliveira, Isadora Grego e Laís Carvalho. Muito obrigada por todas as palavras de carinho e incentivo.

"Nos campos da observação, o acaso só favorece os espíritos preparados".

Louis Pasteur

Carvalho R. I. **Influência dos componentes da matriz alimentar e do pH do meio sobre o efeito inibitório do carvacrol frente *Salmonella* Typhimurium PT4 e *Escherichia coli* O157H:7.** 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. Orientador: Profa. Marciane Magnani.

RESUMO

O controle do crescimento microbiano dos alimentos é alcançado, principalmente, por meio do emprego de conservantes químicos. Entretanto, tem sido relatado que estes agentes podem ser tóxicos ao homem e ao meio ambiente, e seu uso tem sido cada vez mais limitado. O carvacrol (CAR) é um monoterpene fenólico naturalmente derivado de plantas, com reconhecida atividade antimicrobiana frente patógenos de origem alimentar, tais como *Salmonella* Typhimurium PT4 e *Escherichia coli* O157H:7. A utilização do CAR como antibacteriano em alimentos tem sido considerada uma alternativa viável, devido ao seu forte efeito inibitório mesmo em baixas concentrações. Sabe-se que composição da matriz alimentar e as condições do meio podem influenciar na atividade de óleos essenciais, porém pouco é sabido sobre os efeitos dos componentes da matriz e do pH sobre a eficácia antimicrobiana do CAR. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de verificar os efeitos da concentração de proteínas (PTN) e lipídios (LIP) e do pH, bem como o efeito da interação destes parâmetros sobre a atividade inibitória do CAR frente *Salmonella* Typhimurium PT4 e *Escherichia coli* O157:H7. Para mensurar estes efeitos, a concentração inibitória mínima (CIM) do CAR, a taxa de crescimento máximo específico (μ_{max}) e a duração da fase lag (λ) das cepas teste durante exposição ao CAR foram determinadas em meios de cultivo experimentais, com concentrações distintas de PTN (4,0 g/100 mL, 6,0 g/100 mL e 8,0 g/100 mL), LIP (3,75 g/100 mL, 5,0 g/100 mL e 6,25 mL/100 mL) e diferentes valores de pH (5,0, 5,5 e 6,0). A contagem de células viáveis ao longo de 24 h, nos meios de cultivo que promoveram a maior e a menor μ_{max} , também foi avaliada. O valor da CIM do CAR contra *S. Typhimurium* PT4 e *E. coli* O157:H7, nos meios de cultivo ensaiados, foi até quatro vezes superior (4,8 ou 9,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$) àquele obtido nos ensaios com meio laboratorial (0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$). A concentração de PTN, nas condições experimentais avaliadas, não afetou ($p > 0,05$) o efeito inibitório do CAR frente as cepas teste. A eficácia antimicrobiana do CAR a 2,4 ou 4,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ frente às cepas estudadas foi afetada ($p \leq 0,05$) pela concentração de LIP e valor de pH e, principalmente, pela interação LIP-pH. O aumento da concentração de LIP em conjunto com o aumento do pH, aumentou a eficácia antibacteriana do CAR, independentemente da concentração testada (2,4 ou 4,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$). O CAR, em ambas as concentrações ensaiadas, não inibiu o crescimento de *S. Typhimurium* PT4 e *E. coli* O157:H7 nos meios de cultivo experimentais que promoveram a maior μ_{max} das cepas teste. Em contrapartida, nos meios de cultivo correspondentes a menor μ_{max} das cepas teste, o CAR apresentou efeitos bacteriostáticos contra *S. Typhimurium* PT4 e reduziu ($p \leq 0,05$) as contagens de células viáveis de *E. coli* O157:H7 ao longo do intervalo de tempo monitorado. Estes resultados mostram que a concentração de LIP, o pH e a interação da concentração de LIP com o pH podem influenciar na atividade antibacteriana do CAR frente patógenos de origem alimentar e sugerem que a concentração de CAR utilizada em matrizes alimentares deve ser cautelosamente avaliada para o alcance da eficácia antibacteriana desejada.

Palavras-chave: *Salmonella*, *Escherichia coli*, carvacrol, eficácia antimicrobiana.

Carvalho R. I. **Influence of the food matrix components and pH on inhibitory effects of carvacrol against *Salmonella* Typhimurium PT4 and *Escherichia coli* O157H:7.** 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. Orientadora: Profa. Marciane Magnani.

ABSTRACT

The control of microbial growth in food is mainly achieved through the use of chemical preservatives. However, it has been reported that these agents could be toxic to humans and the environment, and their use has been increasingly limited. Carvacrol (CAR) is a phenolic monoterpene derived from plants with recognized antimicrobial activity against foodborne pathogens, such as *Salmonella* Typhimurium PT4 and *Escherichia coli* O157H: 7. The use of CAR as antibacterial in foods has been related as a viable alternative because its strong inhibitory effect at low concentrations when compared with other phenolic compounds. It is well-known that the composition of the food matrix, as well as the environmental conditions may influence on the activity of essential oil that possess CAR as the major constituent, however, a little is known regarding the effects of the food constituents and pH on the antimicrobial efficacy of CAR. This study was performed to assess the effects of proteins (PTN), lipids (LIP) and pH, as well as the interaction of these parameters on the inhibitory activity of CAR against *S. Typhimurium* PT4 and *Escherichia coli* O157:H7. To measure these effects, the minimum inhibitory concentration (MIC) of CAR, the specific maximum growth rate (μ_{max}) and duration of the lag (λ) phase of the test strains when exposed to CAR in experimental cultivation media containing different amounts of PTN (4.0 g/100 mL, 6.0 g/100 mL and 8.0 g/100 mL) and LIP (3.75 g/100 mL, 5.0 g/100 mL and 6.25 mL/100 mL) at different pH values (5.0, 5.5 and 6.0) were determined. The viable cell counts of *S. Typhimurium* PT4 and *Escherichia coli* O157:H7 when exposed to CAR in experimental cultivation media that promoted the highest and the lowest μ_{max} were also monitored over time. MIC values of CAR against *S. Typhimurium* PT4 and *Escherichia coli* O157:H7 in the experimental cultivation media assayed was up to four-fold higher (4.8 or 9.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$) than those found in laboratory media (brain heart infusion broth (BHI) 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$). PTN concentration did not affect ($p > 0.05$) the inhibitory effects of CAR under the tested experimental conditions. The inhibitory effects of 2.4 or 4.8 of CAR $\mu\text{L}/\text{mL}$ against both test strains was affected ($p \leq 0.05$) by LIP and pH, and mostly by LIP-pH interaction. The increase in LIP amounts followed by increase in pH values enhanced the inhibitory effects of CAR regardless the tested CAR concentration (2.4 or 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$). CAR at 2.4 or 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ failed to inhibit *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157:H7 in experimental cultivation media that promoted the highest μ_{max} of test strains. In experimental cultivation media where the lowest μ_{max} values were observed, CAR showed bacteriostatic effects against *S. Typhimurium* PT4 and decreased the viable counts of *E. coli* O157:H7 over time. These results show that LIP concentration, pH and the interaction of LIP-pH could affects the of antibacterial activity CAR against foodborne pathogens, and suggest that the CAR concentration used in foods should be cautiously evaluated to achieve the expected antibacterial efficacy.

Key words: *Salmonella*, *Escherichia coli*, carvacrol, antimicrobial effectiveness

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da molécula de carvacrol 19

ARTIGO

Figure 1 - (A) Curves of surface response of μ_{max} obtained from cultivation of *S. Typhimurium* PT4 in cultivation media containing different amounts of LIP and pH values and added of 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of carvacrol (CAR); (B) Curves of surface response of μ_{max} obtained from cultivation of *S. Typhimurium* PT4 in cultivation media containing different amounts of LIP and pH values and added of 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of carvacrol..... 67

Figure 2 - (A) Curves of surface response of μ_{max} obtained from cultivation of *E. coli* O157H:7 in cultivation media containing different amounts of LIP and pH values and added of 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of carvacrol (CAR); (B) Curves of surface response of μ_{max} obtained from cultivation of *E. coli* O157H:7 in cultivation media containing different amounts of LIP and pH values and added of 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of carvacrol. 68

Figure 3 – Viable cell counts of *S. Typhimurium* PT4 in cultivations media at 37 °C during exposure to carvacrol (CAR) at (A) 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ or (B) 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$. (■) Counts in cultivation media corresponding to the highest μ_{max} (B6 or B3) without addition of CAR; (×) Counts in cultivation media corresponding to the highest μ_{max} (B6 or B3); (●) Counts of cultivation media corresponding to the lowest μ_{max} without addition of CAR (B8 or B7); (▲): Counts in cultivation media corresponding to the lowest μ_{max} (B8 or B7). Detection limit of the test: 2.0 log CFU/mL. The error bars represent the standard deviation.... 69

Figure 4 - Viable cell counts of *E. coli* O157H:7 in cultivations media at 37 °C during exposure to carvacrol (CAR) at (A) 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ or (B) 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$. (■) Counts in cultivation media corresponding to the highest μ_{max} (B3 or B2) without addition of CAR; (×) Counts in cultivation media corresponding to the highest μ_{max} (B3 or B2); (●) Counts in cultivation media corresponding to the lowest μ_{max} without addition of CAR (B7 or B8); (▲) Counts in

cultivation media corresponding to the lowest μ_{max} (B7 or B8); Detection limit of the test:
2.0 log CFU/mL. The error bars represent the standard deviation..... 70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos que determinam a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do carvacrol em meios laboratoriais sintéticos ou seus efeitos inibitórios frente microrganismos contaminantes de alimentos.....	22
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores codificados e absolutos de proteínas (X_1), lipídios (X_2) e valores de pH (X_3) utilizados em meios de cultivo experimentais para ensaios com carvacrol, seguindo planejamento experimental fatorial completo (2^3)..... 31

ARTIGO

Table 1 – Codified and absolute values of protein (PTN), lipids (LIP) and pH values used in cultivation media for assays with carvacrol (CAR) following a full factorial design (2^3), and the respective minimal inhibitory concentration (MIC) of CAR against *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157H:7..... 64

Table 2 - Maximum specific growth rate (μ_{max}) and lag phase (λ) of *S. Typhimurium* PT4 grown in cultivation media containing different concentrations of carvacrol (CAR).....65

Table 3 - Maximum specific growth rate (μ_{max}) and lag phase (λ) of *E. coli* O157H:7 grown in cultivation media containing different concentrations of carvacrol (CAR)..... 66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 CARVACROL.....	19
2.2 EFEITOS DOS COMPONENTES ALIMENTARES SOBRE A AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CONSTITUINTES DE ÓLEOS ESSENCIAIS	24
2.3 <i>Salmonella</i> Typhimurium PT4 E <i>Escherichia coli</i> O157H:7.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 CARVACROL.....	29
3.2 CEPAS TESTE E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	29
3.3 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO EXPERIMENTAIS	30
3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO CARVACROL.....	31
3.5 ESTIMATIVA DE TAXA DE CRESCIMENTO MÁXIMO ESPECÍFICO (μ_{max}) E FASE LAG (λ) DAS CEPAS TESTE DURANTE EXPOSIÇÃO AO CARVACROL.....	32
3.6 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS DAS CEPAS TESTE DURANTE EXPOSIÇÃO AO CARVACROL.....	32
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE A	43
Inhibitory effects of carvacrol against <i>Salmonella</i> Typhimurium PT4 and <i>Escherichia coli</i> O157H:7 as affected by proteins, lipids and pH or their interaction	43

1 INTRODUÇÃO

O controle do crescimento microbiano em alimentos é alcançado, principalmente, por meio do emprego de conservantes químicos. Entretanto, tem sido relatado que conservantes sintéticos podem ser tóxicos ao homem e ao meio ambiente, e seu uso em alimentos tem sido cada vez mais limitado (FALEIRO, 2011; CALO et al., 2015). Além disso, a utilização indiscriminada de agentes químicos tem sido associada ao surgimento de cepas microbianas patogênicas e deteriorantes progressivamente mais tolerantes a diferentes compostos antimicrobianos (DE SOUZA et al., 2016).

Óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de diversos constituintes, que apresentam amplo espectro de ação contra microrganismos contaminantes de interesse em alimentos (CALO et al., 2015). A atividade antimicrobiana destas substâncias é atribuída, especialmente, ao seu constituinte majoritário, que pode representar até 80% na sua composição química (VOON; BHAT; RUSUL, 2012; PRAKASH et al., 2015). Os OEs de *Origanum vulgare* L. (orégano; OEOV) e *O. scabrum* L. (OEOS) possuem o carvacrol (CAR) como constituinte majoritário, que tem sido reconhecido como o principal agente ativo nestes OEs frente microrganismos contaminantes de alimentos (ALIGIANNIS et al., 2001; BARROS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2017).

O CAR é um monoterpeneo fenólico que, devido a sua hidrofobicidade, atua na bicamada lipídica da membrana celular bacteriana, aumentando sua permeabilidade seletiva e causando a liberação de constituintes intracelulares vitais ou danos nos sistemas enzimáticos celulares (TURINA et al., 2006; AIT-OUAZZOU et al., 2012; AIT-OUAZZOU et al., 2013). “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA, 2013), em doses usualmente utilizadas em alimentos e bebidas, o CAR tem sido indicado como uma alternativa viável para uso em alimentos com base nas baixas concentrações necessárias para inibição bacteriana (SOUSA et al., 2012a). Ainda, é sabido que a exposição ao CAR, em concentrações subletais, não induz tolerância frente aos processos tradicionalmente empregados na conservação de alimentos, tais como aplicação de temperatura moderada, pressão osmótica e uso de ácidos orgânicos (LUZ et al., 2012a, 2012b, 2012c, 2013). Além disso, tem sido demonstrado que o CAR é capaz de inibir o crescimento de patógenos e deteriorantes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* em caldo base-carne (LUZ et al., 2012a,

2012b, 2012c, 2013, 2014a, 2014b). Entretanto, tem sido sugerido que concentrações maiores de OEs e seus constituintes seriam requeridos na matriz alimentar para atingir a mesma eficácia observada nos ensaios *in vitro* (BURT, 2004; HOLLEY; PATEL, 2005; SOUZA et al., 2016). Embora existam relatos que fatores intrínsecos e extrínsecos de uma matriz alimentar podem reduzir a bioatividade de constituintes de OEs (BURT, 2004; NEGI, 2012; PESAVENTO et al., 2015), pouco é sabido sobre a influência dos componentes da matriz na atividade antibacteriana do CAR frente patógenos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos.

