

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

KATARYNE ÁRABE RIMÁ DE OLIVEIRA

APLICAÇÃO DE CARVACROL E 1,8-CINEOL NA INIBIÇÃO
DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DE HORTALIÇAS
MINIMAMENTE PROCESSADAS EM INÓCULO MISTO

JOÃO PESSOA - PB

2014

KATARYNE ÁRABE RIMÁ DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE CARVACROL E 1,8-CINEOL NA INIBIÇÃO
DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DE HORTALIÇAS
MINIMAMENTE PROCESSADAS EM INÓCULO MISTO**

JOÃO PESSOA - PB

2014

KATARYNE ÁRABE RIMÁ DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE CARVACROL E 1,8-CINEOL NA INIBIÇÃO
DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DE HORTALIÇAS
MINIMAMENTE PROCESSADAS EM INÓCULO MISTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientador: Prof.º Dr. Evandro Leite de Souza

Co-orientador: Prof.º Dr. Jose Pinto Siqueira Junior

JOÃO PESSOA - PB

2014

O48a Oliveira, Kataryne Árabe Rimá de.
Aplicação de carvacrol e 1,8-cineol na inibição de bactérias contaminantes de hortaliças minimamente processadas em inóculo misto / Kataryne Árabe Rimá de Oliveira.- João Pessoa, 2014.
90f. : il.
Orientador: Evandro Leite de Souza
Coorientador: José Pinto de Siqueira Junior
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS
1. Nutrição. 2. Hortaliças processadas. 3. Inóculo bacteriano misto. 4. Carvacrol. 5. 1,8-cineol. 6. Aplicação combinada.

KATARYNE ÁRABE RIMÁ DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE CARVACROL E 1,8-CINEOL NA INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS
CONTAMINANTES DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS EM
INÓCULO MISTO**

Dissertação _____ em ____ / ____ /2014.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Evandro Leite de Souza – PPGCN/CCS/UFPB
Coordenador da Banca Examinadora**

**Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino – PPGCN/CCS/UFPB
Examinadora Interna**

**Profa. Dra. Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo – CpqAM/FIOCRUZ-PE
Examinadora Externa**

**Prof. Dr. Juscélio Donizete Cardoso – PPGCN/CCS/UFPB
Examinador Suplente Interno**

**Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima – DCF/CCS/UFPB
Examinador Suplente Externo**

Á Deus, por iluminar meus passos nessa caminhada;

Aos meus pais, minha fortaleza;

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar minha caminhada sem me deixar desistir, protegendo, abençoando e guiando minha vida;

Aos meus pais Djalma de Oliveira Filho e Ruzenilda Árabe Rimá por todo esforço empenhado em realizar meus sonhos, dando-me muito amor, carinho, incentivo e compreensão;

Aos meus avós (*in memorian*) pelo exemplo de vida, de luta e por todo o cuidado e amor que me proporcionaram;

Ao meu namorado Jackson Garrido, por toda torcida, carinho, incentivo, paciência e compreensão, estando comigo sempre que precisei, acalentando-me nos momentos difíceis e comemorando a cada etapa conquistada com sucesso;

Ao Professor Doutor Evandro Leite de Souza, pela oportunidade concedida, confiando-me a execução desse projeto e orientando-me de forma brilhante e integral;

Ao meu Co-orientador Professor Doutor José Pinto de Siqueira Junior, pelos incentivos e conselhos concedidos;

À Professora Maria Lúcia da Conceição, grande exemplo de pessoa e amiga, que me adotou e passou a ser crucial na minha caminhada. Obrigada pela confiança, carinho, torcida e acima de tudo pela amizade;

À Jossana Pereira de Sousa, minha companheira de experimentos, que ao longo dessa jornada se tornou uma grande amiga. Obrigada pela dedicação, compreensão, carinho e torcida, e por fazer parte de cada vitória conquistada;

À Alberto Costa e Márlya Mayara, alunos de iniciação científica, que desempenharam um papel essencial no desenvolvimento deste projeto. Obrigada pelo auxílio, companheirismo e dedicação, e por terem estado presentes nos momentos que mais precisei;

Aos companheiros de turma da pós - graduação Suellen, Yasmim, Claudenise, Ianna e Evi Clayton, pela companhia em horas boas e ruins, pelo carinho e pela grande amizade construída. Vocês tornaram esse momento ainda mais especial;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, em especial à Professora Marciane Magnani por todos os ensinamentos repassados durante as disciplinas e colaboração no decorrer do curso;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Paraíba, Daniel, Adassa, Isabela, Estefânia, Nelson, Danilo, Eryka, Neusa, Liliane, e os demais que fazem parte dessa família científica, por todo companheirismo, ajuda e bons momentos de agradável convívio;

À professora Doutora Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo do Laboratório de Biologia Celular e Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) – FIOCRUZ-PE, pela colaboração na realização da Microscopia Confocal e por ter aceito o convite de participar da minha banca, enriquecendo ainda mais esse trabalho;

Ao Professor Doutor Marcos Antônio Barbosa de Lima da Universidade Federal Rural de Pernambuco e aos técnicos do Laboratório de Microscopia do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pela atenção, ajuda e paciência durante a execução de uma das etapas do projeto;

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

Ao CNPq, pelo apoio financeiro instituído para elaboração desse trabalho;

A todos o meu mais sincero e especial, muito obrigada. Vocês foram responsáveis por essa vitória.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”

Eleanor Roosevelt.

RESUMO

A demanda por alimentos frescos, de baixo teor calórico, elevados valores nutricionais e de fácil preparo, tem elevado o consumo de hortaliças minimamente processadas. Entretanto, devido a sua intensa manipulação estes produtos têm sido considerados um potencial problema de segurança microbiológica, envolvendo principalmente bactérias psicrotróficas patogênicas e deteriorantes. A sanitização é considerada uma etapa crítica do processamento deste de hortaliças minimamente processadas, embora alguns dos sanitizantes sintéticos permitidos para uso em vegetais sejam citados como responsáveis por efeitos indesejáveis para o consumidor. Neste sentido, como alternativa aos sanitizantes sintéticos, surgem os óleos essenciais, cujo potencial antimicrobiano é atribuído, muitas vezes, aos seus compostos majoritários. Diante deste contexto, este estudo objetivou avaliar o potencial da aplicação dos constituintes carvacrol e 1,8-cineol na inibição de cepas de bactérias contaminantes de vegetais minimamente processados (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 11253), em inóculo misto, através da determinação dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), do índice de Concentração Inibitória Fracionada (CIF), bem como da influência da aplicação desses compostos na inibição do crescimento e sobrevivência do inóculo misto bacteriano em caldo vegetal e em vegetais folhosos. Além disso, foi realizada a avaliação dos possíveis danos causados pelos compostos testados à morfologia das células bacterianas através de análises de microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura. Os valores de CIM do carvacrol e do 1,8-cineol foram 1,25 e 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. O índice de CIF frente ao inóculo bacteriano misto foi 0,25, sugerindo uma interação sinérgica entre os compostos testados. A aplicação dos compostos isolados ou combinados em concentrações sub-inibitórias em caldo vegetal causou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na contagem das bactérias ensaiadas (UFC/mL) ao longo de 24 h. A exposição das hortaliças aos constituintes por apenas 5 min também causou uma redução significativa ($p < 0,05$) nas contagens dos micro-organismos testados. As observações morfológicas das células bacterianas sugerem ainda que os compostos carvacrol e 1,8-cineol, isolados ou combinados em concentrações sub-inibitórias, ocasionam danos à viabilidade celular, bem como alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática e da superfície celular, com o aparecimento de rugosidades e estruturas semelhantes a vesículas. Estes resultados mostram que carvacrol e 1,8-cineol possuem considerável poder de inibição do crescimento e sobrevivência de bactérias contaminantes de hortaliças minimamente processadas, quando ensaiadas em inóculo misto. Ainda, confirmam que constituintes de óleos essenciais, com diferentes estruturas moleculares, quando aplicados em combinação podem substituir sanitizantes sintéticos clássicos utilizados em vegetais, possibilitando o alcance do equilíbrio entre a demanda pela segurança microbiológica e a aceitabilidade sensorial destes produtos.

Palavras chave: Hortaliças minimamente processadas; inóculo misto; carvacrol; 1,8-cineol; aplicação combinada; sobrevivência celular.

ABSTRACT

The demand for fresh foods, with lower calories, high nutritional values and easily prepared has been increased the consumption of minimally processed vegetables. However, because the intense handling these products has been considered a potential problem to the microbiological safety, related mainly to the presence of psychrotrophic pathogenic and spoilage bacteria. The sanitization is considered a critical processing step for minimally processed vegetables, although some of the synthetic sanitizers allowed for the use in vegetables are cited as responsible for undesirable effects to consumers. In this context, as alternative to the synthetic sanitizers arise the essential oils, whose antimicrobial action mechanism is attributed, many times, to their majority compounds. Regarding these aspects, this study aimed to evaluate the potential application of carvacrol and 1,8-cineole against some strains of minimally processed vegetables contaminant bacteria (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Aeromonas hydrophila* INCQS 7966 and *Pseudomonas fluorescens* ATCC 11253), in mixed culture, by determining the values of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the index of Fractional Inhibitory Concentration (FIC), as well as by assessing the efficacy of the application of these compounds in inhibiting the growth and survival of the mixed bacterial inoculum in vegetable broth and in leafy vegetables. Moreover, it was performed the assessment of possible damage caused by the tested compounds in the morphology of the bacterial cells by the analysis of confocal microscopy and scanning electronic microscopy. MIC values of carvacrol and 1,8-cineole ranged from 1.25 e 40 μ L/mL, respectively. The FIC index against the mixed bacterial inoculum was 0.25, suggesting a synergic interaction between the tested compounds. The application of the compounds alone or combined in sub-inhibitory concentrations in vegetable broth caused a significant decrease ($p < 0.05$) in counts (CFU/mL) of the tested bacteria over 24 h. The exposure of vegetables to the compounds for only 5 min also caused a significant reduction ($p < 0.05$) in counts of the tested bacteria. The observations of bacterial cell morphology suggest that the compounds carvacrol and 1,8-cineole alone or combined in sub-inhibitory concentrations, cause damage to the cell viability, and change the permeability of the cytoplasmic membrane and the cell surface, with the appearance of roughness appearance and like-vesicles structures. These results show that carvacrol and 1,8-cineole possess strong inhibitory effect of the growth and survival of bacteria associated with minimally processed vegetables when tested in mixed culture. Still, these data confirm that constituents of essential oils, with different molecular structures, when applied in combination can replace traditional synthetic sanitizing used in minimally processed vegetables allowing reaching the balance between the demand for microbiological safety and sensory acceptability of these products.