Em estudos anteriores foi demonstrado que proteínas, lipídios, carboidratos e as condições do meio, tais como o pH, podem diminuir a eficiência antimicrobiana do CAR (BURT, 2004; FIROUZI et al., 2007; FRIEDLY et al., 2009; CALO, et al., 2015). Entretanto, o efeito dos componentes da matriz tem sido analisado de forma individual, não reproduzindo o ambiente da matriz alimentar, no qual as interações entre os componentes também poderiam interferir nos efeitos antimicrobianos do CAR. Ainda, os estudos que relatam a atividade antibacteriana de OEs e seus constituintes se baseiam na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em meios laboratoriais (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008) e não em sistemas que mimetizam matrizes alimentares.

Dentre os microrganismos patogênicos frequentemente envolvidos em surtos alimentares, destacam-se *S. Typhimurium* e *Escherichia coli* O157H:7 (LAMMIE; HUGHES, 2016). *S. Typhimurium* é uma bactéria amplamente disseminada na natureza, frequentemente envolvida em casos de surtos associados a alimentos de origem animal em todo o mundo. No Brasil, dentre os principais alimentos envolvidos em surtos causados por *S. Typhimurium* destacam-se carne de frango e derivados, queijos e produtos à base de ovos (KOTTWITZ et al., 2012; FERRARI et al., 2013; MELO et al., 2017). Por outro lado, *E. coli* O157H:7 vem ganhando notoriedade mundial como agente etiológico de surtos envolvendo os mais diversos tipos de alimentos (UYTTENDAELE et al., 2015; BRYAN et al., 2015). Nos Estados Unidos, no período de 2009 a 2010, dentre os surtos onde os patógenos responsáveis foram identificados, 13% foram atribuídos à *E. coli* O157:H7 enquanto no Canadá, este patógeno foi responsável por 47,5% dos surtos ocorridos entre 1998 e 2009 (BRADEN et al., 2013; CFIA 2014).

Considerando estes aspectos, o presente estudo teve como objetivo verificar a influência dos componentes da matriz alimentar e do pH sobre os efeitos inibitórios do CAR

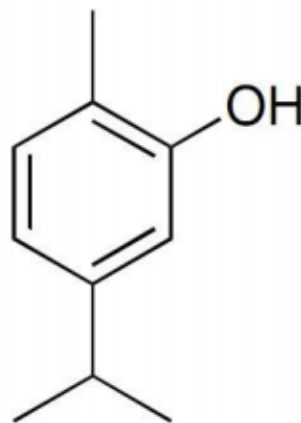
frente *S. Typhimurium* PT4 e *Escherichia coli* O157H:7. Para mensurar estes efeitos foram determinadas a CIM do CAR e estimar a taxa de crescimento máximo específico e a duração da fase lag das cepas teste em meios de cultivo experimentais, contendo diferentes quantidades de proteínas e lipídeos e valores de pH distintos. Posteriormente, foi realizada a contagem de células viáveis das cepas teste durante a exposição ao CAR nos meios de cultivo experimentais que promoveram a maior e a menor taxa de crescimento máximo específico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARVACROL

O CAR, 2-metil-5-(1-metiletil) fenol, (Figura 1), também denominado isopropil-*o*-cresol, *p*-cimen-2-ol, 2-hidroxi-*p*-cimene, 5-isopropil-2-metilfenol ou iso-timol, possui fórmula química $C_{10}H_{14}O$ e peso molecular de $150,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Este constituinte está na categoria dos aditivos alimentares autorizados para adição direta na alimentação humana (FDA, 2013) e foi incluído pelo Conselho Europeu (*Council of Europe*) na lista de compostos que podem ser adicionados a gêneros alimentícios em níveis que variam de 2 a 25 ppm (DE VINCENZI et al., 2004). É um fenólico monoterpênóide, biosintetizado a partir do γ -terpineno e *p*-cimeno, que tem sido associado à destacável atividade antimicrobiana dos OEs de *Origanum vulgare* L e de *Origanum scabrum* L., onde se destaca como constituinte majoritário (>74,86% do total) (ALIGIANNIS et al., 2001; VALERO; SALMENRÓN, 2003).

Figura 1. Estrutura química da molécula de carvacrol.



Fonte: BAKKALI et al. (2008).

O mecanismo de ação antibacteriana do CAR está relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana, em razão da sua capacidade em dispersar-se na bicamada lipídica, alinhando-se entre as cadeias de ácidos graxos. Conseqüentemente, ocorre uma distorção e desestabilização da membrana, o que aumenta sua fluidez e resulta no incremento de sua permeabilidade passiva (DORMAN; DEANS, 2000; LAMBERT et al., 2001). Sabe-se também que a reatividade do grupo hidroxil (OH) ligado ao anel fenólico do CAR contribui para sua efetividade antibacteriana (ULTTE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002; MOREIRA et al., 2005; BEN ARFA et al., 2006).

Embora a atuação do CAR na membrana seja reconhecida como seu principal mecanismo de ação, efeitos secundários, como inibição da enzima ATPase, também tem sido considerados (GILL; HOLLEY, 2006). Oliveira et al. (2015) relataram perda de integridade da membrana em células de *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* e *P. fluorescens*, expostas à concentração de 1,25 µL/mL de CAR, durante 30 minutos. Conforme estes pesquisadores, a perda da viabilidade celular pode ter sido decorrente da interferência do CAR na síntese proteica ou na atividade enzimática das células bacterianas, como efeitos secundários das alterações na membrana. Ainda, a redução nos diâmetros das células tratadas observadas no estudo, pode ter ocorrido como consequência do vazamento do conteúdo citoplasmático, resultando em aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática (STORIA et al., 2011). Em ensaios frente *P. fluorescens*, o CAR, mesmo em concentrações subinibitórias, foi capaz de alterar a morfologia celular bacteriana, causando perda de integridade e morte celular (SOUSA et al., 2012b).

Estudos anteriores demonstraram que a exposição a concentrações subletais do CAR, em caldo base-carne, não induz tolerância direta ou cruzada frente temperatura moderada (45 °C), ácido láctico (pH 5,2) e cloreto de sódio (10 g/100 mL) em *S. aureus* e *L. monocytogenes* (LUZ et al., 2012a, 2013). Entretanto, foi demonstrado que a exposição ao CAR em caldo base-carne alterou o perfil de ácidos graxos da membrana de *S. Typhimurium*, particularmente devido a um aumento na síntese de ácidos graxos insaturados e isomerização *cis-trans* (LUZ et al., 2014b). Estes resultados são importantes do ponto de vista de aplicação em alimentos, considerando o crescente número de relatos sobre microrganismos patogênicos e deteriorantes tolerantes aos processos tradicionalmente aplicados para conservação. No Quadro 1 estão compilados alguns dos principais resultados relatados em estudos sobre o

potencial antimicrobiano do CAR, de forma isolada ou combinada, frente microrganismos contaminantes de alimentos.

A aplicação de CAR em combinação com outros tratamentos para a conservação de alimentos também tem sido proposta como uma alternativa para a indústria de alimentos. Efeitos inibitórios foram observados quando o CAR foi combinado com alta pressão hidrostática (HHP) em leite semi-desnatado, artificialmente contaminado com *L. monocytogenes* (KARATZAS et al., 2001). Morente et al. (2010) relataram inibição de *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *B. cereus* e *S. aureus* após 24 h de exposição ao CAR em combinação com 2-nitro-1-propanol em farinha de milho.

Apesar dos diversos relatos sobre a efetividade do CAR na inibição de bactérias contaminantes em alimentos, o conhecimento sobre a influência dos componentes da matriz alimentar e/ou fatores associados, (e.g. pH) na atividade deste composto fenólico ainda é escasso.

Quadro 1 – Estudos que determinam a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do carvacrol em meios laboratoriais sintéticos ou seus efeitos inibitórios frente microrganismos contaminantes de alimentos.

Microrganismos alvos	CIM	Resultados	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,25 µL/mL	A combinação de CAR e timol em concentrações subinibitórias causou diminuição na contagem de <i>S. aureus</i> em caldo base-carne.	OLIVEIRA et al., 2010.
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,62 µL/mL	A exposição a concentrações subletais de CAR em meio base-carne não induziu tolerância direta ou cruzada à temperatura (45 °C), ácido láctico (pH 5,2) e cloreto de sódio (5 g/100 mL) em <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644.	LUZ et al., 2012a.
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1,25 µL/mL	A exposição a concentrações subletais de CAR em meio base-carne não induziu tolerância direta ou cruzada à temperatura (45 °C), ácido láctico (pH 5,2) e cloreto de sódio (5 g/100 mL) em <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028.	LUZ et al., 2012b.
<i>L. monocytogenes</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>	0,6 µL/mL	O efeito sinérgico do CAR e 1,8- cineol, em concentrações subinibitórias, foi eficaz em inibir o crescimento e a sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 e <i>A. hydrophila</i> INCQS 7966 em caldo vegetal.	SOUSA et al., 2012a.
<i>S. aureus</i>	2,5 µL/mL	A exposição a concentrações subletais de CAR em meio base-carne e carne não induziu tolerância direta ou cruzada à temperatura (45 °C), ácido láctico (pH 5,2) e cloreto de sódio (5 g/100 mL) em <i>S. aureus</i> ATCC 6538.	LUZ et al., 2013.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,6 µL/mL	A exposição a concentrações subletais de CAR em meio base-carne e carne não induziu tolerância direta ou cruzada à temperatura (45 °C), ácido láctico (pH 5,2) e cloreto de sódio (5 g/100 mL) em <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 .	LUZ et al., 2014a.
<i>S. Typhimurium</i>	1,25 µL/mL	A exposição de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 a concentrações subletais de CAR causaram um aumento da síntese de ácidos graxos insaturados combinados da membrana e isomerização <i>cis-trans</i> .	LUZ et al., 2014b.

Quadro 1 – Continuação.

<i>L. monocytogenes</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>P. fluorescens</i> (inóculo misto)	1,25 µL/mL	A exposição ao CAR em combinação com o 1,8-cineol causou alteração na permeabilidade da membrana e na superfície das células de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644, <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 e <i>P. fluorescens</i> ATCC 11253 ensaiadas em inóculo misto.	OLIVEIRA, et al., 2015.
<i>Aspergillus flavus</i>	10 µL/mL	A aplicação combinada de quitosana e CAR inibiu o crescimento de <i>A. flavus</i> URM 4550 em tomates-cereja artificialmente contaminados.	SOUZA et al., 2015.
<i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i>	512 µg/mL	Timol e CAR aplicados em combinação causaram aumento n suscetibilidade de <i>B. cereus</i> ATCC 11778 e <i>E. coli</i> ATCC 35218 para tetraciclina e cloreto de benzalcônio por meio de inibição da bomba de efluxo.	MILADI et al., 2016.
<i>S. Typhimurium</i>	128 µg/mL	A aplicação de CAR, timol e eugenol, em combinação, induziu alterações morfológicas na superfície celular de e aumentou a susceptibilidade de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 1408 aos antibióticos, supostamente pela inibição de bombas de efluxo.	MILADI; ZMANTAR; KOUIDHI, 2017.
<i>S. aureus</i>	2,5 µL/mL	CAR inibiu a formação de biofilme sobre superfícies de aço-inoxidável em <i>S. aureus</i> isolados de superfícies de processamento de alimentos.	RODRIGUES et al., 2017.

2.2 EFEITOS DOS COMPONENTES ALIMENTARES SOBRE A AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CONSTITUINTES DE ÓLEOS ESSENCIAIS

A eficácia antimicrobiana de OEs e seus constituintes esta condicionadas ao tamanho do inóculo do microrganismo alvo, composição do substrato, bem como das condições de processamento e armazenamento de alimentos (SOUZA et al., 2006). Estudos relatam que as concentrações requeridas para se obter eficácia antibacteriana de compostos naturais, quando aplicados em matrizes alimentares, são, geralmente, superiores àquelas empregadas nos ensaios que utilizam meio laboratorial (FIROUZI et al., 2007; PERRICONE et al., 2015). Estes relatos têm motivado a realização de estudos em matrizes alimentares ou em caldos base-alimento, onde comumente tem sido observado que a atividade antimicrobiana dos componentes bioativos de OEs pode ser afetada pela composição do alimento. (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008, 2009; CALO, et al, 2015).

A redução da atividade antimicrobiana dos constituintes de OEs em alimentos é frequentemente atribuída à influência das gorduras, carboidratos, proteínas, sais e pH do meio (BURT, 2004). Segundo Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008), os componentes da matriz alimentar podem proteger as bactérias contra a ação dos OEs. Ainda, a maior disponibilidade de nutrientes poderia contribuir para um rápido reparo de células injuriadas nestes substratos, se comparada aos meios laboratoriais (CARVALHO et al., 2015; SOUZA et al., 2016).

Alguns pesquisadores têm avaliado os efeitos dos componentes alimentares de forma isolada sobre a efetividade de OEs e constituintes. De modo geral, tem sido proposto que a presença de altas concentrações de proteína facilita a dissolução dos constituintes de OEs devido, por exemplo, às propriedades hidrofóbicas de aminoácidos presentes em peptonas (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008). Adicionalmente, sabe-se que proteínas podem se ligar a compostos voláteis aromatizantes, o que explicaria a interação fitoconstituente-proteína (BARANAUSKIEN et al., 2006). No que se refere a carboidratos, tem sido sugerido que a eficácia dos OEs e seus fitoconstituintes não é afetada por estes componentes (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

Singh et al. (2003) observaram que o OETV foi capaz de reduzir as contagens de *L. monocytogenes* em salsichas tipo *hot-dog* de baixo teor de gordura, enquanto que uma menor efetividade foi observada para a mesma concentração do OE testado em salsichas tipo *hot-dog*

“full-fat”. Com base nos resultados, foi sugerido que os lipídeos poderiam ter um efeito negativo sobre a atividade do OETV. Em outro estudo, Cava et al. (2007) constataram que a atividade antimicrobiana dos OEs de canela (*Cinnamomum zeylanicum* B.) e cravo (*Syzygium aromaticum* L.) frente *L. monocytogenes* foi reduzida em amostras de leite integral quando comparado em leite desnatado. Ainda, com relação aos possíveis efeitos dos lipídeos sobre a ação de OEs e seus constituintes, Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (2001) observaram que os OEs de louro, canela e tomilho foram menos eficazes em inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em queijos com alta concentração de gordura do que em queijos de baixo teor lipídico.