Keywords: Minimally processed vegetables; mixed inoculum; carvacrol; 1,8-cineole; combined application; cell survival.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química da molécula de carvacrol 37

Figura 2: Estrutura química da molécula de 1,8-cineol 38

Artigo:

Figure 1: Viable cell counts of *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A), *A. hydrophila* ATCC 7966 (B) and *P. fluorescens* ATCC 11253 (C) in mixed population cultivated in vegetable broth at 7 °C as a function of antimicrobial concentration: (□): control (0 µL/mL); (●): carvacrol (MIC: 1,25 µL/mL); (○): 1,8-cineole (MIC: 40 µL/mL); (■): carvacrol (1/8 MIC: 0.156 µL/mL) + 1,8-cineole (1/8 MIC: 5 µL/mL); Detection limit of the test: 2.0 log cfu/mL 86

Figure 2. Confocal microscopy of a mixed culture of *L. monocytogenes* ATCC 7644, *A. hydrophila* ATCC 7966 and *P. fluorescens* ATCC 11253 in a vegetable broth and exposed to carvacrol (CAR) and 1,8-cineole (CIN) alone or in combination for 15 and 30 min (7 °C) and labeled with SYTO 9 (green fluorescence: viable cells) and PI (red fluorescence: non-viable cells). (A) Negative control – viable cells; (B) Positive control – death cells exposure at alcohol (70%) for 1 h; (C, D) cells submitted to treatment with CAR: 1.25 µL/mL after 15 (C) and 30 min (D); (E, F) Cells submitted to treatment with CIN: 40 µL/mL after 15 (E) and 30 min (F); (G, H) Cells submitted to treatment with 1/8 MIC CAR: 0.15 µL/mL+ 1/8 MIC CIN: 5 µL/mL after 15 (G) and 30 min (H) 87

Figure 3. Merged images of *L. monocytogenes* ATCC 7644, *A. hydrophila* ATCC 7966 and *P. fluorescens* ATCC 11253 in a mixed culture exposed to carvacrol (CAR) and 1,8-cineole (CIN) in combination (1/8 MIC CAR: 0.15 µL/mL+ 1/8 MIC CIN: 5 µL/mL) for 30 min in a vegetable-based broth and labeled with PI (red fluorescence) (arrows: highlights for the appearance of condensed genetic material in red stained-cells; Vega-Manriquez et al., 2007) 88

Figura 4. Scanning electron microscopy of *L. monocytogenes* ATCC 7644, *A. hydrophila* ATCC 7966 and *P. fluorescens* ATCC 11253 in mixed culture incubated with carvacrol (CAR) and 1,8-cineole (CIN) alone and in mixture. (A, B) Cells treated with CAR: 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for 1 h (A) and 4 h (B). (C, D) Cells treated with CIN: 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for 1 h (C) and 4 h (D). (E, F) Cells treated with CAR: 0.156 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + CIN: 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for 1 h (E) and 4 h (F). (G, H) Control cells (no treated with CAR or CIN) after cultivation for 1 h (G) and 4 h (H) 89

LISTA DE TABELAS

Artigo:

Table 1. Counts (log cfu/g) of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* in mixed culture when experimentally inoculated in fresh-cut leafy vegetables and exposed to carvacrol and 1,8-cineole (alone or in mixture) for 5 min 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - American Type Culture Collection

ATP - Adenosina Trifosfato

BHI - Brain Heart Infusion

CIF - Concentração Inibitória Fracional

CIM - Concentração Inibitória Mínima

EPA - Environmental Protection Agency

FDA - Food and Drug Administration

FSIS - Food Safety and Inspection Service

GRAS - Geralmente Reconhecidos como Seguros

HMP - Hortaliças Minimamente Processadas

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods

IFPA - International Fresh-Cut Produce Association

OMAFRA - Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs

PBS - Phosphate buffered saline

THM - Trihalometanos

UFC - Unidade Formadora de Colônia

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS	20
2.2 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS.....	23
2.2.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	25
2.2.2 <i>Aeromonas hydrophila</i>	26
2.2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	28
2.3 SANITIZAÇÃO DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS.....	30
2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	34
2.4.1 Carvacrol e 1,8-cineol	36
2.4.2 Mecanismos de ação de constituintes de óleos essenciais	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS.....	41
3.2 MICRO-ORGANISMOS TESTE.....	41
3.3 INÓCULO MICROBIANO MISTO.....	41
3.4 PREPARAÇÃO DO CALDO VEGETAL.....	42
3.5 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	42
3.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	42
3.5.2 Avaliação do efeito da ação combinada dos constituintes	42
3.5.3 Interferência dos constituintes sobre a cinética de crescimento bacteriano	43
3.5.4 Efeito dos constituintes sobre a sobrevivência de bactérias potencialmente patogênicas em hortaliças minimamente processadas	43
3.6 TESTES DE AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS DANOS CAUSADOS À CÉLULA BACTERIANA.....	44
3.6.1 Microscopia confocal	44
3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura	45
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE	61
APÊNDICE A - ARTIGO ORIGINAL.....	61

Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineol.....61

1 INTRODUÇÃO

Devido ao maior conhecimento da relação entre dieta e prevenção de doenças, os consumidores vêm modificando seus hábitos alimentares, tornando-os mais saudáveis. Neste contexto, as Hortaliças Minimamente Processadas (HMP) têm ganhado destaque no mercado, face às suas características de conveniência e praticidade, além de apresentar-se como alimento fresco e de satisfatória qualidade nutricional (ZHOU et al., 2004; ALEGRE et al., 2010; ALEXOPOULOS et al., 2013). No entanto, por serem consumidos principalmente crus, como em saladas, esses alimentos tem representado um potencial problema de segurança microbiológica com risco elevado de exposição dos consumidores a micro-organismos patogênicos (SUSLOW, 2002; GLEESON; O'BEIRNE, 2005).

As Hortaliças Minimamente Processadas podem apresentar destacável sobrevivência e multiplicação de espécies bacterianas patogênicas e deteriorantes. Além disso, pelo fato de serem armazenadas, geralmente, sob baixas temperaturas, há a predominância do crescimento de bactérias psicrotróficas, tais como *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* e *Listeria monocytogenes* (UYTTENDAELE et al., 2004; GLEESON; O'BEIRNE, 2005; RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007).

Duas das etapas críticas do processamento desses produtos, sob o ponto de vista da segurança microbiológica, correspondem à lavagem e sanitização. Entretanto, os produtos permitidos para desinfecção desses alimentos, dentre os quais o hipoclorito de sódio, têm sido citados como responsáveis pelo desencadeamento de efeitos carcinogênicos, bem como, de toxicidade residual e redução da eficácia antimicrobiana (RUIZ-CRUZ et al., 2007). Com isso, os consumidores tendem cada vez mais a rejeitar a utilização de agentes químicos em alimentos, com o intuito de aumentar o seu período de preservação. Tal fato eleva a demanda por alternativas naturais, como, por exemplo, os extratos vegetais e óleos essenciais de plantas, capazes de atuar como agentes antimicrobianos ou agentes de descontaminação, com efeito similar ou superior aos sanitizantes sintéticos clássicos (SKANDAMIS; TSIGARIDA; NYCHAS, 2000; PONCE et al., 2008).

Vários estudos têm confirmado a ação antimicrobiana de óleos essenciais de plantas, os quais são reportados como Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS), com ênfase na eficácia no controle de bactérias patogênicas e deteriorantes de importância em vegetais prontos para o consumo (BURT, 2004; GUTIERREZ et al., 2008; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008). Entre esses se destacam os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (AZERÊDO et al., 2011).

Turina et al. (2006) sugerem que o possível mecanismo de ação dos óleos essenciais seria pela presença em sua constituição de compostos terpênicos, os quais alterariam a bicamada lipídica da membrana celular microbiana, aumentando sua permeabilidade, com posterior liberação de constituintes intracelulares vitais, ou ainda por causar danos em seus sistemas enzimáticos. Os componentes majoritários dos óleos essenciais de *O. vulgare* L. e *R. officinalis* L. são frequentemente relatados como sendo, respectivamente, carvacrol e 1,8-cineol (AZERÊDO et al., 2011), atribuindo-se a estes composto a capacidade antimicrobiana destes óleos essenciais.

No entanto, para que os óleos essenciais sejam aplicados como antimicrobianos naturais em alimentos, o impacto sensorial deve ser considerado, pois estas substâncias podem alterar o sabor dos alimentos ou excederem limiares de sabor aceitáveis pelo consumidor (NAZER et al., 2005). Devido a estes fatores, pesquisadores têm procurado combinações otimizadas destas substâncias para que se possa atingir a eficácia antimicrobiana em baixas concentrações suficientes para não alterarem adversamente a aceitabilidade sensorial dos alimentos (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009).

Cabe ainda ressaltar que considerando que um alimento abriga uma população mista de micro-organismos, onde as características desta população diferem em muitos aspectos de uma população pura, a avaliação das propriedades antimicrobianas de óleos essenciais e seus constituintes frente a culturas mistas podem proporcionar resultados mais fidedignos em relação a sua eficácia. Diante deste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial da aplicação dos constituintes carvacrol e 1,8-cineol como sanitizantes em hortaliças folhosas minimamente processadas, por meio da análise do efeito inibitório desses constituintes isolados e combinados frente a bactérias contaminantes de vegetais folhosos minimamente processados, quando ensaiadas em inóculo misto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

A busca por alimentos frescos, de baixo valor calórico, nutritivos e com rigoroso controle de qualidade encontra-se aumentada. Consumidores vêm modificando seus hábitos alimentares e cada vez mais tornam-se conscientes dos benefícios que os vegetais trazem a saúde, aumentando sua demanda no mercado. Essas mudanças têm conduzido à indústria de alimentos a buscar o desenvolvimento de tecnologias atrativas, dentre as quais se destaca o processamento mínimo de vegetais que além de atender os requisitos citados, agregam conveniência e praticidade ao produto final (OMS-OLIU et al., 2010; CORTEZ-VEGA et al., 2013).

Hortaliças minimamente processadas são produtos vegetais prontos para consumo, ou seja, são alimentos pré-preparados por meio de operações como descascamento, corte, sanitização, centrifugação e acondicionamento em embalagens apropriadas à manutenção do produto em seu estado fresco (GOMES et al., 2005). São constituídos principalmente por água, resultando em uma elevada atividade de água ($> 0,99$), e apresentam pH intracelular variável, embora para a maioria dos vegetais minimamente processados este valor encontre-se entre 4,9 a 6,5 (RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007).

Estes produtos estão disponíveis no mercado norte-americano desde a última década de 30, quando saladas embaladas começaram a ser comercializadas em quitandas e pequenos mercados dos Estados Unidos (EUA) (IFPA, 1999). Entretanto, foi nos anos 50, com o surgimento das redes de *fast-food*, que essa atividade apresentou crescimento acelerado. No Brasil, o início da prática do processamento mínimo ocorreu no final da década de 70, com a chegada das redes de lanches rápidos aos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (ODUMERU et al., 2003; MORETTI, 2007).

Atualmente, o mercado destas hortaliças, tem recebido grande aceitação pelos consumidores devido ao seu frescor, conveniência e qualidade nutricional (ZHOU et al., 2004). Segundo Teixeira et al. (2001), os principais segmentos consumidores dos produtos denominados *fresh-cut* são supermercados, hotéis, restaurantes, *fast-foods*, além daqueles indivíduos que dispõe de pouco tempo para preparação de suas refeições. Dentre as hortaliças comumente encontradas na forma minimamente processada pode-se citar as folhosas como alface, rúcula, agrião, couve, repolho, espinafre; raízes como cenoura, beterraba, batata-doce;

frutos como pepino, feijão-vagem, pimentão, tomate; e inflorescência como brócolis e couve-flor (MORETTI, 2007).