O pH da matriz também tem sido citado como um fator importância sobre a atividade antimicrobiana de constituintes de OEs. Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008) demonstraram que a atividade antimicrobiana do OEOV e OETV frente *L. monocytogenes* foi maior em pH 5,0, sendo observado um aumento da fase lag, acompanhado de redução da taxa de crescimento máximo específico das cepas testadas, em comparação a valores de pH entre 6,0 e 7,0. Conforme alguns relatos, a susceptibilidade das bactérias aos OEs e seus constituintes pode aumentar em valores de pH ácidos, uma vez que a hidrofobicidade dos OEs aumenta, o que, conseqüentemente, facilita a dissolução dessas substâncias nos lipídeos da membrana celular das bactérias alvo (JUVEN et al., 1994; BURT, 2004; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009).

Embora existam resultados indicativos dos efeitos dos componentes individuais da matriz sobre os constituintes de OEs, cada componente ou variável tem sido analisada de forma individual. Até o presente momento não foram descritos os efeitos das interações destes componentes sobre a atividade do CAR frente patógenos de origem alimentar considerados relevantes para a indústria de alimentos, a exemplo de *S. Typhimurium* PT4 e *E.coli* O157H:7, detectados frequentemente em diversas matrizes para as quais a adição do CAR é proposta.

2.3 *Salmonella* Typhimurium E *Escherichia coli* O157H:7

Bactérias do gênero *Salmonella*, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, mesófilos, sendo a maioria móvel por meio de flagelos peritríquios (WAN NORHANA et al., 2010). O gênero *Salmonella* é classificado atualmente em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* inclui os sorovares patogênicos para o homem sendo dividida em seis subespécies: *S. enterica*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. salamae*, *S. houtenae* e *S. indica*; enquanto a *S. bongori* é dividida em 20 subespécies. As espécies e subespécies são classificadas em sorotipos ou sorovares. Existem mais de 2.500 sorovares de *S. enterica* e a distribuição ubíqua desses sorovares possibilita a sua disseminação por diferentes vias, incluindo os alimentos. Porém, a eliminação intermitente de *S. enterica* nas fezes de animais constitui a principal fonte de contaminação dos alimentos (SU; CHIU, 2007). Dentre os patógenos transmitidos por alimentos, *Salmonella* é o patógeno que causa o maior número de internações hospitalares relacionadas a surtos (CDC, 2015).

As infecções causadas por *S. enterica* têm sido associadas à ingestão de diversos alimentos contaminados, tais como queijos (FERRARI et al., 2013), manteiga de amendoim (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2012), frutas e vegetais minimamente processados (SANT'ANA; FRANCO; SCHAFFNER; 2014) e carne bovina (ROWLANDS et al., 2014). No entanto, ovos e produtos à base de carne e frango ainda são os alimentos mais frequentes envolvidos em surtos causados por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (CDC, 2015; YADAV et al., 2016). Dentre os sorovares frequentemente associados às infecções alimentares e surtos de salmonelose destacam-se *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (SILVA; DUARTE, 2002).

S. Typhimurium é amplamente disseminada na natureza e de grande importância em saúde pública por se tratar de um dos principais patógenos envolvidos em surtos de salmonelose (GUNDUZ; GONUL; KARAPINAR, 2009). Diversas espécies animais podem servir de reservatório para *S. Typhimurium*, proporcionando sua constante eliminação no meio por animais infectados assintomáticos. Assim, sua disseminação entre espécies de animais destinadas à produção de alimentos representa um grande risco de contaminação da cadeia alimentar (MARTÍN et al., 2014). Até os dias atuais, *S. Typhimurium* destaca-se entre

os sorovares mais frequentes associados a surtos de salmonelose não tifoide em humanos (FERRARI et al., 2013; BRASIL, 2015; CDC, 2015; YADAV et al., 2016).

Por sua vez, *E. coli* são bastonetes Gram-negativos, móveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, integrando um grupo diversificado de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (FENG; JINNEMAN, 2011). Atualmente, *E. coli* é classificada em patotipos, de acordo com suas características de virulência, a citar: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EHEC (*E. coli* enterohemorágica), EaggEC (*E. coli* enteroagregativa), UPEC (*E. coli* uropatogênica), NMEC (*E. coli* meningite neonatal), REDEC (*E. coli* enteropatogênica) e APEC (*E. coli* patogênica aviária) (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

E. coli O157:H7 foi identificada, pela primeira vez, como um agente patogênico humano em 1982. Pertencente ao grupo de cepas patogênicas EHEC, possui a capacidade de destruir células epiteliais e produzir uma citotoxina potente, denominada de toxina Shiga (STEC) que causa graves doenças em humanos (SCHEUTZ et al., 2012; ERCOLI et al, 2016). *E. coli* O157:H7 é agente etiológico da síndrome hemolítica urêmica e da púrpura trombocitopenia trombótica (SANDRINI et al., 2007; SARIMEHMETOGLU et al., 2009; KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010).

Algumas características distinguem *E. coli* O157:H7 das demais cepas de *E. coli*, como o crescimento reduzido ou nulo a 44 °C, incapacidade de utilizar o sorbitol, além da não produção da enzima β -glucoronidase (FORSYTHE, 2002). Desta forma, *E. coli* O157:H7 não é detectada nas análises de coliformes fecais pelo método do número mais provável (NMP), que usa a fermentação da lactose a 44,5 °C como característica confirmativa (SILVA et al., 2003).

Bovinos têm sido identificados como o principal reservatório de *E. coli* O157:H7, uma vez que podem excretar o patógeno pelas fezes e, assim, contaminar alimentos, água e ambientes (SHERE; BARTLETT; KASPER, 1998; LAEGREID et al., 1999; CDC, 2009). A ingestão de leite cru contaminado, relacionado à presença de fezes no úbere das vacas ou dos equipamentos de ordenha, devido à contaminação cruzada, também tem sido associada a surtos envolvendo este patógeno (FARROKH et al, 2013).

Nos últimos anos, este microrganismo vem ganhando evidência mundial, associado ao seu envolvimento nos maiores surtos alimentares ocorridos em diversos países (GRIFFIN et al, 2002; ATEBA; MBEWE, 2011; LANIER et al, 2011; SCALLAN et al, 2011; CDC, 2012).

Devido ao seu elevado grau de severidade e baixa dose infectante, vem sendo considerado um dos principais patógenos alimentares da atualidade (ETCHEVERRÍA; PADOLA, 2013; FARROKH et al, 2013).

No Brasil, o primeiro relato de isolamento de cepa de *E. coli* O157:H7 ambiental ocorreu em 1997 a partir de uma amostra de água de poço na cidade de São Paulo - SP. Posteriormente, em 2001 foi diagnosticado um caso de síndrome hemolítica urêmica relacionado à *E. coli* O157:H7 veiculada por ingestão de carne mal cozida (CVE, 2013; DE PAULA et al., 2014). No Rio Grande do Sul, Loiko et al. (2013) identificaram *E. coli* O157:H7 em amostras de carne bovina processada e, recentemente, Rodrigues et al. (2014) isolaram *E. coli* O157:H7 em água de irrigação e de lavagem de alfaces orgânicas em uma propriedade do estado do Rio Grande do Sul.

Frente ao exposto, o conhecimento dos efeitos dos componentes da matriz alimentar sobre a atividade do CAR, um constituinte que tem sido proposto para aplicação em sistemas de conservação para controle de patógenos como *S. Typhimurium* PT4 e *E. coli* O157H:7, é de interesse não só da comunidade acadêmica como também da indústria de alimentos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos (Centro de Tecnologia) e Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos (Centro de Ciências da Saúde) da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa-PB.

3.1 CARVACROL

O carvacrol (CAR; lote 0656-810; densidade em 20 °C, 0,976; índice de refração em 20 °C, 1,522) foi adquirido da empresa Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). As soluções de CAR foram preparadas em caldo infusão de cérebro e coração (CICC, Himedia, Índia) com concentrações variando de 40 - 0,312 µL/mL, utilizando Tween 80 (1 mL/100 mL; Sigma Aldrich, EUA) como agente emulsionante (MONTE et al., 2014). Na maior concentração ensaiada (1 mL/100 mL), o Tween 80 não apresentou efeito inibitório frente as cepas bacterianas ensaiadas.

3.2. CEPAS TESTE E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A cepa teste *Salmonella* Typhimurium 46/99 fago-tipo (PT) 4 (*S.* Typhimurium PT4), isolada de carne de frango envolvida em surtos ocorridos no Sul do Brasil, pertencente a coleção do Laboratório Central de Curitiba (LACEN, Paraná, Brasil) foi cedida para estudo pela Professora Tereza Cristina Oliveira, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. A cepa teste *Escherichia coli* O157:H7, isolada de alimento, foi cedida para estudo pelo Prof. Anderson Sant'Ana, Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos (UNICAMP, São Paulo, Brasil). As culturas estoque das bactérias ensaiadas foram mantidas em criotubos contendo Caldo Infusão Cérebro-Coração (CICC, Himedia, Índia) adicionado de

glicerol (20 mL/100 mL), armazenados a - 80 °C. As culturas de trabalho foram mantidas em ágar infusão de cérebro e coração (AICC, Himeida, Índia), a $4 \pm 0,5$ °C, transferidas semanalmente para um novo meio de cultura.

O inóculo de cada cepa foi preparado em solução salina estéril (NaCl 0,85 g/100 mL), a partir de culturas cultivadas em CICC a 37 °C, durante 18-20 horas (fase de crescimento estacionária), colhidas através de centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C), lavadas duas vezes e ressuspensas em solução salina estéril para a padronização da suspensão celular. As suspensões bacterianas foram submetidas à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) em solução salina estéril e cada diluição foi padronizada em espectrofotômetro a 625 nm mediante o valor de Densidade Óptica (DO_{625}), utilizando-se solução salina como branco. Para a determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) em cada leitura, foram semeados 0,1 mL de cada diluição e, posteriormente, incubadas a 37 °C por 24 horas. Após incubação, as placas contendo o crescimento bacteriano foram submetidas à contagem do número de colônias formadas. Com o número de colônias obtido e corrigindo-se a respectiva diluição, correlacionou-se a contagem bacteriana (UFC/ mL) à leitura da DO_{625} . A DO de 0,08 e 0,09 proporcionou contagens de células viáveis de aproximadamente 6 log UFC/mL para *S. Typhimurium* PT4 e *E. coli* O157H:7, respectivamente (MELO et al., 2017).

3.3 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO EXPERIMENTAIS

Os efeitos das proteínas (PTN), lipídios (LIP) e pH, e/ou suas interações, sobre a atividade antibacteriana do CAR foram avaliados por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de ensaios de crescimento para determinação da μ_{max} e da λ em meios de cultivo experimentais, contendo quantidades distintas de PTN (4 g/100 mL, 6 g/100 mL e 8 g/100 mL), LIP (3,75 mL/100 mL, 5,0 mL/100 mL e 6,25 mL/100 mL) e valores de pH (5,0, 5,5 e 6,0), seguindo planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 1). O extrato de carne bovina (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e o óleo de girassol (Salada, Brasil Ltda) foram utilizados como fontes de proteínas e lipídios, respectivamente. O CICC foi primeiramente adicionado ao extrato de carne na concentração desejada e, posteriormente, esterilizado em autoclave (121 °C, 1,1 atm, durante 15 min). Subsequentemente, a quantidade correspondente

de óleo de girassol, previamente esterilizado, (121 °C, 1,1 atm, durante 15 min) foi incorporada à solução CICC-extrato de carne, homogeneizados em vórtex durante 15 segundos e, em seguida, o valor de pH foi ajustado utilizando HCl 1mol/L (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009). Os meios de cultivo foram preparados nos mesmos dias dos ensaios experimentais.

Tabela 1 – Valores codificados e absolutos de proteínas (X_1), lipídios (X_2) e valores de pH (X_3) utilizados em meios de cultivo experimentais para ensaios com carvacrol, seguindo planejamento experimental fatorial completo (2^3).

Meio	Valor codificado X_1 (PTN)	Valor absoluto (PTN g/100 mL)	Valor codificado X_2 (LIP)	Valor absoluto (LIP mL/100 mL)	Valor codificado X_3 (pH)	Valor absoluto (pH)
1	-1,00	4,00	-1,00	3,75	-1,00	5,00
2	1,00	8,00	-1,00	3,75	-1,00	5,00
3	-1,00	4,00	1,00	6,25	-1,00	5,00
4	1,00	8,00	1,00	6,25	-1,00	5,00
5	-1,00	4,00	-1,00	3,75	1,00	6,00
6	1,00	8,00	-1,00	3,75	1,00	6,00
7	-1,00	4,00	1,00	6,25	1,00	6,00
8	1,00	8,00	1,00	6,25	1,00	6,00
9	0,00	6,00	0,00	5,00	0,00	5,50
10	0,00	6,00	0,00	5,00	0,00	5,50
11	0,00	6,00	0,00	5,00	0,00	5,50

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO CARVACROL

A CIM do CAR frente às cepas teste foi determinada através do método de microdiluição previamente descrito (CLSI, 2012), com modificações relacionadas aos meios de cultura e ao tamanho do inóculo. Aproximadamente 50 μ L das soluções de CAR, com concentrações variando de 20 - 0,312 μ L/mL em CICC e 9,6 - 0,07 μ L/mL nos meios de cultivo experimentais, foram distribuídas em cada poço de uma microplaca de 96 poços. Posteriormente, foram adicionados 50 μ L de suspensão bacteriana com, aproximadamente, 6 log UFC/mL. Paralelamente foram preparados controles na ausência do CAR. A microplaca foi envolta com filme plástico a fim de evitar a desidratação bacteriana e a volatilização do CAR. Os sistemas foram incubados a 37 °C durante 24 horas. A CIM foi definida como a

menor concentração de CAR capaz de inibir o crescimento visível de cada cepa teste (CARVALHO et al., 2015).

3.5 ESTIMATIVA DE TAXA DE CRESCIMENTO MÁXIMO ESPECÍFICO (μ_{max}) E FASE LAG (λ) DAS CEPAS TESTE DURANTE EXPOSIÇÃO AO CARVACROL

O crescimento de *S. Typhimurium* PT4 e *E. coli* O157:H7 foi monitorado nos meios de cultivo experimentais (Tabela 1), contendo 4,8 $\mu\text{L/mL}$ (1/2 CIM) e 2,4 $\mu\text{L/mL}$ (1/4 CIM) de CAR utilizando microplacas de 96 poços. Inicialmente, 50 μL de suspensão bacteriana (aproximadamente 6 log UFC/mL) foram adicionados em cada poço contendo 50 μL dos meios de cultivo experimentais. O crescimento bacteriano (absorbância à densidade óptica - DO_{625 nm}) foi monitorado em leitor/incubadora de microplacas (EON, BioTek, EUA) a 37 °C, a cada 2 horas durante 24 horas. Os controles positivos compreenderam meios de cultivo inoculados com as cepas teste, porém sem adição de CAR. Os controles negativos continham apenas meios de cultivo experimentais e CAR. Os valores de μ_{max} e de λ foram obtidos a partir da análise das curvas de crescimento utilizando o software EON-Gen5 (EON, BioTek, EUA).