Para o consumidor, estes produtos oferecem vantagens como maior praticidade no preparo de refeições, ausência de desperdício, maior segurança na aquisição de hortaliças limpas e embaladas e em menores porções. Para o produtor e distribuidor, resulta em agregação de valor ao produto *in natura*, redução de perdas durante armazenamento e redução de custos de transporte e manipulação (DURIGAN, 2004).

Diferente da maioria das técnicas de processamento de alimentos que estabiliza os produtos e prorroga sua vida de prateleira, o processamento mínimo aumenta sua perecibilidade (MORETTI, 2007), pois inclui várias etapas, nas quais os vegetais são submetidos a operações de manejo pós-colheita, pré-seleção e classificação, lavagem, corte, descasque ou fatiamento, enxágue inicial, sanitização, enxágue final, centrifugação, seleção, embalagem e armazenamento sob refrigeração, até serem finalmente distribuídos e adquiridos pelos consumidores (NGUYEN-THE; CARLIN, 1994; GOMES et al., 2005).

O estresse sofrido pelas hortaliças geram respostas fisiológicas que repercutem na caracterização de alimento fresco, acarretando o aumento da perda de água, açúcares, ácidos e vitaminas. Essas alterações levam a uma diminuição da qualidade nutricional, além de alterações sensoriais como escurecimento, formação de odores desagradáveis e perda da textura original. Os produtos podem sofrer ainda danos pelo frio e injúria pela atmosfera modificada, onde a exposição a concentrações de O₂ e CO₂ muito baixas ou elevadas dentro da embalagem podem causar processos fermentativos com o acúmulo de acetaldeído, etanol, acetato de etila e/ou lactato (MORETTI, 2007). A qualidade do produto final, um dos fatores mais importantes do processo de produção, está diretamente relacionada à fase natural de amadurecimento das hortaliças (GOMES et al., 2005), devendo ser então corretamente monitorada para que tais alterações fisiológicas não encontrem-se aceleradas.

Associada as alterações fisiológicas, ocorre a possibilidade de contaminação das hortaliças minimamente processadas por micro-organismos deteriorantes e patogênicos, devido ao fato de tais vegetais possuírem estrutura física susceptível, proporcionada pelos danos causados na superfície do tecido vegetal que acarretam na liberação de nutrientes que podem ser utilizados pelos micro-organismos contaminantes (RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007).

Na fase de produção agrícola, a contaminação pode ocorrer por meio do solo contaminado, da água de irrigação, do adubo orgânico ou proveniente de fezes de animais (BEUCHAT, 2002). Guan et al. (2001) e Ng; Fleet; Heard (2005) relatam que a presença de

alguns compostos químicos inertes na composição de pesticidas é também um fator que predispõe à sobrevivência e à proliferação de micro-organismos. Na colheita, pode ocorrer ainda contaminação cruzada com os operadores, utensílios, água de lavagem, veículos, equipamentos e embalagens utilizados no transporte (BEUCHAT, 2002; JAY, 2005).

As operações de corte, descasque, fatiamento ou torneamento também acarretam em contaminação das hortaliças, pois os danos sofridos pelo vegetal levam à um aumento da respiração dos tecidos, o que permite a penetração de micro-organismos da superfície para o interior, com conseqüente crescimento e proliferação microbiana (JAY, 2005; PINTO, 2007). O crescimento microbiano acelerado e a conseqüente deterioração ocorrem também em decorrência da disponibilidade aumentada de nutrientes nas hortaliças e pela existência de áreas de superfícies maiores para o desenvolvimento microbiano (GLEESON; O'BEIRNE, 2005).

Os equipamentos mal higienizados também contribuem para a contaminação de HMP, pois bactérias podem secretar exopolissacarídeos e proporcionar a formação de biofilmes que abrigam tanto bactérias, como fungos filamentosos e leveduriformes, com conseqüente redução do efeito de sanitizantes e outros agentes antimicrobianos. Carmichael et al. (1999), observaram resistência de *L. monocytogenes* à 500 ppm de cloro livre, quando se encontrava em biofilmes formados por *Pseudomonas fragi* e *Staphylococcus xilosus*.

Outro ponto relevante são as condições de armazenamento como temperatura, tempo, umidade relativa e composição atmosférica, pois alterações nesses fatores podem contribuir para o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e perda da resistência à deterioração (ARTÉS et al., 2009). O produto após ser submetido ao processamento mínimo deve ser armazenado sob refrigeração, em geladeiras comerciais ou em câmara fria, à temperatura de 5°C a 8°C e em umidade relativa de 90 a 95 % (GOMES et al., 2005). Vale salientar ainda, que as condições as quais os produtos são expostos durante a distribuição podem ter profundos efeitos na sua segurança microbiológica (BRACKETT, 1999).

Segundo Suslow (2002), o consumo crescente de HMP aumenta o risco de exposição a micro-organismos patogênicos, pois os processos de controle disponíveis para proteger o consumidor ainda são bastante limitados. A ocorrência do elevado número de doenças alimentares transmitidas por vegetais minimamente processados se dá também pelo fato das hortaliças, em sua maioria, serem consumidas cruas e não haver no processamento nenhum tipo de tratamento térmico que possa assegurar à inativação dos micro-organismos presentes na matéria-prima e/ou aqueles adquiridos via manipulação (OMAFRA, 2006).

Diante deste panorama situacional, em 2006, o *Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs – Ontario/Canada* (OMAFRA), publicou o *Minimally Processed Fruits and Vegetables – Good Manufacturing Practices Guidebook*, que fornece diretrizes para uma série de práticas de segurança alimentar; e em 2008, a *Food and Drug Administration* (FDA) lançou o *Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables*, que determina medidas mais rigorosas de controle na cadeia produtiva destes alimentos, em face dos constantes surtos de doenças por contaminação microbiológica que vêm ocorrendo nesse mercado. Cabe ressaltar, que no Brasil ainda não existe legislação específica que regulamente a produção de hortaliças minimamente processadas, embora já se reconheça a necessidade atual de instituí-las, pois esta falta representa um dos principais problemas do setor.

2.2 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

A presença e o crescimento de micro-organismos nos alimentos podem causar deterioração e resultar numa redução da qualidade e quantidade de nutrientes (SOLIMAN; BADEAA, 2002), conduzindo a um estado de impróprio para o consumo. Hortaliças cultivadas em solos carregam aproximadamente 10^9 Unidades Formadoras de Colônia/g (UFC/g) de micro-organismos depois de colhidas, sendo mais comuns a presença de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Posteriormente, a atividade microbiana em hortaliças minimamente processados pode ser influenciada pelo metabolismo do tecido da planta, pela atmosfera modificada, pela permeabilidade do filme de embalagem e pela temperatura de estocagem (FANTUZZI et al., 2004).

Após o processamento a contagem microbiana em HMP varia, geralmente, de 3 a 6 log UFC/g e inclui, em sua maioria, micro-organismos dos grupos *Pseudomonadaceae* e *Enterobacteriaceae*, além de bactérias lácticas e leveduras. HMP podem ainda ser contaminadas com patógenos humanos, presentes na matéria-prima ou inseridos durante ou após a colheita (RAGAERT; DEVLIEGHIERE; DEBEVERE, 2007). As bactérias mais frequentes em HMP são *Pseudomonas* spp., *Erwinia herbicola*, *Enterobacter agglomerans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus* spp. e as patogênicas do gênero *Salmonella* e *Clostridium*, além de *Escherchia coli* O157:H7 (MORETTI, 2007).

Ao serem armazenadas, geralmente, a baixas temperaturas (6 a 10°C), estes vegetais podem abrigar alguns patógenos psicrotóxicos transmitidos por alimentos, como *L.*

monocytogenes (GLEESON; O'BEIRNE, 2005), *A. hydrophila* (UYTTENDAELE et al., 2004), e bactérias de deterioração do gênero *Pseudomonas*, tais como *P. fluorescens* (RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007).

Acredita-se, que o desenvolvimento dessas espécies em ambientes refrigerados esteja atrelado a uma provável alteração na membrana lipídica da bactéria (aumento no grau de ácidos graxos insaturados), provocada pelo frio, as quais são necessárias para manter a fluidez requerida para as atividades enzimáticas, como também para o transporte de solutos através da membrana (BEALES, 2004). A compreensão dos mecanismos acerca da sobrevivência e crescimento destes micro-organismos em baixas temperaturas pode prover informações para ajudar a desenvolver métodos de controle mais efetivos, visto que os tratamentos usados não garantem a sua total eliminação (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

Silva et al. (2007) analisaram 56 amostras de vegetais minimamente processados comercializados em supermercados da cidade de Porto Alegre – RS, quanto a presença de micro-organismos psicrotróficos, pelo período de um ano, e constataram que a contagem média variou de $7,9 \times 10^6$ a $2,7 \times 10^8$ UFC/g.

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

Vários estudos têm relatado a presença de *P. fluorescens*, *A. hydrophila* e *L. monocytogenes* em hortaliças minimamente processadas, e dentre eles pode-se citar os estudos realizados por Silva et al. (2007); Costa; Vanetti; Puschmann (2009), Gopal et al. (2010), Oliveira et al. (2010), Xanthopoulos; Tzanetakis; Litopoulou-Tzanetaki (2010).

Os vegetais apresentam diferenças marcantes no tocante à morfologia das superfícies, composição interna dos tecidos e atividade metabólica de folhas, caules e raízes, vindo a prover desta forma, uma série de nichos ecológicos seletivos para diversas espécies de micro-organismos (BEUCHAT, 2002).

Em uma população microbiana mista, os fatores intrínsecos e extrínsecos ditam se uma, duas ou várias bactérias da população irá (ou irão) se tornar predominante (s) e produzir (em) alterações específicas em um alimento (BRULL; COOTE, 1999; BURT, 2004). Nas comunidades bacterianas, competitivas (onde duas espécies consomem recursos partilhados) e cooperativas (onde os metabolitos produzidos por uma espécie são consumidos por outro e, vice-versa) interações são, na grande maioria, derivadas do metabolismo celular (FREILICH et al., 2011).

As bactérias com necessidades nutricionais semelhantes cultivadas em ambientes mistos, onde a disponibilidade de novos nutrientes é reduzida ou mesmo mínima, podem se apresentar em competição para a aquisição de componentes que constituem os seus requerimentos nutricionais, os quais tendem a se esgotar com o crescimento da população total. Em um ambiente que proporciona vários nichos ecológicos, essa concorrência pode conduzir a seleção de variantes que são mais adequadas para colonizar tais substratos (KASSEN, LLEWELLYN, RAINEY, 2004; KIRISITS et al., 2005).

Por esses motivos torna-se imprescindível que a indústria de vegetais minimamente processados controle a higiene da matéria-prima, baseada em fundamentos tecnológicos comprovadamente eficientes a fim de garantir a disponibilização destes produtos ao consumidor de forma segura, do ponto de vista microbiológico/sanitário (PINTO, 2007). Dessa forma, faz-se necessário conhecer os mecanismos envolvidos e as condições requeridas para a sobrevivência e crescimento da microbiota nos vegetais.