3.6 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS DAS CEPAS TESTE DURANTE EXPOSIÇÃO AO CARVACROL

A contagem de células viáveis de *S. Typhimurium* PT4 e *E. coli* O157:H7 foi avaliada ao longo de 24 h de exposição ao CAR meios de cultivo selecionados com base nos valores de μ_{max} obtidos nos ensaios anteriores. As contagens viáveis de *S. Typhimurium* PT4 foram ensaiadas nos meios de cultivo 6 e 8 contendo 4,8 $\mu\text{L/mL}$ de CAR (meios que promoveram a maior e a menor μ_{max} , respectivamente nos ensaios de crescimento) e nos meios de cultivo 3 e 7 contendo 2,4 $\mu\text{L/mL}$ de CAR (meios que promoveram a maior e a menor μ_{max} , respectivamente nos ensaios de crescimento). As contagens viáveis de *E. coli* O157:H7 foram

ensaiadas nos meios de cultivo 2 e 8 contendo 4,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de CAR (meios que promoveram a maior e a menor μ_{max} , respectivamente nos ensaios de crescimento) e meios de cultivo 5 e 7 contendo 2,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de CAR (meios que promoveram a maior e a menor μ_{max} , respectivamente nos ensaios de crescimento). Para isso, 20 μL de cada suspensão bacteriana (6 log UFC/mL) foram inoculados em 3480 μL dos meios de cultivo selecionados contendo CAR nas concentrações finais desejadas. Os diferentes sistemas (contagens de células viáveis finais de, aproximadamente, 5 log UFC/ mL) foram suavemente agitados durante 30 segundos e submetidos à incubação a 37 °C durante 24 horas. Em intervalos de 0 (imediatamente após a homogeneização), 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16 e 24 horas após a incubação (tempo de exposição), uma alíquota de 100 μL de cada sistema foi diluída seriadamente em solução salina estéril, e, em seguida, 20 μL de cada diluição foram inoculados, utilizando a técnica da microgota, em placas com AICC. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, realizou-se a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Sistemas controle, sem a adição de CAR, foram ensaiados similarmente. O limite de detecção do teste foi de 2 log UFC/mL.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (repetições), sendo os resultados expressos como média (\pm desvio padrão) dos ensaios. Para os ensaios de determinação da CIM, os resultados foram expressos como valores modais, porque os valores de CIM foram os mesmos em todas as repetições (SOUZA et al., 2016). Nos ensaios de contagem de células viáveis, a análise estatística foi realizada para determinar as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) utilizando ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os resultados da taxa de crescimento máximo específico (μ_{max}) foram analisados utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR) e a qualidade do modelo foi determinada a partir do coeficiente de correlação (R^2). Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA).

REFERÊNCIAS

- AIT-OUAZZOU, A. et al. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. **Food Research International**, v. 45, n.1, p. 313-319, 2012.
- AIT-OUAZZOU, A. et al. Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices. **Food Control**, v. 32, n.1, p. 159-167, 2013.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.9, p. 4168-4170, 2001.
- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 482-492, 2012.
- ATEBA, C. N.; MBEWE, M. Detection of *E. coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications. **Research in Microbiology**, v. 162, n.3, p.240-248, 2011.
- AZERÊDO, G. A. et al. 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, n.5, p. 1541-1548, 2011.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARANAUSKIEN, R. et al. 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, n.4, p. 413-425, 2006.
- BARBOSA, I. M. et al. Inhibitory effect of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. on pathogenic bacteria contaminating vegetables. **Food Control**, v. 59, n. 1, p. 468-477, 2016.
- BARROS, J. C. et al. 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, n.6, p. 1139-1143, 2009.
- BEN ARFA, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n.2, p. 149–154, 2006.
- BRADEN, C.R.T.R.V. et al. Emerging Trends in Foodborne Diseases. **Infection Disease Clinical North America**, v. 27, n. 2, p. 517-533, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2015. Disponível em:

<<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta---o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>>. Acesso em 24 de dezembro de 2016.

BRYAN, A. et al. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. **Clinics in Laboratory Medicine**. v. 35, n. 2, p. 247-272, 2015.

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

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CARVALHO, R. J. et al. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, v. 52, p. 59-65, 2015.

CAVA, R. et al. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v. 12, n.12, p. 2757–2763, 2007.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL, USA. **Food Net 2006 surveillance report**. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC, 2009.

CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL, USA. **Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/032312/index.html>. Acesso em: 02 junho, 2012.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL, USA. **Estimates of Foodborne Illnes in the United States** (2015). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>>. Acesso em 24 de novembro de 2016.

CFIA. Targeted survey investigating bacterial pathogens and generic *E. coli* in fresh leafy green vegetables. **Food Safety Action Plan 2009-2010**. 2014.

CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Casos confirmados e coeficientes de incidência de casos autóctones de doenças de notificação compulsória no estado de São Paulo, no período de 1998 a 2008**. (2013). Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/sh_9802.htm> Acesso em 28 set 2015.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Seventh Edition M07-A7**. 2006. Wayne.

DE PAULA, C. M. D.; CASARIN, L. S.; TONDO, E. C. *Escherichia coli* O157:H7 - emerging food pathogen. **Vigilância Sanitária em Debate**, v.4, p. 23-33, 2014.

DE VICENZI, M. et al. Constituents of aromatic plants: eucalyptol. **Fitoterapia**, v. 73, n. 3, p. 269-275, 2002.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308–316, 2000.

ERCOLI, L. et al. Prevalence and characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs and pork products in Umbria and Marche regions of Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 232, n. 2, p. 7-14, 2016.

ETCHEVERRÍA, A. I.; PADOLA, N. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. **Virulence**, v. 5, n. 5, p. 366-72. 2013.

FALEIRO, M. L. The mode of antibacterial action of essential oils. **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**, v. 2, p. 1143-1156, 2011.

FARROKH, L. et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v.162, n. 2, p.190–212, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - FDA, CFSAN. US -, **Everything Added to Food in United States (EAFUS) e Carvacrol**. 2013.

FENG, P. W.; JINNEMAN, K. Bacteriological Analytical Manual on line. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Food and Drug Administration** - FDA/CFSAN. 2011.

FERRARI, R. G. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and mutations in the topoisomerase genes of *Salmonella enterica* strains from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 657-662, 2013.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, cap.4, p. 457-47, 2009.

FIROUZI, R. et al. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. **Journal of Food Protection**, v. 70, n.11, p. 2626–2630, 2007.

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

FRIEDLY, E. C. et al. *In vitro* antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, p. 67-72, 2009.

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

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, n. 1, p. 91-97, 2008.

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, n. 2, p. 142–150, 2009.

GUNDUZ, G. T.; GONUL, A. S.; KARAPINAR, M. Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella* Typhimurium on lettuce. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 513–517, 2009.

GRIFFIN, P. M.; MEAD P. S.; SIVAPALASINGAM, S. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli*. In: **Blaser M.J., Smith P.D., Ravdin J.I., Greenberg H.B., Guerrante R.L., editors. Infections of the gastrointestinal**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 627-642, 2002.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121-129, 2001.

HOLLEY, R. A.; PATEL, P. Improvement of shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273–292, 2005.

JUVEN, B. J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, n. 6, p. 626–631, 1994.

KARATZAS, A. K. et al. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 463- 469, 2001.

KARMALI, M. A.; GANNON, V.; SARGEANT, J. M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 360-370, 2010.

KIM, S. A.; RHEE, M. S. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, b-resorcylic acid, trans cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7. **Food Control**, v. 60, n. 1, p. 447-454, 2016.

KOTTWITZ, L. B. M. et al. Perfil de resistência a antimicrobianos, fagotipagem e caracterização molecular de cepas de *Salmonella* Enteritidis de origem avícola. **Semina. Ciências Agrárias** (Impresso), v. 33, n. 2, p. 705-712, 2012.

- LAEGREID, W. W.; ELDER, R. O.; KEEN, J. E. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in range beef calves at weaning. **Epidemiology and Infection**, v.123, n. 1, p.291-298, 1999.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of action of oregano essential, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n. 3, p. 91453-462, 2001.
- LANIER, W. A. et al. Outbreak of shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7 infections associated with rodeo attendance, Utah and Idaho, 2009. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n.10, 2011.
- LOIKO, M. R. **Quantificação de micro-organismos indicadores e caracterização de *Listeria spp.*, *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* O157:H7 em etapas do abate de bovinos no Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2013.
- LUZ, I. S. et al. Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 667-672, 2012a.
- LUZ, I. S. et al. Evidence for lack of acquisition of tolerance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 14, p. 5021-5024, 2012b.
- LUZ, I. S. et al. Evidence for no acquisition of tolerance in *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 5021-5024, 2012c.
- LUZ, I. S. et al. Lack of induction of direct protection or cross-protection in *Staphylococcus aureus* by sublethal concentrations of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol in a meat-based medium. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 1, p. 587-593, 2013.
- LUZ, I. S. et al. Assessment of tolerance induction by *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in *Pseudomonas aeruginosa* cultivated in a meat-based broth and in a meat model. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 2 p. 1-10, 2014a.
- LUZ, I. S. et al. Sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol cause injury and changes in membrane fatty acid of *Salmonella* Typhimurium cultivated in a meat broth. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.11, n. 4, p. 1-6, 2014b.
- MARTÍN, B. et al. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. **Food Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 119-127, 2014.
- McMAHON, M. A. S. et al. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sublethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 263-268, 2008.

MELO, A. N. F. et al. Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella* Typhimurium PT4 in chicken breast meat after exposure to sequential stresses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 251, n. 1, p. 15-23, 2017.

MILADI, H. et al. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, n. 1, p. 95-100, 2016.

MILADI, H.; ZMANTAR, T.; KOUIDHI, B. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, n. 2, p. 56-63, 2017.

MITTELSTAEDT, S. C. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 - revisão." **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**. v. 24, n. 3, p. 175-182, 2006.

MONTE, D. F. M. et al. Tolerance response of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains to habituation to *Origanum vulgare* L. essential oil. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2014.

MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce foodborne pathogen. **LWT – Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 565-570, 2005.

MORENTE, E. O. et al. Antibacterial activity of carvacrol and 2-nitro-1-propanol against single and mixed populations of foodborne pathogenic bacteria in corn flour dough. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 2, p. 274-279, 2010.

NEGI, P. S. Review e plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 7-17, 2012.

OLIVEIRA, C. E. V. et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 308-311, 2010.

OLIVEIRA, K. A. R. et al. Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. **Food Control**, v. 47, n. 1, p. 334-339, 2015.

OLSEN, S. J. M. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 49, p 1-51, 2000.

PESAVENTO, G. et al. Antibacterial activity of Oregano, *Rosmarinus* and *Thymus* essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v 54, n. 2, p. 188–199, 2015.

PERRICONE, M. et al. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 76, 2015.

- PHILLIPS, D. et al. A national survey of the microbiological quality of retail raw meats in Australia. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 1, p.1232– 1236, 2008.
- POSADA - IZQUIERDO, G. et al. Assessing the growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in spinach, lettuce, parsley and chard extracts at different storage temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1701-1710, 2016.
- PRAKASH, B. et al. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. **Food Control**, v. 47, n.1, p. 381-391, 2015.
- RODRIGUES, J. B. S. et al. Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. **Food Control**, v. 73, n. 1, p. 1237-1247, 2017.
- RODRIGUES, R. Q. et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**, v. 42, n. 3, p. 152-164, 2014.
- ROWLANDS, R. E. et al. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v. 56, n. 6, p. 461-467, 2014.
- SANDRINI, C. N. M. et al. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 175-182, 2007.
- SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SCHAFFNER, D. W. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. **Food Control**, v. 42, n. 3 p. 1-8, 2014.
- SARIMEHMETOGLU, B. et al. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 357-361, 2009.
- SCALLAN, E. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States - Unspecified Agents. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 2011.
- SCHEUTZ, F. et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping shiga toxins and standardizing stx nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2951-2963, 2012.
- SHERE, J. A.; BARTLETT, K. J.; KASPER, C. W. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farm in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p.1390-1399, 1998.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella Enteritidis* in poultry: retrospective in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 167-173, 2003.

SINGH, A. et al. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 8, p. 787–794, 2003.

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.

SOUSA, J. P. et al. Synergies of carvacrol and 1.8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 145–151, 2012a.

SOUSA, J. P. et al. Carvacrol and 1.8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 9 -13, 2012b.

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

SOUZA, E. L. et al. Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 1, p. 22-25, 2006.

SOUZA, E. L. et al. Efficacy of a coating composed of chitosan from *Mucor circinelloides* and carvacrol to control *Aspergillus flavus* and the quality of cherry tomato fruits. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 732, p. 1-9, 2015.

SOUZA, G. T. et al. Effects of the essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semihard cheese broth and slurry. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 2, p. 246-252, 2016.

STORIA, A. et al. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 164-172, 2011.

SU, L. H.; CHIU, C. H. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang gung Medical Journal**, v. 30, n. 3, p. 210-219, 2007.

TURINA, A.V. et al. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 101-113, 2006.

ULTEE, A.; BENNINK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

VALERO, M.; SALMERON, M. C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 1-2, p. 73-81, 2003.

VOON, C. H.; BHAT, R.; RUSUL, G. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 1, p. 34-55, 2012.

WAN NORHANA, M. N. et al. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. **Food Control**, v.21, n. 4, p.343-361, 2010.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163-175, 2008.

YADAV, A. S. et al. Study on Heat stress response in *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis and its impact on their attachment to dressed broiler skin surface. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 2, p. 114-121, 2016.

APÊNDICE A

Inhibitory effects of carvacrol against *Salmonella* Typhimurium PT4 and *Escherichia coli* O157H:7 as affected by proteins, lipids and pH or their interaction

Running title: Food-related parameters affect CAR antibacterial effects

Abstract

In this study, the effects of proteins (PTN), lipids (LIP) and pH or their interaction on the inhibitory activity of carvacrol (CAR) against *Salmonella* Typhimurium PT4 and *Escherichia coli* O157:H7 were assessed. The minimum inhibitory concentration (MIC) of CAR and the specific maximum growth rate (μ_{max}) and duration of the lag (λ) phase of the test pathogens when exposed to CAR in experimental cultivation media containing different amounts of PTN and LIP at different pH values were determined. The viable counts of the tested strains in experimental cultivation media that promoted the highest and lowest μ_{max} was monitored during 24 h. MIC of CAR in experimental cultivation media was up to four-fold higher (4.8 or 9.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$) than in laboratory medium (0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$). PTN did not affect the inhibitory effects of CAR. The inhibitory effects of 2.4 or 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR against both pathogens was affected by LIP and pH, but mostly by LIP-pH interaction. The increase in LIP amounts and increase in pH values enhanced the inhibitory effects of CAR. 2.4 or 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR failed to inhibit the test pathogens in experimental cultivation media where the highest μ_{max} was observed. CAR showed bacteriostatic effects against *S. Typhimurium* PT4 and decreased the counts of *E. coli* O157:H7 in experimental cultivation media where the lowest μ_{max} values were observed. These results show that the interaction of LIP and pH could affect the efficacy of CAR to inhibit foodborne pathogens in food matrices.

Key words: foodborne pathogens, phenolic, antimicrobial efficacy, food components.

1. Introduction

Synthetic antimicrobial preservatives and heat treatment are the main tools used in food industry to guarantee the safety of foods (Kim and Rhee, 2016). However, there has been an emergence of foodborne pathogens resistant to the traditional conservation processes applied in food industry (De Souza et al., 2016). Another emerging concern has been the potential harmful effects that synthetic food preservatives may impose to consumers and environment (Calo et al., 2015; Pesavento et al., 2015). These aspects has increased the demand for foods with low or without antimicrobial synthetic preservatives (Souza et al., 2016).

Carvacrol [(2-methyl-5-(1-methylethyl) fenol; CAR] is a plant-derived phenolic monoterpene well-known as the majority constituent of essential oils (EOs) from *Origanum vulgare* L. (oregano) (Rodrigues et al., 2017). CAR is also commonly identified as the majority constituent in EOs from *O. scabrum* L. (Aligiannis et al., 2001) and *Thymus vulgaris* L. (Sacchetti et al., 2005). Studies have attributed to CAR the bioactivities of these EOs, particularly their antibacterial effects against foodborne pathogens (Aligiannis et al., 2001; Perricone et al., 2015).

CAR is Generally Recognized as Safe (GRAS) by the Food and Drug Administration and currently used as a food flavoring ingredient and preservative (FDA, 2013; Suntres et al., 2015). The available literature demonstrates that CAR is capable of inhibiting foodborne pathogens in very low amounts compared to other essential oil constituents (Honório et al., 2015; De Souza et al., 2016), and does not induce direct-tolerance and cross-tolerance to

traditional antimicrobials used in foods (e.g., acids or salts) or heat treatment in spoiling (Luz et al., 2012) and pathogenic bacteria (Luz et al., 2013; Luz et al., 2014).

The food matrix composition may affect the efficacy of antimicrobials because the high availability of nutrients typically favors the fast recovery of injured bacterial cells (Burt, 2004; De Souza et al., 2016). The structural organization of the components in food matrices may also limit the contact of antimicrobials with bacterial cells affecting their efficacy (Burt et al., 2004; Carvalho et al., 2015). Consequently, higher amounts of antimicrobials could be required in food matrices to obtain the same antimicrobial effect as observed in *in vitro* assays (Perricone et al., 2015; Pesavento et al., 2015; Souza et al., 2016). Carbohydrates typically do not affect the antimicrobial effects of EOs, while the pH and protein could affect their inhibitory effects against foodborne pathogens (Burt, 2004; Calo et al., 2015). However, there is a lack of studies assessing the effects of the interaction of pH with lipids or proteins on the inhibitory effects of CAR.

Amongst the pathogens frequently involved in food-related outbreak diseases, *Salmonella* Typhimurium phage-type (PT) 4 and *Escherichia coli* O157H:7 receive attention because they have been most associated cause of outbreak-related hospitalizations in the USA (CDC, 2017). An important feature of these bacteria is the capability of growing in a wide variety of foods (e.g., fat-rich foods and protein-rich foods), as well as in acidic beverages (Espina et al., 2012; Melo et al., 2017; Moon et al., 2017).

This study evaluated the effects of proteins, lipids and pH or their interaction on the inhibitory effects of CAR on *S. Typhimurium* PT4 and *Escherichia coli* O157:H7. The minimum inhibitory concentration (MIC) of CAR and the specific maximum growth rate and lag phase duration of the test pathogens when exposed to CAR in experimental cultivation media containing different amounts of proteins, lipids and pH values were determined. The

viable counts of *S. Typhimurium* PT4 and *Escherichia coli* O157:H7 when exposed to CAR in selected experimental cultivation media were also monitored over time.

2. Material and methods

2.1 CAR

CAR (batch 0656-810; density at 20 °C: 0.976; refractive index at 20 °C: 1.522) was purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). CAR dispersions were prepared in brain heart infusion broth (BHIB; Himedia, India) in a concentration range of 40 – 0.312 µL/mL using Tween 80 (1 mL/100 mL; Sigma Aldrich, USA) as an emulsifier (Rodrigues et al., 2017). At the highest assayed concentration (1 mL/100 mL), Tween 80 presented no inhibitory effect against the tested bacterial strains.

2.2. Test strains and growth conditions

Salmonella Typhimurium phago-type (PT) 4 (*S. Typhimurium* PT4) isolated from chicken meat involved in outbreak occurred in the South of Brazil (Kottwitz et al., 2011) and *Escherichia coli* O157:H7 isolated from food sample (Posada-Izqueiro et al., 2016) were used as test strains. Stocks were maintained in cryovials at -20 °C in BHIB containing glycerol (20 mL/100mL). Working cultures were maintained in brain heart infusion agar (BHIA, Himedia, India) at 4 ± 0.5 °C, and transferred to a new medium weekly.

The inoculum of each strain was obtained after preparing suspensions in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) from cultures grown in BHIB at 37 °C for 18-20 h (stationary growth phase), harvested through centrifugation (4500 x g, 15 min, 4 °C), washed twice and re-suspended in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100mL) to obtain standard cell suspensions. Optical density of 0.08 and 0.09 at 625 nm provided viable cell counts of

approximately 6 log CFU/mL for *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157H:7, respectively (Melo et al., 2017).

2.3 Preparation of experimental cultivation media

The effect of proteins, lipids and pH or their interactions on the antibacterial effects of CAR were evaluated in experimental cultivation media containing different amounts of proteins (PTN) and lipids (LIP) and pH values following a full factorial design 2^3 (Table 1). The range of pH values and concentration of tested food ingredients were selected considering the pH and composition of various food matrices (e.g. fruit juices, fresh cheeses and meat). Beef extract (99% purity, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and sunflower oil (99% LIP, Salada®, Brazil Ltda) were used as proteins and lipids sources, respectively. The BHIB was firstly added of beef extract at the desired protein amount and sterilized in autoclave (121 °C, 1.1 atm, for 15 min). Subsequently, the corresponding amounts of sunflower oil previously sterilized (121 °C, 1.1 atm, for 15 min) were incorporated into the BHIB-beef solution, vortexed for 15 s and the pH value adjusted using HCl 1 mol/L (Gutierrez et al., 2009). The experimental cultivation media were always prepared in the same day of the experiments.

2.4 MIC determination

The MIC values of CAR against the tested strains were determined using a previously described microdilution in broth procedure (CLSI, 2012), with minor modifications related to the cultivation media and inoculum size. Initially, 50 µL of CAR emulsion in concentrations of 20 - 0.312 µL/mL in BHIB or 9.6 - 0.07 µL/mL in experimental cultivation media were dispensed into each well of a 96-well microplate. Subsequently, 50 µL of bacterial suspension (approximately 6 log CFU/mL) were added to each well. The microplate was loosely wrapped

with cling wrap to prevent CAR volatilization. Each plate included controls without CAR. The systems were incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was defined as the lowest concentration of CAR that was capable of inhibiting the visible growth of the test strain (Carvalho et al., 2015).

2.5 Assessing the maximum specific growth rate (μ_{max}) and lag phase (λ) parameters of the test strains when exposed to CAR

The growth of *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157:H7 was monitored in experimental cultivation media containing 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (1/2 MIC) or 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (1/4 MIC) of CAR in independent assays, using 96 well-microplates. Initially, 50 μL of the tested bacterial suspension (approximately 6 log CFU/mL) were added to each well containing 50 μL of the tested experimental cultivation media. The bacterial growth (absorbance at 625 nm optical density) was monitored in a microplate reader/incubator (EON, BioTek, USA) at 37 °C each 2 h-intervals during 24 h. Positive controls comprised the experimental cultivation media inoculated with the test strains without CAR. Negative controls contained CAR and experimental cultivation media without the test strain. The μ_{max} and the λ values were obtained from the analysis of the growth curves using the EON-Gen5 software (EON, BioTek, USA).

2.6 Assessing viable counts of the test strains during exposure to CAR on selected experimental cultivation media

The viable counts of *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157:H7 was assessed during 24 h of incubation at 37 °C in experimental cultivation media that provided the highest and the lowest μ_{max} values. Viable counts of *S. Typhimurium* PT4 were assayed in experimental

cultivation media 6 and 8 containing 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR and cultivation media 3 and 7 containing 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR. Viable counts of *E. coli* O157:H7 were assayed in cultivation media 2 and 8 containing 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR and cultivation media 5 and 7 containing 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR (Table 1). Initially, 20 μL of each bacterial suspension (approximately 6 log CFU/mL) were inoculated into 3480 μL of the selected experimental cultivation media containing CAR. The mixtures (final viable cell counts of approximately 5 log CFU/mL) were gently hand-shaken for 30 s and subsequently incubated at 37 °C. At intervals of 0 (just after homogenization), 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16 and 24 h of cultivation, a 100 μL -aliquot of each mixture was serially diluted in sterile saline solution, inoculated using a microdrop inoculation technique (Herigstad et al., 2001) on BHIA and incubated at 37 °C for 24 h. Control cultivation media without CAR were similarly assayed. The results are expressed as log CFU/mL. The detection limit of the test was 2 log CFU/mL.

2.7 Statistical analysis and reproducibility

All assays were performed in triplicate in three independent experiments and the results are expressed as an average of the obtained data. For MIC determination assays, the results are expressed as modal values because the MIC values did not varied in the independent experiments (Souza et al., 2016). For the μ_{max} , λ and viable counts assays, statistical analysis were performed to determine significant differences ($p \leq 0.05$) using ANOVA followed by Tukey's test or Student *t* test. The results of μ_{max} were analyzed using response surface methodology (RSM) and the quality of the generated model was determined from the correlation coefficient (R^2). All analysis were performed using the Statistica software version 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

3. Results

3.1 MIC of CAR in different cultivation media

The MIC of CAR on *S. Typhimurium* and *E. coli* O157:H7 in BHIB was 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The MIC of CAR on *S. Typhimurium* PT4 was 9.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in all experimental cultivation media. The MIC of CAR on *E. coli* O157:H7 in experimental cultivation media was 4.8 or 9.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Table 1).

3.2 μ_{max} and λ of the test strains exposed to CAR

The μ_{max} of *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157:H7 was always higher ($p \leq 0.05$) in experimental cultivation media containing 4.8 or 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR than in experimental cultivation media without CAR (Table 3 and 4). The lowest μ_{max} of *S. Typhimurium* PT4 (-1.44) and *E. coli* O157:H7 (-2.17) exposed to 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR was observed in experimental cultivation medium containing the highest amount of PTN (8 g/100 mL) and LIP (6.25 mL/100mL) at pH 6.0 (cultivation medium 8). *S. Typhimurium* PT4 (-1.29) and *E. coli* O157:H7 (-0.82) showed the lowest μ_{max} when exposed to 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR in experimental cultivation medium containing 4 g/100 mL of PTN and 6.25 mL/100 mL of LIP at pH 6.0 (cultivation medium 7).

The highest μ_{max} of *S. Typhimurium* PT4 (4.63) exposed to 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR was observed in experimental cultivation medium containing 8 g/100mL of PTN and 3.75 mL/100mL of LIP at pH 6.0 (cultivation medium 6). The highest μ_{max} of *E. coli* O157:H7 (2.85) exposed to 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR was also observed in experimental cultivation medium containing 8 g/100mL of PTN and 3.75 mL/100mL of LIP but at pH 5.0 (cultivation medium 2). The highest μ_{max} of *S. Typhimurium* PT4 (2.39) exposed to 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR was observed in experimental cultivation medium containing 4 g/100 mL of PTN and 6.25

mL/100mL of LIP at pH 5.0 (cultivation medium 3). Otherwise, when exposed to 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR, *E. coli* O157:H7 showed the highest μ_{max} (3.45) in experimental cultivation medium containing 4 g/100 mL of PTN and 3.75 mL/100 mL of LIP at pH 6.0 (cultivation medium 5).

The adjusted equations Eq. 1 and Eq. 2 explain the effects of LIP and/or pH as well as of their interaction on the μ_{max} of *S. Typhimurium* PT4 obtained in assays using 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (ST4.8) and 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (ST2.4) of CAR, respectively. Similarly, the adjusted Eq. 3 and Eq. 4 explain the effects of LIP and pH as well as of their interaction on the μ_{max} of *E. coli* O157:H7 in assays using 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Ec4.8) and 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Ec2.4) of CAR, respectively. The determination coefficient (R^2) of all models showed a good fit to the experimental data.

$$Y_{\mu_{max}}(ST4.8) = 2.4 - 1.92 X_2 - 2.01 X_2 \cdot X_3 \quad (R^2 = 0.89) \quad \text{Eq. 1}$$

$$Y_{\mu_{max}}(ST2.4) = 1.32 - 1.42 X_2 - 1.46 X_3 - 1.45 X_2 \cdot X_3 \quad (R^2 = 0.88) \quad \text{Eq. 2}$$

$$Y_{\mu_{max}}(Ec4.8) = 1.05 - 1.72 X_2 - 1.84 X_3 - 1.63 X_2 \cdot X_3 \quad (R^2 = 0.90) \quad \text{Eq. 3}$$

$$Y_{\mu_{max}}(Ec2.4) = 1.63 - 1.95 X_2 - 1.11 X_3 - 1.86 X_2 \cdot X_3 \quad (R^2 = 0.94) \quad \text{Eq. 4}$$

Where $X_2 = \text{LIP}$, $X_3 = \text{pH}$ and $Y_{\mu_{max}} = \text{specific maximum growth rate}$.

According to the response surface contours, the inhibitory effects caused by 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR on *S. Typhimurium* decreased when the LIP amount decreased (LIP effect) or when the LIP amount decreased and the pH increased (LIP-pH interaction effect) (Fig.1A). The inhibitory effect caused by 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR on *S. Typhimurium* was affected by LIP

amount (LIP effect), pH values (pH effect) or their interaction (LIP-pH interaction effect); the lowest inhibitory effect of CAR was observed in cultivation medium containing the highest LIP amount (level +1) and the lowest pH value (level -1) (Fig. 1B).