2.2.1 *Pseudomonas fluorescens*

Os micro-organismos do gênero *Pseudomonas* são bacilos Gram-negativos isolados ou em cadeias curtas, retos ou curvos, medindo cerca de 0,5 x 5 µm; possuem flagelos de inserção polar e pertencem aos grupos de bactérias aeróbias estritas (mas atualmente algumas espécies já foram identificadas como sendo anaeróbias facultativas), psicrotróficas e não formadoras de endósporos, além de serem catalase e oxidase positivos e não fermentarem glicose (RAY, 2004).

Devido a sua intensa atividade metabólica, são capazes de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos, crescendo quimi-organo-heterotroficamente em pH neutro. Podem ser encontrados em alimentos refrigerados, congelados e processados que sofreram contaminação pós-processamento como, por exemplo, ovos, carnes defumadas,

peixes, legumes e leite e seus derivados (MASSON et al. 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Além disso, produzem ainda pigmentos hidrossolúveis (pioverdina e piocianina), enzimas proteolíticas e lipolíticas termoestáveis. Algumas espécies produzem enzimas pectinolíticas de importância para vegetais. Segundo Ragaert, Devlieghere e Debevere (2007), micro-organismos pectinolíticos podem estar relacionados a alterações visuais de HMP, na medida em que rompem as paredes celulares do vegetal, provocando estresse e a exposição de enzimas e substratos, o que pode levar ao escurecimento enzimático destes produtos. Além disso, podem causar em mudanças na textura por meio da degradação da lamela média e da parede celular primária.

P. fluorescens, é a espécie de bactéria psicrotrófica mais comumente encontrada em hortaliças minimamente processadas (GIMÉNEZ et al., 2003). Essa bactéria é extremamente importante em produtos vegetais, não somente por estar envolvida em processos de deterioração, mas por contribuir com a colonização de outros patógenos, por meio da formação rápida de biofilmes em superfícies de equipamentos e utensílios. Sua ocorrência pode ser associada também ao seu menor tempo de geração em temperaturas de refrigeração (BEUCHAT, 2002). Além disso, é alvo de preocupação, pois apresenta resistência a antibióticos, como comprovado por Hamilton-Miller; Shah (2001).

Tem sido demonstrado que a quantidade de *P. fluorescens* no vegetal está diretamente correlacionada com a quantidade de açúcares presentes nas folhas de plantas hortícolas e que estes açúcares são o fator limitante no que diz respeito à colonização por esta bactéria (MERCIER; LINDOW, 2000). Beriam (2007) cita este micro-organismo como um dos responsáveis por doenças bacterianas em hortaliças como alface, alho e cebola. No entanto, ainda é causa incomum de doença em seres humanos, e normalmente afeta pacientes com sistema imunológico comprometido como, por exemplo, pacientes em tratamento de câncer.

2.2.2 *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila possui um número elevado de características que a permitem sobreviver e multiplicar-se em hortaliças minimamente processadas (DASKALOV, 2006). Caracteriza-se como um bastonete móvel, apresentando motilidade ativa, com flagelo polar, mas em algumas culturas jovens podem surgir células com flagelos laterais; fermentam carboidratos como glicose, frutose, maltose e trealose com produção de ácido e gás; não produz esporos, é Gram negativa, não capsulada e oxidase positiva (STOSKOPF, 1993). *A. hydrophila* é uma bactéria

psicrotrófica, com faixas de temperatura de crescimento entre 3 e 42 °C, com um ótimo entre 15 e 20 °C; algumas estirpes podem ainda crescer lentamente a uma 1 °C (RAY, 2004). Ainda, caracteriza-se por ser anaeróbio facultativo, capaz de crescer em atmosferas contendo baixas concentrações de oxigênio (FRANCIS; THOMAS; O'BEIRNE, 1999), além de poder tolerar pH entre 5,5 e 9,0 (ISONHOOD; DRAKE, 2002).

Em termos gerais, *A. hydrophila* isolada parece não resistir aos tratamentos usuais executados no processamento de alimentos. Esse micro-organismo é termosensível, não cresce em pH abaixo de 5, ou em concentração de NaCl acima de 3,5%, sobretudo em combinação com polifosfatos (ISONHOOD; DRAKE, 2002).

Comumente, está presente no meio ambiente, incluindo a água, sendo encontrada em alimentos crus e frescos, onde faz parte da microbiota deteriorante psicrotrófica (SKOVGAARD, 2007). Podem ser isolados de legumes, carnes, presunto, aves, peixes e marisco (KINGOMBE et al., 2004; OTTAVIANI et al., 2011). Há diversos relatos da presença de *Aeromonas* spp. em espécies vegetais (McMAHON; WILSON, 2001; UYTTENDAELE et al., 2004), sendo também frequentemente encontrada na água utilizada na limpeza de utensílios e equipamentos, a qual pode atuar como fonte de contaminação de hortaliças minimamente processadas (DASKALOV, 2006).

Segundo Xanthopoulos, Tzanetakis e Tzanetaki (2010), em amostras de 26 tipos de saladas minimamente processadas prontas para consumo foi detectado *Aeromonas* em 61,5% das amostras e mais de 80% dos isolados foram caracterizados como *A. hydrophila*. As saladas analisadas eram compostas por espinafre (dois tipos), brotos (dois tipos), repolho (um tipo), cogumelos (dois tipos), acelga (um tipo), valeriana (um tipo) ou eram salada *multipacks* (16 tipos). Outros autores também já relataram a detecção de espécies patogênicas de *Aeromonas* em vegetais (McMAHON; WILSON, 2001; UYTTENDAELE et al., 2004).

A. hydrophila é exemplo de patógeno emergente, pois apenas há algumas décadas começou a ser identificado como o causador de infecções gastrintestinais. Pode causar dois tipos dessa doença, sendo que a mais comum apresenta características semelhantes à da coléra, com diarreia aquosa e febre moderada. O segundo tipo é caracterizado pela presença de muco e sangue nas fezes. A diarreia provocada geralmente é moderada e restrita. Cepas de *A. hydrophila* produzem dois tipos de enterotoxina: uma citotônica, semelhante à da cólera, e uma citotoxina. Já foi observada a ocorrência das duas toxinas simultaneamente, no entanto há consideráveis evidências de que o principal fator de virulência seja a citotoxina (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Pode causar também um grande número de infecções extraintestinais, incluindo bacteremia, meningite, infecções em feridas e nos tratos respiratório e urinário. Existem determinados grupos considerados de risco quanto à infecção por *A. hydrophila*, como crianças, idosos e imunodeprimidos (ISONHOOD; DRAKE, 2002). Apresenta ainda resistência aos antibióticos comumente empregados na prática clínica como ampicilina, bacitracina e cefoxitina (DASKALOV, 2006; NAGAR; SHASHIDHAR; BANDEKAR, 2011), e pode ser um invasor secundário de doenças subjacentes, sendo considerada uma bactéria oportunista (SKOVGAARD, 2007).

Foi incluída, por ser um patógeno entérico emergente, na lista de contaminantes importantes para a saúde pública pela Environmental Protection Agency (EPA), devido ao seu potencial de crescimento nos sistemas de distribuição de água, especialmente em biofilmes, onde pode ser resistente à cloração. A morfologia das plantas exerce influencia na formação de biofilme por causa da presença de cavidades, as quais possibilitam não somente a penetração, mas, sobretudo, a proteção dos micro-organismos frente à ação de agentes externos, como os sanitizantes (ELHARIRY, 2011).

2.2.3 *Listeria monocytogenes*

As bactérias pertencentes ao gênero *Listeria* são bacilos curtos (0,5 x 1-2 µm) Gram-positivos, que ocorrem isoladamente ou em cadeias. São móveis, apresentando movimento característico denominado tombamento, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, catalase positivos e oxidase negativos. São micro-organismos ubiqüitários, sendo amplamente distribuídos no ambiente e isolados de diferentes tipos de alimentos (RAY, 2004).

Este micro-organismo apresenta crescimento na faixa de 2,5 a 44 °C, embora existam relatos sobre o crescimento a 0 °C, e suporta repetidos congelamentos e descongelamentos, além de secagem e elevadas concentrações de sal. O pH ótimo para crescimento está entre 6 e 8, mas pode crescer em uma faixa de 5 à 9. A atividade de água ótima para seu crescimento é próxima a 0,97, contudo esta bactéria tem a capacidade de se multiplicar em atividade de água considerada baixa para a multiplicação de patógenos – 0,92 (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As necessidades nutricionais das espécies de *Listeria* são típicas das bactérias Gram-positivas. Pelo menos quatro vitaminas do complexo B são necessárias para seu metabolismo – biotina, riboflavina, tiamina e ácido tioctico (ácido lipóico; um fator de crescimento para algumas bactérias e protozoários), bem como os aminoácidos cisteína, glutamina, isoleucina e

valina. A glicose aumenta o crescimento de todas as espécies, sendo produzido como produto final o L(+) - ácido láctico (JAY, 2005).

L. monocytogenes é um patógeno de origem alimentar que tem sido encontrado em muitos vegetais prontos para o consumo (BEUCHAT; ADLER; LANG, 2004; CARRASCO et al., 2008). Isso se deve ao fato de estar presente frequentemente em ambiente agrário como solos, fezes de animais, lodo de esgoto, silagem, esterco, água, lama, sendo facilmente passível de ser veiculado para os produtos agrícolas (BEUCHAT, 2002). Ponniah et al. (2010) em um estudo realizado na Malásia, detectaram *L. monocytogenes* em 22,5% das hortaliças minimamente processadas analisadas. Entretanto, Porto; Eiroa (2001) e Fröder et al. (2007), encontraram, respectivamente, 3,2% e 0,6% de amostras positivas para esse patógeno entre as diversas amostras de vegetais pesquisadas nos mercados brasileiros (alface, salsa, agrião e espinafre).

Na área de processamento, *L. monocytogenes* pode ser introduzida por vários vetores, se estabelecer e multiplicar, particularmente em locais que são de difícil limpeza e sanitização, tornando-os focos de contaminação. As condições ambientais as quais os alimentos prontos para o consumo, como hortaliças minimamente processadas, são expostos podem ser uma fonte potencial do patógeno (ICMSF, 2002). Essa bactéria apresenta grande resistência a agentes antimicrobianos e substâncias químicas, além de ser capaz de forma biofilme sobre diferentes superfícies bióticas e abióticas, o que torna difícil sua eliminação (TAKHISTOV; GEORGE, 2004). Por essa razão, biofilmes de *L. monocytogenes* têm se tornado um constante desafio para controle em área de processamento de alimentos (SANDASI; LEONARD; VILJOEN, 2008), especialmente onde os alimentos são submetidos à intensa manipulação e não são submetidos a tratamento adicional, como é o caso das HMP.

Doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* têm gerado impacto sobre a saúde pública (GANDHI; CHIKINDAS, 2007), e estão associadas ao consumo de alimentos mantidos refrigerados, pois este micro-organismo consegue multiplicar-se em baixas temperaturas. Em mulheres grávidas, pode causar aborto, enquanto nas crianças e em pessoas com sistema imunológico debilitado pode levar a septicemia e meningite. Surtos de listeriose têm sido relatados na Austrália, Suíça, França e EUA, entre outros países (WHO, 2002). Por causa da ameaça potencial à saúde pública representada por *L. monocytogenes*, tanto a *Food and Drug Administration* (FDA) e da *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) impuseram políticas de "tolerância zero" para esta bactéria em alimentos prontos para consumo (SHEEN; HWANG; JUNEJA, 2011).

2.3 SANITIZAÇÃO DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

Na cadeia de produção de HMP, a operação de lavagem associada ao uso de soluções sanitizantes é considerada uma etapa crítica do processamento, sendo necessária para a remoção de sujeira, de resíduos de pesticidas, e, principalmente, para eliminação dos micro-organismos responsáveis pela deterioração e perda da qualidade desse tipo de produto (SAPERS, 2003; ALLENDE et al., 2008). Esses processos reduzem também o risco de doenças transmitidas por alimentos devido ao controle do crescimento bactérias patogênicas nestes substratos (SANTOS, 2007).

Segundo Moretti (2007), reduções significativas da população microbiana em hortaliças minimamente processadas podem ser obtidas com compostos sanitizantes. No entanto, a eficiência desses compostos na sanitização depende de fatores que atuam isoladamente ou em conjunto, como pH, temperatura da água, tempo de contato, natureza da superfície dos produtos e carga microbiana inicial. Além disso, sanitizantes químicos utilizados no tratamento são eficientes, mas algumas células podem sobreviver ou ser quimicamente injuriadas, recuperando-se e crescendo no alimento durante a estocagem, levando a perda do produto (LEE; BAEK, 2008).

Dentre os sanitizantes empregados na indústria de alimentos, principalmente em produtos frescos, a maioria é à base de cloro e compostos clorados (ALVARO et al., 2009). A facilidade do uso, o baixo custo e completa dissolução em água, fazem com que os agentes clorados sejam frequentemente utilizados como desinfetantes na indústria de frutas e hortaliças (ALLENDE et al., 2008).

A *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou como sanitizantes para hortaliças frescas e minimamente processadas o uso de hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e ozônio (FDA, 2002). Entretanto, dados sugerem que quaisquer dos métodos disponíveis, incluindo alguns dos mais novos agentes de desinfecção, como dióxido de cloro, ozônio e ácido peracético, não foram capazes de reduzir a população microbiana em mais de 90 ou 99 % (SAPERS, 2003).

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

clorados são mais efetivos em valores de pH baixos devido a proporção do ácido hipocloroso (responsável por controlar a ação sanitizante) ser mais elevada (MACÊDO et al., 2001).

O cloro possui um efeito limitado na redução de micro-organismos em superfícies de hortaliças, alcançando a proporção de um a dois ciclos logarítmicos na população microbiana (SAPERS, 2001; PARK et al., 2009), além de possuir a desvantagem de formar compostos clorados com potencial efeito carcinogênico (MARTÍN-DIANA et al., 2007; ALLENDE et al., 2008). O uso de compostos a base de cloro leva a possibilidade de uma hipercloração da água residual que, associada ao alto conteúdo de carbono orgânico, pode resultar em concentrações elevadas de trihalometanos (THM) e clorofórmio (CHCl_3), subprodutos indesejáveis suspeitos de serem potenciais carcinogênicos (RUIZ-CRUZ et al., 2007).

As concentrações recomendadas de cloro residual livre para a sanitização de frutas e hortaliças variam de 50 a 200 mg/L em um tempo de contato de 1 a 30 minutos (RUIZ-CRUZ et al., 2007). Concentrações muito elevadas podem causar problemas como descoloração do alimento, perda de qualidade e aumento na corrosão de equipamentos (PARK; LEE, 1995). Além disso, em razão dos sistemas de lavagem com soluções a base de cloro resultarem em subprodutos nocivos e, de apresentar eficácia restrita na redução de contaminantes, sanitizantes alternativos e inócuos têm sido investigados e pesquisados (ÖLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009).

O dióxido de cloro (ClO_2) é um gás estável dissolvido, com maior poder de penetração do que o hipoclorito de sódio, sendo mais eficaz contra os esporos. Ataca bactérias, pois reage com substâncias orgânicas da célula bacteriana, impedindo a ocorrência de diversas reações biológicas. As principais desvantagens do uso de ClO_2 são a sua instabilidade e a formação de subprodutos inorgânicos como cloretos e cloratos (SADIQ; RODRIGUEZ, 2004). Embora o uso do ClO_2 em alimentos seja permitido, existem poucos relatos sobre o uso em hortaliças minimamente processadas. Rodgers et al. (2004), demonstraram que, para a alface, uma solução de 5 ppm de ClO_2 foi eficaz para inibir *L. monocytogenes*. López-Gálvez et al. (2010), comparando a ação sanitizante de hipoclorito de sódio e dióxido de cloro, observaram que na dose de 3 mg/L o ClO_2 foi tão eficaz quanto o hipoclorito, não causando qualquer efeito negativo sobre a qualidade sensorial e sem levar à formação de THM. No entanto, diante da falta de conhecimento sobre a toxicidade dos subprodutos do ClO_2 e do seu impacto sobre a microbiota natural após a lavagem e armazenamento das hortaliças minimamente processadas, fazem-se necessários mais estudos.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é outro sanitizante potencial e é classificado como um composto GRAS (Geralmente Reconhecido Como Seguro) pela FDA, para uso em

alimentos como agente alvejante, oxidante, redutor e antimicrobiano, podendo de acordo com a concentração, ter um efeito bactericida ou bacteriostático. O principal objetivo do tratamento com peróxido de hidrogênio é estender a vida de prateleira pela redução da população de micro-organismos deterioradores na superfície do produto (SAPERS; SIMMONS, 1998). Resíduos em hortaliças tratadas com peróxido de hidrogênio podem ser eliminados passivamente pela ação da enzima catalase do próprio vegetal, ou, ativamente, pelo enxágue imediatamente após o tratamento, para evitar reações entre o peróxido de hidrogênio e constituintes do alimento que poderão afetar a qualidade ou a segurança do produto. O H_2O_2 isolado não é comumente utilizado como agente descontaminante, pois tanto sua ação sanitizante como sua eficiência são lentas (KOIVUNEN; HEINONEN – TANSKI, 2005). Geralmente, é aplicado em associação com ácido peroxiacético e comercialmente faz parte da composição das soluções de ácido peroxiacético, apresentando propriedade antimicrobiana importante (WAGNER; BRUMELIS; GEHR, 2002).

O ácido peroxiacético é uma combinação de ácido peracético (CH_3CO_3H) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), geralmente comercializado como um líquido, também utilizado para a limpeza de superfícies e dos alimentos (FDA, 2002). Devido a sua tolerância a vários fatores tais como temperatura, pH, dureza, contaminação do solo e presença de matéria orgânica a sua aplicação principal é no setor de produtos hortícolas processados (ARTÉS et al., 2009). Sua ação antimicrobiana primária está relacionada a produção de espécies reativas de oxigênio, causando também desnaturação de proteínas e enzimas, e aumento da permeabilidade da parede celular (SMALL et al., 2007). O FDA aprovou o uso de ácido peracético para a sanitização de produtos vegetais em concentrações que não ultrapassem 80 mg/L (RUÍZ-CRUZ et al., 2007). Entretanto possui desvantagens como instabilidade em altas concentrações (15%) e alto custo quando comparado com outros sanitizantes tradicionais (KUNIGK; ALMEIDA, 2001).

O ozônio (O_3), um agente oxidante potente, tem-se mostrado um sanitizante mais eficaz que o cloro para a eliminação de micro-organismos em produtos vegetais. Destrói os organismos por meio da oxidação dos componentes vitais da célula, evitando o crescimento microbiano e permitindo estender a vida de prateleira dos vegetais (PARISH et al., 2003). Entretanto, pesquisas adicionais são necessárias para definir seu potencial e os limites efetivos para seu uso, pois poucos estudos, dentre eles os de Kim; Yousef e Chusm (1999), Achen e Yousef (2001), e Singh et al. (2002), têm sido realizados para determinar seu efeito como sanitizante em produtos minimamente processados.

Além de algumas pesquisas ainda estarem estudando o potencial do O₃ e seu limite de uso, outras (BAUR et al., 2004; BELTRÁN et al., 2005; RICO et al., 2006) demonstram que sua aplicação pode não ser bem sucedida. Garcia; Mount e Davidson (2003), utilizando a combinação de ozônio e cloro na sanitização de saladas de alface minimamente processada, concluíram que a combinação de ozônio e cloro resultou em equivalentes ou melhores reduções microbianas e extensão da vida útil quando comparado ao cloro isolado. Entretanto, o ozônio não pôde substituir totalmente o cloro, pois este era necessário para se conseguir uma maior redução microbiana.

Um fato importante que merece destaque é que o uso descontrolado de antimicrobianos sintéticos tem sido responsável pelo surgimento de cepas microbianas progressivamente mais resistentes a diferentes compostos (KIESSLING et al., 2002). Vários autores reportam sobre o crescente número de isolamentos de cepas microbianas resistentes aos tradicionais procedimentos antimicrobianos aplicados pela indústria alimentícia (BRULL; COOTE, 1999; BURT, 2004). A resistência antimicrobiana é considerada uma consequência do amplo uso de antimicrobianos em todos os campos do controle do crescimento de micro-organismos. Estudos têm encontrado alguns micro-organismos associados à HMP resistentes a um ou mais compostos ou procedimentos antimicrobianos comumente aplicados na sanitização (HAMILTON-MILLER; SHAH, 2001; KARATZAS; BENNIK, 2002; RAJKOVIC et al, 2009).

Por estas razões, a eficácia e a segurança toxicológica de preservativos químicos e sintéticos vêm sendo colocada em questão nos últimos anos, elevando assim a demanda por alternativas naturais que venham a garantir a qualidade e segurança do produto final (SKANDAMIS; TSIGARIDA; NYCHAS, 2000). Além disso, muitas são as dificuldades e os desafios vividos pela indústria de hortaliças minimamente processadas, fazendo-se necessária a realização de trabalhos de pesquisa, com o objetivo de desenvolver novas tecnologias de conservação destes produtos (PINTO, 2007).

Dentre as alternativas propostas para indústria, destacam-se os óleos essenciais de plantas, considerados produtos naturais que possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana, apresentando eficácia no controle de bactérias patógenas e deteriorantes de importância em vegetais prontos para o consumo (BURT, 2004; GUTIERREZ et al., 2008; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; AZERÊDO et al., 2011).

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são uma mistura natural complexa de metabólitos secundários voláteis, caracterizados por um odor intenso e isolados por métodos de compressão, extração, fermentação ou, mais comumente usado na comercialização, por destilação a vapor (VAN DE BRAAK; LEIJTEN, 1999). A escolha da metodologia de extração empregada é bastante importante, pois pode influenciar na composição dos constituintes metabólicos desses óleos essenciais (BURT, 2004). A espécie vegetal, origem, época de colheita e condições climáticas em que a planta é produzida também podem ser fontes de variação na composição dos óleos essenciais.