The inhibitory effect caused by 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR on *E. coli* O157:H7 was decreased when the LIP amount decreased (LIP effect), pH decreased (pH effect) or when the LIP amount decreased and pH increased (LIP-pH interaction effect) (Fig. 2A). The lowest inhibitory effects of CAR were observed in experimental cultivation media containing the lowest LIP amount (level -1) at the lowest pH value (level -1) (Fig. 2A). Similar effects of LIP, pH or their interaction on the inhibitory effects caused by 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR on *E. coli* O157:H7 were observed (Fig. 2B).

The PTN amount did not influence the inhibitory effects of CAR against the test pathogens under the experimental conditions assayed. The data were experimentally validated in three independent experiments performed under the optimized conditions according to the analysis of the RSM.

The λ of *S. Typhimurium* PT4 varied from zero to 2.4 h when the strain was exposed to 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR and from zero to 3.48 h when the strain was exposed to 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR. For *E. coli* O157:H7, the λ varied from zero to 2.32 h when the strain was exposed to 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR, and from zero to 4.30 h when the strain was exposed to 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR. *S. Typhimurium* showed the longest λ when exposed to 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ or 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR in experimental cultivation medium containing the same amount of LIP (6.25 mL/100 mL) at pH (6.0) but containing 4 g/100 mL (cultivated medium 7) and 8 g/100 mL (cultivated medium 8) of PTN. Otherwise, when exposed to 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ or 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR, *E. coli* O157H:7 showed the longer λ in cultivation media 7, 8, 9, 10 and 11. For both, *S.*

Typhimurium PT4 and *E. coli* O157:H7, the longest λ was verified in cultivation media where the strains showed the lowest μ_{max} .

3.4 Effects of CAR on bacterial counts in selected cultivation media

The viable counts of *S. Typhimurium* PT4 during 24 h-exposure to 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR in experimental cultivation media 6 and 8, which provided the highest and lowest μ_{max} , respectively, are shown in Fig. 3A. *S. Typhimurium* PT4 exhibited lower counts ($p \leq 0.05$) in cultivation media containing CAR compared to those without CAR. An increase ($p \leq 0.05$) of approximately 2 log units in counts of *S. Typhimurium* PT4 was observed in the earlier 8 h of exposure to CAR in cultivation medium 6, with no increase ($p > 0.05$) in counts in the further monitored exposure time intervals. No changes were observed in initial counts of *S. Typhimurium* PT4 exposed to 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR in experimental cultivation medium 8 over the monitored exposure time period. An increase ($p \leq 0.05$) near to 3 log units was observed in counts of *S. Typhimurium* PT4 in the earlier 16 h of exposure to 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR in experimental cultivation medium 3 (selected because provided the highest μ_{max}). Otherwise, no changes ($p > 0.05$) were observed in initial counts of *S. Typhimurium* PT4 exposed to 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR in experimental cultivation medium 7 (selected because provided the lowest μ_{max}) over the monitored exposure time period (Fig. 3B).

The counts of *E. coli* O157H:7 during 24 h-exposure to 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR in experimental cultivation media 2 and 8 (selected because provided the highest and lowest μ_{max} , respectively) are shown in Fig. 4A. *E. coli* O157H:7 exhibited lower counts ($p \leq 0.05$) in cultivation media containing CAR compared than in cultivation media without CAR. *E. coli* O157:H7 increased the counts ($p \leq 0.05$) in approximately 2 log units in the earlier 8 h of exposure to CAR in experimental cultivation medium 2, with no changes ($p > 0.05$) in counts in the further monitored exposure time intervals. A decrease ($p \leq 0.05$) near to 1.5 log units in

counts of *E. coli* O157:H7 was observed after 12 h of exposure to 4.8 $\mu\text{L/mL}$ of CAR in experimental cultivation medium 8 (Fig. 4A). An increase ($p \leq 0.05$) near to 3 log units was observed in counts of *E. coli* O157H:7 in the earlier 6 h of exposure to 2.4 $\mu\text{L/mL}$ of CAR in experimental cultivation medium 5 (selected because provided the highest μ_{max}). Otherwise, a decrease ($p \leq 0.05$) of approximately 1.5 log were observed in initial counts of *E. coli* O157H:7 exposed to 2.4 $\mu\text{L/mL}$ of CAR in cultivation medium 7 (selected because promoted the lowest μ_{max}) over the monitored exposure time period (Fig. 4B).

4. Discussion

In this study, the efficacy of CAR to inhibit *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157H:7 was assessed in cultivation media containing varied amounts of PTN and LIP at different pH values. The MIC values of CAR on both test pathogens in BHIB were similar or lower than those reported in previous studies using laboratory media (Luz et al., 2014; Du et al., 2015). However, the MIC values of CAR on *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157H:7 in different experimental cultivation media tested in this study were up to four-fold higher than those obtained in BHIB. This is an interesting finding because the determination of MIC in laboratorial media have been the primary measurement to assess the efficacy of antibacterial agents, including substances candidates for use as antimicrobials in foods (De Souza et al., 2016; Calo et al, 2015; Perricone et al., 2015).

CAR showed lower MIC values against *E. coli* O157H:7 in experimental cultivation media 7 and 8 compared to other tested media. The experimental cultivation media 7 and 8 had the combination of the highest LIP amounts and pH value tested. In contrast to observed in this study, the higher amounts of LIP in food matrices has shown to decrease the antibacterial efficacy of phenolics by exerting a protective effect to target bacterial cells

(Perricone et al., 2015; Smith-Palmer et al., 2001). Additionally, the pH decrease is commonly reported to enhance the antibacterial efficacy of CAR by increasing its hydrophobicity that results in easier CAR-uptake across the bacterial cell membrane (Burt, 2004; Negi, 2012).

The highest inhibitory effects of CAR, as indicated by the lowest μ_{max} of *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157:H7, were observed in cultivation media containing the highest LIP amounts and pH value tested despite of the PTN or CAR amounts in cultivation media. The effect of LIP on CAR inhibitory effects observed in the RSM analysis explain the increased μ_{max} showed by *S. Typhimurium* PT4 during exposure to 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR in experimental cultivation medium containing the lowest LIP amount tested. Otherwise, the LIP-pH interaction effect explains the increased μ_{max} of this pathogen during exposure to 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR in cultivation medium containing the highest tested LIP amount at pH 5.0. Furthermore, the effect of pH alone or the effect of the interaction LIP-pH explains the highest μ_{max} of *E. coli* O157:H7 in experimental cultivation medium containing the lowest LIP amount tested but at pH 5.0 (CAR 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$) or in experimental cultivation media containing the lowest LIP amount tested at pH 6.0 (CAR 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Overall, the LIP, pH and LIP-pH interaction effects explain the negative μ_{max} observed for *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157:H7 during exposure to 2.4 or 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of CAR in experimental cultivation medium containing the highest LIP amount tested at pH 6.0. The μ_{max} indicate the variation of population over a monitored cultivation period, and μ_{max} negative values indicate decrease of cell over time (Lee et al., 2015), which were observed in this study as a consequence of the inhibitory effects of CAR on the tested bacterial strains.

The interaction LIP-pH probably caused the decreased inhibitory effects of CAR on *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157:H7 in acidic cultivation media, in opposite to reports of

previous studies (Burt, 2004; Gutierrez et al., 2009; Negi, 2012). The negative impact of LIP on antimicrobial effects of phenolics has been associated with the decrease availability of the later in aqueous phase, which primarily bind to LIP and, consequently, do not target the bacterial cells that are mostly in aqueous phase of growth substrates (Perricone et al., 2015; Smith-Palmer et al., 2001). Probably, in the conditions tested in this study, the CAR-LIP affinity was limited by the effects of pH in cultivation media and, consequently, CAR maintained the efficacy to inhibit the test pathogens even in high-LIP amounts. An earlier study reported decrease of CAR inhibitory effect on *Salmonella* Tennessee in high-LIP peanut paste (50% LIP). However, in the same study, CAR failed to inhibit *Salmonella* growth in low-LIP peanut (<5%) when the a_w increased (Wei Chen et al., 2015). Another study reported decrease of the μ_{max} of *L. monocytogenes* cultivated in media containing 10 g/100mL of LIP and *O. vulgare* L. essential oil (CAR-chemotype), suggesting that the added-LIP amount enhanced the antibacterial efficacy of the tested essential oil (Gutierrez et al., 2008); however, the effects of pH or a possible LIP-pH interaction were not considered in these studies. Otherwise, studies have shown low inhibitory effects of essential oil containing CAR as majority constituent in full-fat formulations (>50-70% LIP) compared to low-fat matrices (Chen et al., 2015; Singh et al., 2003; Speranza and Corbo, 2010). Thus, the supposed protective effects of LIP on bacterial cells may be related to the fat-amount in food matrix or be a result of the interaction of LIP with other food matrix intrinsic parameters.

The PTN did not affect the antibacterial efficacy of CAR on *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157:H7 under the experimental conditions tested in this study. Probably, the effects of the LIP-pH interaction overlapped the possible effects of PTN on the inhibitory effects of CAR.

The λ of *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157:H7 varied in cultivation media containing or not CAR (2.4 or 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$). For both the tested pathogens, the longest λ was observed in cultivation media where the strains showed the lowest μ_{max} . Probably, the stress caused by the exposure to CAR in these cultivation media delayed the bacterial cell metabolism, requiring a longer time for bacterial cell adaptation and further increase in bacterial cell population (Lee et al., 2015; Suntres et al., 2015).

Counts of *S. Typhimurium* PT4 increased during exposure to CAR (2.4 or 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$) in cultivation media that promoted the highest μ_{max} (cultivation media 6 and 3, respectively) of this pathogen, showing that CAR failed to inhibit the growth of *S. Typhimurium* PT4 over time. It is interesting to note that in these cultivation media the test strain did not require time for adaptation ($\lambda=\text{zero}$) even in the presence of CAR. Probably, the negative effects of LIP and pH on CAR inhibitory effects in a media with high availability of nutrients induced a fast and intense metabolic activity. Otherwise, in cultivation media where *S. Typhimurium* PT4 showed the lowest μ_{max} and longer λ , CAR (2.4 or 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$) exhibited bacteriostatic effects, delaying the bacterial growth over time.

Counts of *E. coli* O157H:7 increased in experimental cultivation media where the pathogen showed the highest μ_{max} and decreased in experimental cultivation media where the lowest μ_{max} was observed despite of the CAR amount. Thus, CAR showed antibacterial activity even at sub-MICs in media where pH and LIP did not affect its efficacy. CAR uptake through the outer bacterial membrane is self-promoted because of the CAR ability to interact with the structure of the lipopolysaccharide barrier (Luz et al., 2014). This feature facilitates the action of CAR even at sub-MICs because once into the cell, CAR can cause a disturbance in protein synthesis and functions (Sousa et al., 2015).

To the best of our knowledge, this is the first study that assessed the effects of the LIP-pH interaction on the inhibitory effects of CAR against the two foodborne pathogens *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157H:7. The results of this study showed that the increase in LIP amounts and the increase in pH values in cultivation media enhanced the antibacterial effects of CAR, indicating a strong influence of the LIP-pH interaction on these effects. These results reveal that the impacts of LIP and pH on the antibacterial efficacy of CAR should be considered for the use of this compound as an antimicrobial preservative in food matrices to avoid failure on the expected microbial control.

Acknowledgments

The authors thank the CNPq-Brazil by financial support and CAPES-Brazil for the scholarship awarded for the first author R. I. Carvalho.

References

- Aliγιannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I. B., 2011. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* Species. **J. Agric. Food Chem.** 49, 4168-4170.
- FDA - Food and Drug Administration, 2017. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Everything Added to Food in United States (EAFUS) and Carvacrol, 2013. Retrieved on 20 January 2017 from. <http://www.fda.gov>.
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. **Int. J. Food Microbiol.** 94, 223-253.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O' Bryan, C. A., Ricke, S. C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems: A review. **Food Control.** 54, 111-119.
- Carvalho, R. J., Souza, G. T., Honório, V. G., Sousa, J. P., Conceição, M. L., Magnani, M., Souza, E. L., 2015. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiol.** 52, 59-65.

- Chen, W., Golden, D. A., Critzer, F. J., Davidson, P. M., 2015. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde, carvacrol, and lauric arginate against *Salmonella* Tennessee in a glycerol-sucrose model and peanut paste at different fat concentrations. **J. Food Prot.** 78, 1488-1495.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI., 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational vol. 32, document M100-S22. Wayne, PA: CLSI/NCCLS.
- De Souza, E., Almeida, E. T. C., De Sousa Guedes, J. P., 2016. The potential of the incorporation of essential oils and their individual constituents to improve microbial safety in juices: A review. **Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.** 15, 753-772.
- Du, E., Liping, G., Li, Z., Wang, W., Liu, D., Guo, Y., 2015. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **J. Anim. Sci. Biotechnol.** 15, 55-57.
- Espina, L., Gelaw, T. K., de Lamo-Castellvi, S., Pagán, R., Garcia-Gonzalo, D., 2013. Mechanism of bacterial inactivation by (p)-limonene and its potential use in food preservation combined processes. **Plos One.** 8, 567-569.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **Int. J. Food Microbiol.** 124, 91-97.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiol.** 26, 142-150.
- Honório, V. G., Bezerra, J., Souza, G. T., Carvalho, R. J., Gomes Neto, N. J., Figueiredo, R. C. B. Q., Melo, J. V., Souza, E. L., Magnani, M., 2015. Inhibition of *Staphylococcus aureus* cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1,8-cineole. **Front. Microbiol.** 6, 1223.
- Kim, S. A., Rhee, M. S., 2016. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, b-resorcylic acid, trans cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7. **Food Control.** 60, 447-454.
- Lee, H., Kim, K., Lee, S., Yoon, Y., 2015. Kinetic behavior of *Staphylococcus aureus* on cheese as a function of water activity and temperature. **J. Dairy Res.** 82, 64-69.
- Luz, I. S., Gomes Neto, N. J., Tavares, A. G., Magnani, M., Souza, E. L., 2012. Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food based medium does not induce direct or cross protection. **Food Res. Int.** 48, 667-672.
- Luz, I. S., Gomes Neto, N. J., Tavares, A. G., Nunes, P. C., Magnani, M., Souza, E. L., 2013. Lack of induction of direct protection or cross-protection in *Staphylococcus aureus* by

- sublethal concentrations of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol in a meat-based medium. **Arch. Microbiol.** 195, 587-593.
- Luz, I. S., Gomes-Neto, N. J., Magnani, M., De Souza, E. L., 2014. Assessment of tolerance induction by *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in *Pseudomonas aeruginosa* cultivated in a meat-based broth and in a meat model. **Food Sci. Tech. Int.** 7, 1-10.
- Melo, A. N. F., Souza, G. T., Schaffner, D., Oliveira, T. C., Maciel, J. F., Souza, E. L., Magnani, M., 2017. Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella* Typhimurium PT4 in chicken breast meat after exposure to sequential stresses. **Int. J. Food Microbiol.** 251, 15-23.
- Moon, H., Kim, N. H., Kim, S. H., Kim, Y., Ryu, J. H., Rhee, M. S., 2017. Teriyaki sauce with carvacrol or thymol effectively controls *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and indigenous flora in marinated beef and marinade. **Meat Sci.** 129, 147-152.
- Negi, P. S., 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability, and safety issues for food application-a review. **Int. J. Food Microbiol.** 156, 7-17. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006
- Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., 2015. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Front. Microbiol.** 6, 76, 1-7.
- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A. R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R. Mencarelli, L., Carmagnani, L., Di Martino, M. C., Lo Nostro, A., 2015. Antibacterial activity of oregano, rosmarinus and thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control.** 54, 188-199.
- Pol, I. E., Mastwijk, H. C., Slump, R. A., Popa, M. E., Smid, E. J., 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. **J. Food Prot.** 64, 1012-1018.
- Posada-Izquierdo, G., Del Rosal, S., Valero, A., Zurega, G., Sant'Ana, A. S., Alvarenga, V. O., Pérez - Rodrigues, F., 2016. Assessing the growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in spinach, lettuce, parsley and chard extracts at different storage temperatures. **J. App. Microbiol.** 120, 6, 1701-1710.
- Rodrigues, J. B. S., Carvalho, R. J., Souza, N. T., Oliveira, K. S., Franco, O. L., Schaffner, D., Souza, E. L., Magnani, M., 2017. Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. **Food Control.** 73, 1237-1246.
- 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 Chem.** 91, 621-632.