São líquidos, límpidos e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos com densidade geralmente menor que a da água, podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta (broto, flores, folhas, caules, galhos, sementes frutos, raízes ou casca) e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008).

Óleos essenciais podem conter 100 ou mais compostos orgânicos, sendo os principais constituintes bioativos os terpenóides (mono e sesquiterpenos), compostos fenólicos (carvacrol, eugenol e timol), polifenólicos (quinonas, flavonas, taninos e cumarinas), glicosídeos, alcaloides, saponinas, mucilagens, flavonoides, compostos sulfidrílicos e elementos químicos específicos, onde os compostos fenólicos são considerados os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas (SANTOS et al., 2001).

A concentração desses princípios é um dos determinantes da ação terapêutica dos óleos essenciais. Esses apresentam atividade contra uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo vírus, fungos, protozoários e bactérias, tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas (PRASHAR et al., 2003), incluindo espécies resistentes a antibióticos clássicos, e ainda frente a leveduras e fungos filamentosos (BURT, 2004).

As principais vantagens dos óleos como agentes antimicrobianos são sua origem natural e a grande variedade de constituintes que possuem. Por isso, apresentam mais segurança para o consumidor e para o meio ambiente, sem riscos toxicológicos. Além disso, devido a sua grande variedade de constituintes, os quais, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de ação antimicrobiana, torna-se mais difícil uma possível adaptação dos micro-organismos, com baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003).

O sucesso da aplicação de óleos essenciais em diversos grupos de alimentos (carnes, peixes, produtos lácteos, cereais, frutas e hortaliças) foi relatado por Burt (2004). Entretanto, a eficácia antimicrobiana dos óleos depende do tipo, da sua composição e concentração, das concentrações do micro-organismo alvo, da composição do substrato e das condições de processamento e de armazenamento de alimentos (SOUZA, et al., 2006). Em um estudo verificou-se que em vegetais a atividade antimicrobiana de óleos essenciais foi beneficiada pela diminuição na temperatura e/ou diminuição do pH do alimento (SKANDAMIS; NYCHAS, 2000). Geralmente, os vegetais têm um baixo conteúdo de lipídios, o que contribui para o sucesso da aplicação dos óleos essenciais, pois na presença de grande quantidade de gordura os compostos terpênicos hidrofóbicos presentes nestas substâncias estariam menos disponíveis para interagir com as células bacterianas alvo.

Dentre os diversos óleos essenciais que apresentam atividade antimicrobiana, o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (*O. vulgare* L.), popularmente conhecido como orégano, tem mostrado destacáveis resultados *in vitro* na inibição de diferentes micro-organismos patogênicos e deteriorantes (SAHIN et al., 2004; SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2007). Estes achados têm motivado a realização de estudos com sistemas alimentares (GUTIERREZ et al., 2008; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008), a partir dos quais se pôde observar que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* L. pode ser fortemente afetada pela composição do alimento. Este fato poderia então levar a um aumento das quantidades necessárias do óleo essenciais para inibir substancialmente o crescimento de bactérias em matrizes alimentares, sendo esses níveis muitas vezes superiores aos aceitáveis quando considerado os impactos organolépticos nos alimentos (OLIVEIRA et al., 2010).

Outro óleo com efeito antimicrobiano potencial é o da espécie *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), conhecida popularmente como alecrim, uma especiaria procedente da Região Mediterrânea, pertencente à Família Lamiaceae e conhecida desde a antiguidade por seus efeitos medicinais. Na região Nordeste do Brasil, as folhas de *R. officinalis* L. têm sido utilizadas popularmente com propriedades anti-hipertensiva e digestiva (AGRA et al., 2007). O óleo essencial é obtido, principalmente, de suas folhas e parte floridas (LORENZI; MATOS, 2006).

Muitos dos seus compostos são apontados como inibidores de micro-organismos patogênicos e deteriorantes como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *P. fluorescens* e *Escherichia coli* (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002). No entanto, Porte e Godoy (2001) alertam

que as concentrações de *R. officinalis* L., para exercerem os efeitos antibacterianos desejados, são maiores que as utilizadas costumeiramente em alimentos para propósitos flavorizantes.

Um fator importante então a ser ressaltado é que a ação combinada de óleos e/ou seus constituintes pode potencializar o efeito antimicrobiano, como verificado por Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008) e Lambert et al. (2001). No estudo realizado por Azerêdo et al. (2011) verificou-se efeito sinérgico entre os óleos essenciais de orégano e alecrim, cujos componentes majoritários são, respectivamente, carvacrol e 1,8-cineol, frente à *A. hydrophila*, *L. monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*, e efeito aditivo contra *P. fluorescens*.

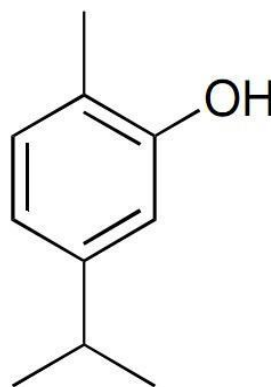
Como os óleos essenciais e seus constituintes são compostos GRAS, a sua adição combinada pode alcançar um equilíbrio entre a eficácia antimicrobiana, frente a bactérias patogênicas e deteriorantes comumente encontradas em HMP, e a aceitação sensorial, tornando-se um produto com potencial aplicação como antimicrobiano nestes substratos (DIMITRIJEVIĆ et al., 2007).

2.4.1 Carvacrol e 1,8-cineol

Os óleos essenciais apresentam composição complexa podendo conter cerca de 20 – 60 componentes em diferentes proporções. Os constituintes majoritários podem constituir até 85% do seu total como, por exemplo, o carvacrol com 66,9% no óleo essencial de *O. vulgare* L. e o 1,8-cineol com 32,2% no óleo essencial de *R. officinalis* L., enquanto outros compostos aparecem apenas em quantidades traço (GALINDO; PULTRINI; COSTA, 2010; AZEREDO et al., 2011). Estudos têm confirmado a atividade antimicrobiana de compostos presentes em óleos essenciais de plantas, especialmente os compostos terpênicos carvacrol (fenol) e 1,8-cineol (óxido) (OLIVEIRA et al., 2010; STOJKOVIC et al., 2011).

O carvacrol (Figura 1), composto fenólico monoterpênóide biosintetizado a partir do γ -terpineno e p-cimeno, pode ser o principal responsável pela destacável atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano. Este componente foi aprovado pela FDA para uso alimentar e foi incluído pelo *Council of Europe* na lista de aromas químicos que podem ser adicionadas a gêneros alimentícios em níveis que variam de 2 a 25 ppm (DE VINCENZI et al., 2004).

Figura 1 – Estrutura química da molécula de carvacrol



Fonte: Bakkali et al. (2008).

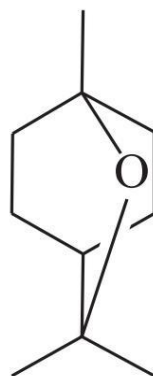
Aligiannis et al. (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum scabrum*, rico em carvacrol (74,86 %), e encontraram valores de CIM variando entre 0,28 e 1,27 mg/mL para diferentes micro-organismos, incluindo bactérias e leveduras. Ben Arfa et al. (2006) avaliaram a capacidade antimicrobiana do carvacrol e obtiveram, pelo método de diluição em caldo, valores de CIM de 0,25 g/L para *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, 1 g/L para *P. fluorescens*, e > 3 g/L para *Lactobacillus plantarum*. No estudo realizado por Kaloustian et al. (2008), a CIM do carvacrol, encontrada por meio da mesma técnica, para ambos micro-organismos testados (*E. coli* ATCC 10536 e *S. aureus* ATCC 6538) foi de 400 g/L. Estes autores verificaram que este composto fenólico puro apresentou atividade superior a do óleo essencial de orégano avaliado, que possui 98,3% de carvacrol em sua composição. Em outro estudo, carvacrol exibiu valor de CIM contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 de 0,62 µL/mL (LUZ et al., 2012).

A composição química do óleo essencial de alecrim (*R. officinalis* L.) inclui vários constituintes como canfora, 1,8-cineol, α -pineno e borneol (SANTOYO et al., 2005), com destaque para componente majoritário 1,8-cineol (Figura 2), um monoterpênico cíclico também denominado de eucaliptol. 1,8-cineol foi reconhecido como um composto seguro pela *Flavor and Extract Manufacturer's Association* (FEMA) em 1965 e aprovado pela FDA para o uso em alimentos (DE VINCENZI et al., 2002).

Em seu estudo Sandri et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Cunila incisa* e *Cunila spicata*, contendo 1,8-cineol em concentrações de 42,9g/100g e 47,9g/100g, respectivamente, e verificaram que tais compostos foram capazes de inibir o crescimento de *A. hydrophila* e *L. monocytogenes* com CIM variando entre 2,5-5 mg/mL. Mulyaningsih et al. (2010) obtiveram valores de CIM do 1,8-cineol para 13 micro-

organismos, incluindo bactérias Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Acinetobacter baumannii* ATCC BAA 747), Gram-positivas (*B. subtilis* ATCC 6051, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *S. pyogenes* ATCC 12344, *S. agalactiae* ATCC 27956, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e leveduras (*Candida albicans* ATCC 90028 e *C. glabrata* ATCC MYA 2950), variando entre 8 e 64 mg/mL. Em outro estudo, ao avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, com a concentração de 45,4% de 1,8-cineol, Tyagi e Malik (2010) encontraram valor de CIM de 9 mg/mL contra *P. fluorescens*.

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



Fonte: Moraes et al. (2006).

Ao avaliar a ação antimicrobiana de carvacrol e 1,8-cineol frente a *L. monocytogenes*, *P. fluorescens* e *A. hydrophila*, bactérias contaminantes de HMP, Sousa et al (2012a) verificaram um efeito sinérgico entre os compostos em concentrações sub-inibitórias. Essa combinação constitui uma abordagem interessante para limpeza e sanitização desses vegetais. Os valores de CIM encontrados nesse estudo variaram entre 0.6 - 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para o carvacrol e 5 - 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para o 1,8-cineol.

2.4.2 Mecanismos de ação de constituintes de óleos essenciais

Como citado anteriormente atribui-se a atividade antimicrobiana de óleos essenciais principalmente aos terpenos presentes em sua composição, como por exemplo, o carvacrol e o 1,8-cineol. Segundo Turina et al. (2006), o mecanismo de ação do carvacrol se dá pela sua capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática, causando uma

considerável perda de Adenosina Trifosfato (ATP) citoplasmático (ULTEE; SMID, 2001). O aumento da permeabilidade ocorre devido à sua capacidade em se dissolver na bicamada lipídica alinhando-se entre as cadeias de ácidos graxos, e levando à distorção e desestabilização da membrana, como aumento da sua fluidez e incremento de sua permeabilidade passiva. Esta capacidade é atribuída ao grupo hidroxil (OH) no anel fenólico, particularidade que lhe confere um alto poder reativo (BEN ARFA et al., 2006).