- Singh, A., Singh, R. K., Bhunia, A. K., Singh, N., 2004. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hot-dogs. **LWT - Food Sci. Technol.** 36, 787-794. doi: 10.1016/S0023-6438(03)00112-9
- Speranza, B., and Corbo, M. R., 2010. “Essential oils for preserving perishable foods: possibilities and limitations” in Application of Alternative Food Preservation Technologies to Enhance Food Safety and Stability, eds A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinigaglia (Sharjah: Bentham Publisher), 35-57.
- Souza, G. T., Carvalho, R. J., Sousa, J. P., Tavares, J. F., Schaffner, D., Souza, E. V., Magnani, M., 2016. Effects of the essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semihard cheese broth and slurry. **J. Food Prot.** 79, 246-252.
- Sousa, J. P., Oliveira, K. A. R., Figueiredo, R. C. B. Q., Souza, E. L., 2015. Influence of carvacrol and 1,8-cineole on cell viability, membrane integrity, and morphology of *Aeromonas hydrophila* cultivated in a vegetable-based broth. **J. Food Prot.** 78, 424-429.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., and Fyfe, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiol.** 18, 463–470. doi: 10.1006/fmic.2001.0415
- Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., Alipour, M., 2015. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Food Sci. Nutr.** 3, 304-318.

Figure captions

Fig 1. (A) Curves of surface response of μ_{max} obtained from cultivation of *S. Typhimurium* PT4 in cultivation media containing different amounts of LIP and pH values and added of 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of carvacrol (CAR); (B) Curves of surface response of μ_{max} obtained from cultivation of *S. Typhimurium* PT4 in cultivation media containing different amounts of LIP and pH values and added of 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of carvacrol.

Fig 2. (A) Curves of surface response of μ_{max} obtained from cultivation of *E. coli* O157H:7 in cultivation media containing different amounts of LIP and pH values and added of 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of carvacrol (CAR); (B) Curves of surface response of μ_{max} obtained from cultivation of *E. coli* O157H:7 in cultivation media containing different amounts of LIP and pH values and added of 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of carvacrol.

Fig. 3. Viable cell counts of *S. Typhimurium* PT4 in cultivations media at 37 °C during exposure to carvacrol (CAR) at (A) 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ or (B) 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$. (■) Counts in cultivation media corresponding to the highest μ_{max} (B6 or B3) without addition of CAR; (×) Counts in cultivation media corresponding to the highest μ_{max} (B6 or B3); (●) Counts of cultivation media corresponding to the lowest μ_{max} without addition of CAR (B8 or B7); (▲): Counts in cultivation media corresponding to the lowest μ_{max} (B8 or B7). Detection limit of the test: 2.0 log CFU/mL. The error bars represent the standard deviation.

Fig. 4. Viable cell counts of *E. coli* O157H:7 in cultivations media at 37 °C during exposure to carvacrol (CAR) at (A) 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ or (B) 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$. (■) Counts in cultivation media

corresponding to the highest μ_{max} (B3 or B2) without addition of CAR; (×) Counts in cultivation media corresponding to the highest μ_{max} (B3 or B2); (●) Counts in cultivation media corresponding to the lowest μ_{max} without addition of CAR (B7 or B8); (▲) Counts in cultivation media corresponding to the lowest μ_{max} (B7 or B8); Detection limit of the test: 2.0 log CFU/mL. The error bars represent the standard deviation.

Table 1. Codified and absolute values of protein (PTN), lipids (LIP) and pH values used in cultivation media for assays with carvacrol (CAR) following a full factorial design (2^3), and the respective minimal inhibitory concentration (MIC; $\mu\text{L}/\text{mL}$) of CAR against *S. Typhimurium* PT4 and *E. coli* O157H:7.

Media	Codified value X_1 (PTN)	Absolute value X_1 (PTN g/ 100 mL)	Codified value X_2 (LIP)	Absolute value X_2 (LIP mL/ 100 mL)	Codified value X_3 (pH)	Absolute value X_3 (pH)	MIC <i>S. Typhimurium</i> PT4	MIC <i>E. coli</i> O157H:7
1	-1.00	4.00	-1.00	3.75	-1.00	5.00	9.6	9.6
2	1.00	8.00	-1.00	3.75	-1.00	5.00	9.6	9.6
3	-1.00	4.00	1.00	6.25	-1.00	5.00	9.6	9.6
4	1.00	8.00	1.00	6.25	-1.00	5.00	9.6	9.6
5	-1.00	4.00	-1.00	3.75	1.00	6.00	9.6	9.6
6	1.00	8.00	-1.00	3.75	1.00	6.00	9.6	9.6
7	-1.00	4.00	1.00	6.25	1.00	6.00	9.6	4.8
8	1.00	8.00	1.00	6.25	1.00	6.00	9.6	4.8
9	0.00	6.00	0.00	5.00	0.00	5.50	9.6	9.6
10	0.00	6.00	0.00	5.00	0.00	5.50	9.6	9.6
11	0.00	6.00	0.00	5.00	0.00	5.50	9.6	9.6

Table 2. Maximum specific growth rate (μ_{max}) and lag phase (λ) of *S. Typhimurium* PT4 grown in cultivation media containing different concentrations of carvacrol (CAR).

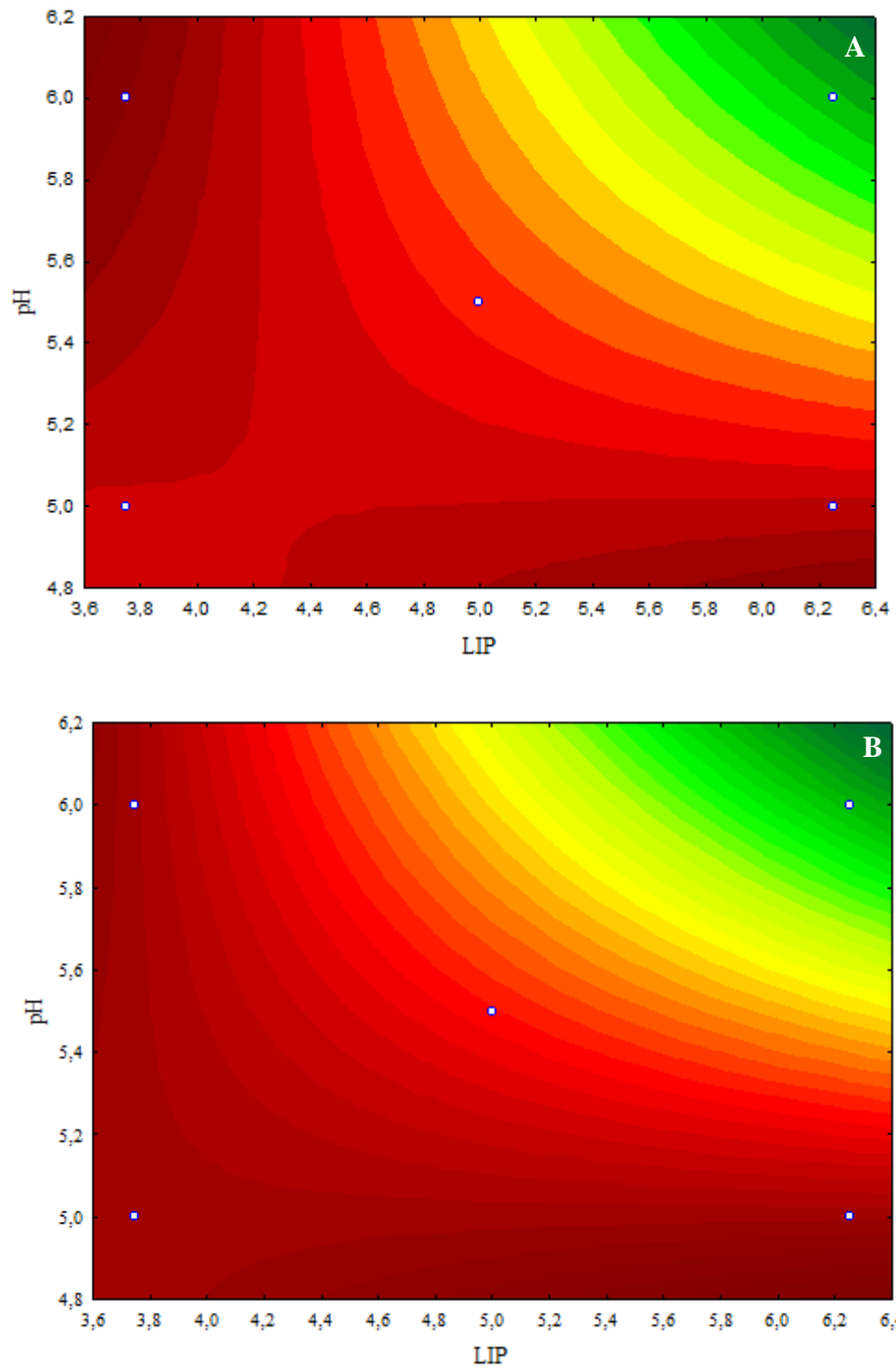
Media	Control μ_{max}	CAR 4.8 μ_{max}	λ (h) CAR 4.8*	Control μ_{max}	CAR 2.4 μ_{max}	λ (h) CAR 2.4**
1	5.33±0.20 ^{Ac}	2.39±0.17 ^{Bg}	0.00±0.00	4.13±0.06 ^{Ac}	1.80±0.15 ^{Ba}	0.00±0.00
2	4.50±0.11 ^{Ae}	3.90±0.28 ^{Bi}	0.00±0.00	2.18±0.03 ^{Ac}	1.82±0.10 ^{Ba}	0.00±0.00
3	5.01±0.26 ^{Aac}	2.64±0.23 ^{Bg}	0.00±0.00	2.90±0.11 ^{Aa}	2.39±0.29 ^{Bb}	0.00±0.00
4	4.37±0.07 ^{Af}	3.83±0.21 ^{Bi}	0.00±0.00	1.60±0.02 ^{Ad}	1.28±0.08 ^{Bc}	0.00±0.00
5	4.95±0.06 ^{Aab}	3.25±0.15 ^{Bj}	0.00±0.00	3.34±0.13 ^{Af}	1.79±0.15 ^{Ba}	0.00±0.00
6	5.12±0.08 ^{Aac}	4.63±0.20 ^{Ba}	0.00±0.00	2.40±0.06 ^{Ab}	1.80±0.06 ^{Ba}	0.00±0.00
7	3.00±0.08 ^{Ag}	1.45±0.06 ^{Bc}	0.00±0.00	1.91±0.18 ^{Acd}	-1.29±0.36 ^{Bd}	3.48±0.03
8	2.09±0.04 ^{Ad}	-1.44±0.07 ^{Bb}	2.40±0.00	1.56±0.27 ^{Ad}	-0.88±0.03 ^{Bc}	2.30±0.01
9	2.33±0.02 ^{Ad}	1.94±0.05 ^{Bd}	0.00±0.00	2.61±0.04 ^{Aab}	1.97±0.02 ^{Ba}	0.00±0.00
10	2.37±0.10 ^{Ad}	1.91±0.03 ^{Bd}	0.00±0.00	2.64±0.04 ^{Aab}	1.95±0.05 ^{Ba}	0.00±0.00
11	2.35±0.02 ^{Ad}	1.91±0.06 ^{Bd}	0.00±0.00	2.67±0.17 ^{Aa}	1.89±0.01 ^{Ba}	0.00±0.00