O 1,8-cineol também apresenta a propriedade de penetrar na membrana citoplasmática e alterar sua permeabilidade, ocasionando a perda de material citoplasmático. A dissipação do gradiente iônico conduz a alterações no processo de multiplicação da célula, permitindo o extravasamento dos seus constituintes internos, como íons, ATP, ácidos nucleicos e aminoácidos, resultando em modificações do balanço osmótico, colapso do potencial de membrana, coagulação do conteúdo citoplasmático, inibição da síntese de ATP, condensação do material genético e finalmente a morte celular (ULTEE; KETS; SMID, 2011). Cox et al. (2001) demonstraram que nem todos estes mecanismos ocorrem de forma separada, de modo que alguns deles, possivelmente, possam ser ativados como consequência dos outros mecanismos previamente desencadeados.

Constituintes de óleos essenciais com estruturas e mecanismos de ação diferentes podem ser utilizados em combinação com a finalidade de se obter uma ação antimicrobiana mais potente. Combinação de compostos com estruturas semelhantes podem apenas apresentar um efeito aditivo ou indiferente em vez de um efeito sinérgico. O sinergismo entre estes dois compostos estudados pode ser explicado pelo fato do grupo oxigenado presente na molécula do 1,8-cineol propiciar um aumento na propriedade antimicrobiana de compostos terpenóides, como por exemplo, o carvacrol (GUTTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

A alteração da permeabilidade da membrana e das paredes celulares das bactérias deve-se ao caráter lipofílico dos óleos essenciais e seus componentes, os quais se acumulam nesses locais. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa, que contém lipopolissacarídeos, formando assim uma superfície hidrofílica, a qual cria uma barreira à permeabilidade das substâncias hidrofóbicas, aumentando a resistências aos antibióticos de característica apolar. Entretanto, a membrana externa não é impermeável às moléculas hidrofóbicas que contem fenóis em sua estrutura, a exemplo do carvacrol, que consegue penetrar e ter acesso ao periplasma dessas bactérias (HELANDER et al., 1998; DORMAN; DEANS, 2000).

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

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

Azerêdo et al. (2012) ao avaliar a ação dos óleos essenciais de orégano e alecrim, cujos componentes majoritários são carvacrol e 1,8-cineol, respectivamente, frente a *A. hydrophila* observaram que ocorreu liberação de material citoplasmático, redução do consumo de glicose e comprometimento na morfologia da parede celular e membrana citoplasmática. Em outro estudo, observou-se que concentrações sub-inibitórias do carvacrol e 1,8-cineol isoladamente e em combinação alteraram a morfologia de *P. fluorescens*, sendo um indicativo de aumento da permeabilidade da membrana e da perda da integridade do invólucro da bactéria, conduzindo à morte celular (SOUSA et al, 2012b).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo experimental foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa – PB; no Laboratório de Biologia Celular e Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) – FIOCRUZ, Recife – PE; e no Laboratório de Microscopia do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife – PE.

3.1 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

Os constituintes carvacrol (CAR) e 1,8-cineol (CIN) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda. As soluções destes constituintes foram preparadas em caldo nutriente ou em caldo base vegetais, com concentrações variando de 160 a 0,015 $\mu\text{L}/\text{mL}$, utilizando-se ágar bacteriológico (0,15 % p/v) como agente estabilizador da solução (BENNIS et al., 2004).

3.2 MICRO-ORGANISMOS TESTE

As cepas tipo padrão de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 11253) e *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), obtidas a partir da Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa, Brasil), foram utilizadas como micro-organismos teste nos ensaios antimicrobianos. Culturas estoque foram mantidas em ágar Infusão Cérebro Coração (BHI) (Himedia, Índia) inclinado sob refrigeração (7 ± 1 °C).

3.3 INÓCULO MICROBIANO MISTO

Os inóculos das cepas bacterianas utilizados nos ensaios antimicrobianos foram obtidos a partir de culturas crescidas *overnight* de cada cepa, cultivadas em ágar BHI inclinado (Himedia, Índia) e incubadas a 35 °C para *L. monocytogenes* e a 28 °C para *A. hydrophila* e *P. fluorescens* durante 18 h (SOUSA et al., 2012a). Ao término do período de incubação, as culturas foram diluídas em solução salina (NaCl 0,85% p/v) estéril, para obtenção de população bacteriana de aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL), correspondente à turvação do tubo 0.5 da escala McFarland. Em seguida, a suspensão foi diluída em serie (1:9 v/v) em solução salina tamponada (PBS; 10^{-1}), para que

fosse alcançada uma contagem de células viáveis de aproximadamente 7 log UFC/mL. Por fim, foi realizada a mistura dos inóculos de cada cepa dos micro-organismos na proporção de 1:1:1 (para formação de um *pool*), o qual foi utilizado nos ensaios antimicrobianos.

3.4 PREPARAÇÃO DO CALDO VEGETAL

Alface (*Lactuca sativa* L.), acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) e rúcula (*Eruca sativa* L.) foram adquiridas de um mercado atacadista da cidade de João Pessoa (Paraíba, Brasil) nos dias das análises e sempre no início da manhã, sendo selecionadas as hortaliças que não apresentaram quaisquer sinais de alteração de causa biológica, química e/ou física. As mesmas foram transportadas dentro de 20 min em caixas isotérmicas com gelo para o Laboratório, onde foram realizadas as análises. Uma mistura (1:1:1) das amostras, contendo 60 g de cada hortaliça, foi triturada com 400 mL de água destilada utilizando um liquidificador doméstico e filtrada a vácuo utilizando papel de filtro Whatman nº. 1. O material obtido foi esterilizado por meio de filtração em Millipore 0,22 µm (AZERÊDO et al., 2011).

3.5 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.5.1 Determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima dos compostos testados foi determinada através da técnica de macrodiluição em caldo (NOSTRO et al., 2001). Para isso, tubos contendo 4 mL de caldo nutriente (Himedia, Índia) foram inoculados com 1 mL da suspensão bacteriana (inóculo misto), misturados com 5 mL da solução de cada composto testado, e agitados em vortex por 30 segundos. O sistema foi estaticamente incubado por 24 h a 35°C. Os valores de CIM foram definidos como a mais baixa concentração do constituinte requerida para evitar crescimento bacteriano visível. Frascos isentos dos constituintes testados foram utilizados como controle.

3.5.2 Avaliação do efeito da ação combinada dos constituintes

O estudo da natureza do efeito antibacteriano decorrente da aplicação combinada de carvacrol e 1,8-cineol frente às cepas bacterianas teste em inóculo misto foi realizado através

da determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (CIF). Para isso, foi utilizado o procedimento de macrodiluição como descrito no item anterior. O valor de CIF foi calculado como segue: (CIM do CAR em combinação com CIN / CIM do CAR isoladamente) + (CIM do CIN em combinação com CAR / CIM do CIN isoladamente).

CAR e CIN foram combinados em diferentes concentrações que variaram entre CIM, 1/2 CIM, 1/4 CIM, 1/8 CIM, 1/16 CIM e 1/32 CIM, para cada composto. A ocorrência de efeito sinérgico foi definido como segue: sinergismo, como índice de CIF $\leq 0,5$; adição, como índice de CIF $> 0,5$ a 4; e antagonismo, índice de como CIF > 4 (MACKAY; MILNE; GOULD, 2000; HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; AZERÊDO et al., 2011).

3.5.3 Interferência dos constituintes sobre a cinética de crescimento bacteriano

Os ensaios de interferência do CAR e CIN isolado (CIM) e em combinação sobre a viabilidade das cepas bacterianas em caldo vegetal ao longo de 24 h foi avaliada pelo método de contagem de células viáveis. Para isso, 4 mL de caldo vegetal foi inoculado com 1 mL da suspensão bacteriana (inoculo misto), em seguida adicionado 5 mL da solução de CAR ou CIN (CIM) ou combinado em concentrações sub-inibitórias e, por fim, suavemente agitado por 30 segundos. O sistema foi então incubado a 7 °C. Em diferentes intervalos de tempos (0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h), uma alíquota de 1 mL da suspensão foi seriadamente diluída (1:10 v/v) de 10^{-1} a 10^{-5} em PBS e uniformemente inoculada em placas de Petri estéreis contendo meio seletivo estéril para os microrganismos testes: *Listeria* Agar Base seletivo + Suplemento seletivo para *Listeria* II (Himedia , Índia); Meio isolamento de *Aeromonas* + Suplemento Seletivo para *Aeromonas* (Himedia, Índia); e Ágar Base *Pseudomonas* + Suplemento CFC (Himedia , Índia), sendo então incubadas por 24 h a 35 °C (SOUSA et al., 2012a). No experimento controle, a solução de cada constituinte foi substituída por 5 mL de água destilada estéril. Após o término do período de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL (SAGDIÇ, 2003).

3.5.4 Efeito dos constituintes sobre a sobrevivência de bactérias potencialmente patogênicas em hortaliças minimamente processadas

Porções de 90 g de um *pool* de alface, acelga e rúcula (em uma proporção de 1:1:1) previamente lavadas com água destilada foram cortadas, utilizando as mãos cobertas por luvas

descartáveis estéreis, e inoculadas com as cepas teste de acordo com o procedimento a seguir: a porção de hortaliças foi submersa em 900 mL do inóculo bacteriano (*L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *P. fluorescens* em uma proporção de 1:1:1, aproximadamente log 7 UFC/mL), suavemente agitado com um bastão de vidro estéril por 5 min, para assegurar uma boa inoculação, e secas durante 1 h em uma cabine de biossegurança. Após esse período, as hortaliças foram submergidas em 250 mL das soluções dos constituintes isolados (CIM) ou em combinação (1/8 CIM CAR + 1/8 CIM CIN) por 5 minutos a 35 °C. Em seguida, uma amostra de 25 g das hortaliças foi tomada de forma asséptica e transferida para um saco Stomacher estéril contendo 225 mL de água peptonada estéril (1 g/L) e homogeneizada por 60 s. Posteriormente, uma série de diluições decimais (10^{-2} - 10^{-5}) foi realizada no mesmo diluente e a enumeração de bactérias foi determinada pela inoculação por superfícies de 0,1 mL de cada diluição da amostra em ágar seletivo estéril após incubação à 35 °C por 24 h (XU et al., 2007).

3.6 TESTES DE AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS DANOS CAUSADOS À CÉLULA BACTERIANA

3.6.1 Microscopia confocal

Células das cepas teste em inóculo misto foram expostas em caldo vegetal aos constituintes isolados (CIM) e combinados em concentrações sub-inibitórias por 15 e 30 min e, em seguida coradas com SYTO9 e Iodeto de Propídio (PI) (LIVE/DEAD BacLight kit, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA), preparado como descrito pelo fabricante. A coloração dupla com PI e SYTO9 foi realizada incubando-se as amostras com 1,50 μ M de PI e 250.5 nM de SYTO9 em temperatura ambiente por 15 min. Uma alíquota da suspensão bacteriana exposta a álcool isopropílico (700 mL/L) por 1 h a fim de permeabilizar as membranas celulares, sendo utilizado como controle positivo de morte celular. Células bacterianas não expostas aos constituintes foram testadas de maneira semelhante como um controle negativo. As amostras foram observadas utilizando microscópio confocal Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) em excitação/emissão de comprimento de onda de 480/500 nm para SYTO 9 e 490/635 nm para iodeto de propídio (LEONARD et al., 2010; OTTO et al., 2010). As imagens coletadas foram analisadas utilizando o programa Lite 2.0. SYTO 9 cora todas as células de verde fluorescente, enquanto PI penetra apenas nas células cujas membranas foram danificadas, corando-as de vermelho.