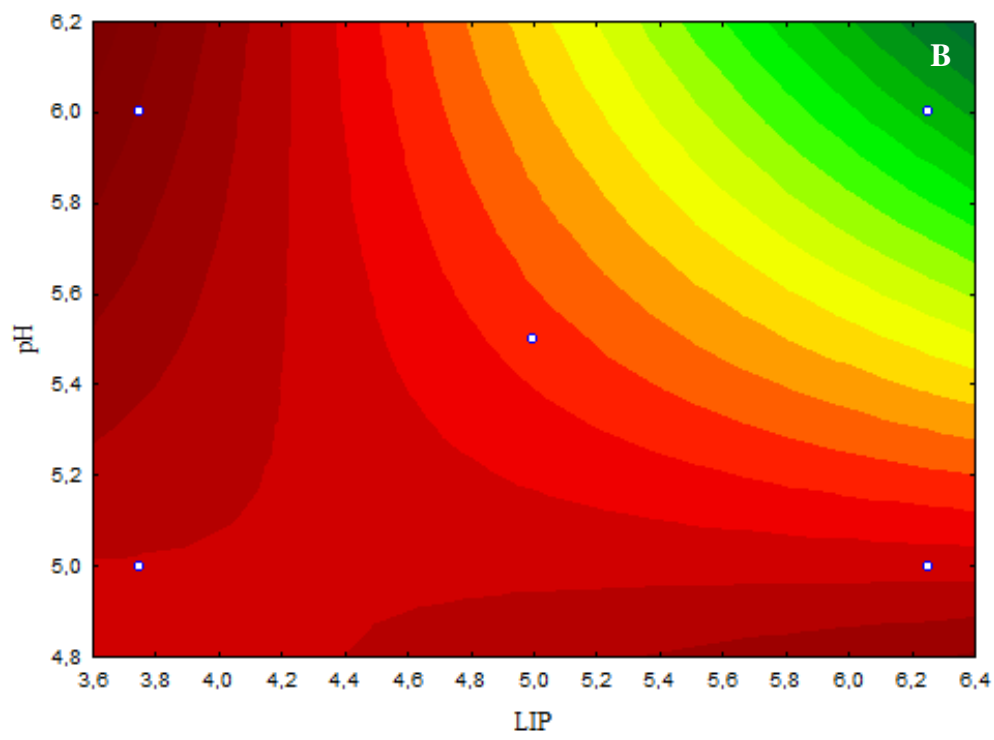
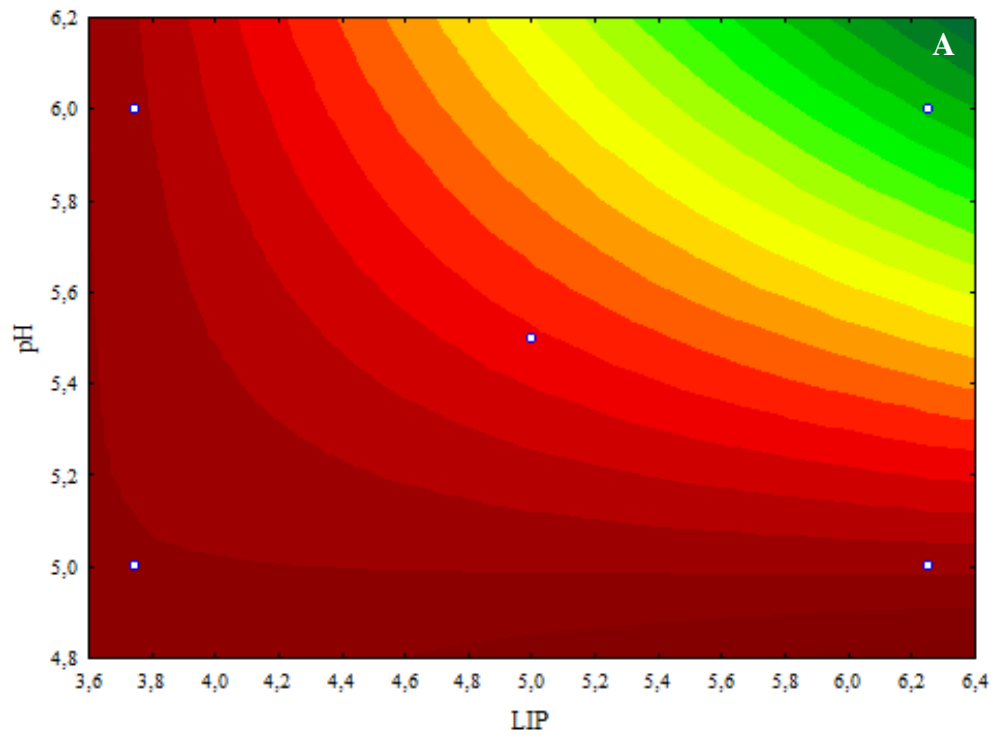
Control: same formulation media without addition of CAR; CAR 4.8: formulation added of CAR at 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$; * or **: all media assayed as control of CAR 4.8 or CAR 2.4 showed λ value = zero; CAR 2.4 formulation added of CAR at 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$. ^{A-B} Different superscript small letters in the same raw denote differences ($p \leq 0.05$) in maximum specific growth rate obtained for each bacteria based on Student's t test; ^{a-b} Different superscript small letters in the same column denote differences ($p \leq 0.05$) in maximum specific growth rate obtained for each bacteria based on Tukey test.

Table 3. Maximum specific growth rate (μ_{max}) and lag phase (λ) of *E. coli* O157H:7 grown in cultivation media containing different concentrations of carvacrol (CAR).

Media	Control μ_{max}	CAR 4.8 μ_{max}	λ (h) CAR 4.8*	Control μ_{max}	CAR 2.4 μ_{max}	λ (h) CAR 2.4**
1	4.43±0.08 ^{Ae}	0.73±0.14 ^{Bc}	0.00±0.00	2.56±0.07 ^{Ac}	1.95±0.16 ^{Bc}	0.00±0.00
2	3.90±0.04 ^{Af}	2.85±0.08 ^{Bf}	0.00±0.00	2.91±0.06 ^{Aab}	2.33±0.13 ^{Bc}	0.00±0.00
3	2.20±0.04 ^{Ab}	1.86±0.01 ^{Babcd}	0.00±0.00	3.16±0.17 ^{Ab}	2.50±0.19 ^{Bc}	0.00±0.00
4	1.93±0.01 ^{Ac}	1.53±0.14 ^{Bab}	0.00±0.00	1.98±0.11 ^{Ad}	1.60±0.08 ^{Bd}	0.00±0.00
5	2.44±0.02 ^{Aab}	1.90±0.21 ^{Bcd}	0.00±0.00	4.01±0.13 ^{Ae}	3.45±0.11 ^{Ba}	0.00±0.00
6	1.72±0.01 ^{Ad}	1.25±0.16 ^{Bg}	0.00±0.00	2.94±0.02 ^{Aab}	2.33±0.19 ^{Bc}	0.00±0.00
7	1.69±0.08 ^{Ad}	-1.39±0.17 ^{Bh}	1.77±0.01	2.91±0.07 ^{Aab}	-1.02±0.11 ^{Bb}	4.30±0.03
8	1.61±0.07 ^{Ad}	-2.17±0.29 ^{Bi}	2.32±0.01	2.08±0.14 ^{Ad}	-0.82±0.21 ^{Bb}	4.00±0.03
9	2.52±0.12 ^{Aa}	1.66±0.01 ^{Babd}	1.02±0.01	2.63±0.00 ^{Aac}	1.98±0.01 ^{Bde}	0.00±0.00
10	2.25±0.21 ^{Aac}	1.70±0.01 ^{Babd}	1.80±0.00	2.66±0.20 ^{Aac}	1.79±0.01 ^{Bde}	0.00±0.00
11	2.45±0.25 ^{Aab}	1.68±0.03 ^{Babd}	1.78±0.00	2.46±0.10 ^{Ac}	1.86±0.05 ^{Bde}	0.00±0.00

Control: same formulation media without addition of CAR; CAR 4.8: formulation added of CAR at 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$; * or **: all media assayed as control of CAR 4.8 or CAR 2.4 showed λ value = zero; CAR 2.4 formulation added of CAR at 2.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$. ^{A-B} Different superscript small letters in the same row denote differences ($p \leq 0.05$) in maximum specific growth rate obtained for each bacteria based on Student's t test; ^{a-b} Different superscript small letters in the same column denote differences ($p \leq 0.05$) in maximum specific growth rate obtained for each bacteria based on Tukey test.

**Fig. 1**

**Fig. 2**

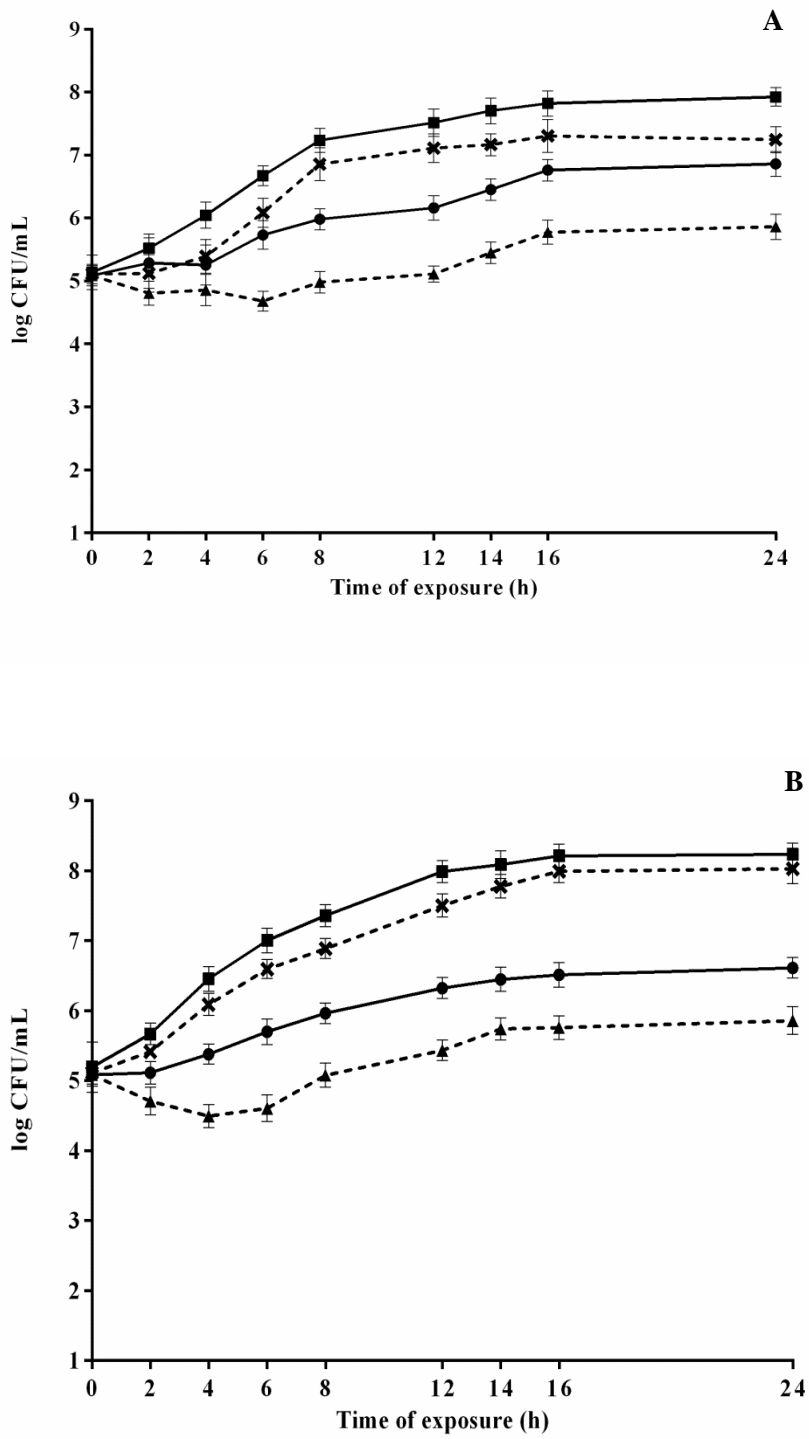
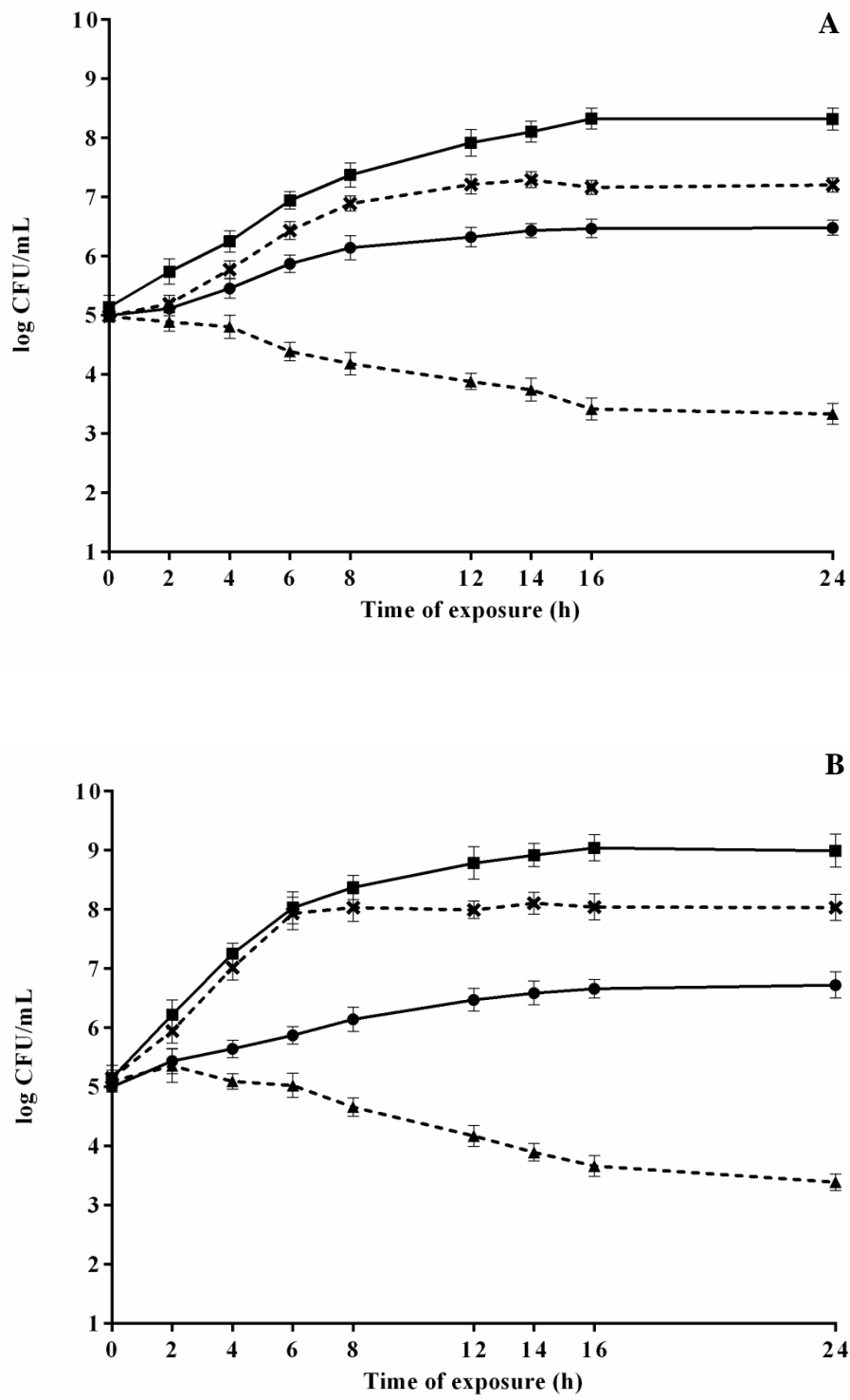


Fig. 3

**Fig. 4**