3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura

As cepas teste, em cultura mista, foram inoculadas em caldo vegetal e expostas aos constituintes isolados (CIM) e em combinação (1/8 CIM CAR + 1/8 CIM CIN) durante 1 e 4 horas. Em seguida foram separadas do caldo de crescimento por centrifugação a 10.000 x g por 12 min a 4 °C, lavadas em PBS e pré-fixadas em glutaraldeído (0,25 g/L) por 24 h a 4 °C. Após lavagem as células foram pós-fixadas por 30 min com tetróxido de ósmio (0,01 g/L) em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) e em seguida aderidas à lamínulas de poli-lisina-revestido. As amostras foram então desidratadas em etanol em ponto crítico de secagem com CO₂, revestida com uma camada de ouro de 20 nm e observadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 FEG (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) Células bacterianas não expostas aos fitoconstituintes foram fixadas e observadas da mesma forma como um controle (TYAGI; MALIK, 2010).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva (média e desvio padrão). O comportamento das variáveis segundo o critério de normalidade da distribuição foi avaliado por meio da aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$). Para comparação entre as médias e determinação das diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados foi utilizado ANOVA, seguido de teste de estatística inferencial (teste de Duncan). Para o tratamento estatístico, foi utilizado o software Sigma-Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia), enquanto para confecção dos gráficos foi utilizado o software Statistica versão 7.

REFERÊNCIAS

ACHEN, M.; YOUSEF, A. E. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 9, p. 1380-1384, 2001.

AGRA, M.F; FRANÇA, P.F; BARBOSA-FILHO, J.M.. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALEGRE, I. et al. Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 70–76. 2010.

ALEXOPOULOS, A. et al. Evaluation of ozone efficacy on the reduction of microbial population of fresh cut lettuce (*Lactuca sativa*) and green bell pepper (*Capsicum annuum*). **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 491–496, 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.

ALLENDE A. et al. Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 1, p. 155–163, 2008.

ALVARO, J. E. et al. Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 1, p.11-15, 2009.

ARTÉS, F. et al. Improved strategies for keeping overall quality of fresh-cut produce. **Acta Horticulturae**. v. 746, n. 1, p. 245-258, 2007.

ARTÉS, F. et al. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. **Postharvest Biology and Technology**, v.51, n. 3, p. 287-296, 2009.

AZEREDO, 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.

AZEREDO, G.A. et al. The Cytotoxic Effect of Essential Oils from *Origanum vulgare* L. and/or *Rosmarinus officinalis* L. on *Aeromonas hydrophila*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 4, p. 298-304, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BAUR, S. et al. Sensory and microbiological quality of shredded, packaged iceberg lettuce as affected by pre-washing procedures with chlorinated and ozonated water. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n.1, p. 45-55, 2004.

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

BELTRÁN, D. et al. Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging. **Postharvest Biology and Technology**, v. 37, n. 1, p. 37-46, 2005.

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.

BENNIS, S. et al. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38,n. 6, p. 454-458, 2004.

BERIAM, L. O. S. Doenças bacterianas em hortaliças. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 81-84, 2007.

BEUCHAT, L.R.; ADLER, B.B.; LANG, M.M. Efficacy of chlorine and a peroxyacetyc acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and Romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1238-1242, 2004.

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

BRACKETT, R.E. Incidence, contributing factors and control of bacterial pathogens from in produce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, n. 3, p. 305-311.1999.

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

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n.3, p. 223-253, 2004.

CARMICHAEL, I.S. et al. Bacterial colonization and biofilm development on minimally processed vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 45-51, 1999.

CARRASCO, E. et al. Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. **Food Control**, v. 19, n. 5, p. 487-494, 2008.

CORTEZ-VEGA, W. R. et al. Conservação de mamão minimamente processado com uso de revestimento comestível à base de goma xantana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1753-1764, 2013.

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

COX, S. D. ; MANN, C. M.; MARKHAN, J. L.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. Determination of the antimicrobial action of tea tree oil. **Molecules**, v. 6, n. 2, p. 87-91, 2001.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinérea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44. 2003.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v. 17, n. 6, p. 474-483, 2006.

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

DE VINCENZI, M. et al. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7-8, p. 801-804, 2004.

DIMITRIJEVIĆ, S.I. et al. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgares* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 774-782, 2007.

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.

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

ELHARIRY, H.M. Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 1, p. 125-131, 2011.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M.C.D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 207-211, 2004.

FDA – Food and Drug Administration. **Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables**. 2008. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/ucm064458.htm>>. Acesso em: 10 out. 2013.

FDA – Food and Drug Administration. **Secondary direct food additives permitted in food for human consumption**. 2002. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

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

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

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

FREILICH, S. et al. Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. **Nature Communications**, 2:589 doi: 10.1038 / ncomms1597, 2011.

FRÖDER, H. et al. Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 5, p. 1277–1280, 2007.

GALINDO, L.A.; PULTRINI, A.M.; COSTA, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v.64, n.4, p. 436-41, 2010.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: a foodborn pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 1-17, 2007.

GARCIA, A.; MOUNT, J. R.; DAVIDSON, P. M. Ozone and chlorine treatment of minimally processed lettuce. **Food Microbiology and Safety**, v. 68, n.9, p. 2747-2751, 2003.

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.

GIMÉNEZ, M. et al. Relation between spoilage and microbiological quality in minimally processed artichoke packaged with different films. **Food Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 231-242, 2003.

GOMES, C. A. O. et al. **Hortalças minimamente processadas**. Brasília-DF: Ed. EMBRAPA, 2005. 34 p.

GOPAL, A. et al. Alternative disinfection techniques to extend the shelf life of minimally processed iceberg lettuce. **Food Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 210–219, 2010.

GUAN, T.Y. et al. Fate of foodborn bacterial pathogens in pesticide products. **Journal of the science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 5, p. 503-512, 2001.

GUTIERREZ, J. et al. Efficacy of plant essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready to eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 9, p. 1946-1854, 2008.

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

GLEESON, E.; O’BEIRNE, D. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. **Food Control**, v. 16, n. 8, p. 677-685, 2005.

HAMILTON-MILLER, J.M.T.; SHAH, S. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, n.1, p. 81-83, 2001.

HELANDER, I.M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.9, p. 3590–3595, 1998.

HEMAISWARYA, S., KRUTHIVENTI, A. K., DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v.15, n. 8, p. 639–652, 2008.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods: microbiological testing in food safety management**. New York: Kluwer Academic Plenum. v. 7, cap.11, 2002. 6362p.

IFPA – International Fresh-cut Produce Association. **More than 50 years of growth**. Washington, DC, EUA, p. 18-25, 1999.

ISONHOOD, J., H.; DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 3, p. 575-582, 2002.

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

KALOUSTIAN, J. Et al. Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. **Phytothérapie**, v. 6, n.3, p. 160-164, 2008.

KARATZAS, K. A. G., BENNIK, M. H. J. Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3183–3189, 2002.

KASSEN, R., LLEWELLYN, M., RAINEY, P. B. Ecological constraints on diversification in a model adaptive radiation. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 984–988, 2004.

KIESSLING, C.R. et al. Antimicrobial resistance of food retail *Salmonella* isolates. **Journal of Food Protection**, v.65, n. 4, p. 603-608, 2002.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; CHISM, G. W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. **Journal of Food Safety**, v. 19, n.1, p. 17-34, 1999.

KINGOMBE, C.I.B.; et al. The usefulness of molecular techniques to assess the presence of *Aeromonas* spp. Harboured virulence markers in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 113–121, 2004.

KIRISITS, M. J. et al. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4809–4821, 2005.

KOIVUNEN, J.; HEINONEN – TANSKI, H. Inactivation of enteric micro-organisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. **Water Research**, v. 39, n.8, p. 1519-1526, 2005.

KUNIGK, L; ALMEIDA, M.C.B. Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 38-41, 2001.

LAMBERT, R.J.W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LEONARD, C.M. et al. Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 676-680, 2010.

LEE, S.Y.; BAEK, S.Y. Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. **Food Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 582-587, 2008.

LÓPEZ-GÁLVEZ, F. et al. Suitability of aqueous chlorine dioxide versus sodium hypochlorite as an effective sanitizer for preserving quality of fresh-cut lettuce while avoiding by-product formation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 53-60, 2010.

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

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, 2012.

MACÊDO, J.A.B. et al. Cloraminas orgânicas uma solução para evitar a formação de trihalometanos no processo de desinfecção de águas para o abastecimento público. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 90/91, p. 93–103, 2001.

- MACKAY, M.L.; MILNE, K.; GOULD, I.M. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. **International Journal Antimicrobial and Agents**, v. 15, n. 2, p. 125-129, 2000.
- MARTÍN-DIANA, A. B. et al. Efficacy of steamer Jet-injection as alternative to chlorine in fresh-cut lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 97-107, 2007.
- MASSON, Y. et al. Crescimento de *Pseudomonas fluorescens* e *Candida* causa em cogumelos homogeneizados sob atmosfera modificada. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 2, p. 125-131, 2002.
- MCMAHON, M.A.S.; WILSON, I.G. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n. 1-2, p.155-162, 2001.
- MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 369-374, 2000.
- MORAIS, S. M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5 p. 907-910, 2006.
- MORETTI, C.L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Brasília-DF: Ed. EMBRAPA, 2007. 527p.
- MULYANINGSIHA, S. et al. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1061-1066, 2010.
- NAGAR, V.; SHASHIDHAR, R.; BANDEKAR, J.R. Prevalence Characterization and Antimicrobial Resistance of *Aeromonas* Strains from Various Retail Food Products in Mumbai, India. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3 p. 486-492, 2011.
- NAZER, A. I. et al. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect?. **Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 391–398, 2005.
- NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. **Plantas medicinais – guia para profissional de saúde**. São Paulo: Premier, 2002. p. 59-63.

NG, J.P.; FLEET, G.H.; HEARD, G.M. Pesticides as a source of microbial of salad vegetables. **International Journal of food Microbiology**, v. 101, n. 2, p. 237-250, 2005.

NGUYEN - The, C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 4, p. 371-401, 1994.

NOSTRO, A. et al. Effects of *Helichysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 17, n. 6, p. 517-520, 2001.

ODUMERU, J.A. et al. Assessing of a thermal-chemical process to extend the shelf life of ready-to-use lettuce. **Journal of Food Quality**, v. 26, n. 3, p. 197-209, 2003.

OLIVEIRA, M.A. et al. Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PC. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 19-23, 2010.

ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n.3, p. 686–693, 2009.

OMAFRA – Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. **Minimally Processed Fruit and Vegetables: Good Manufacturing Practices Guidebook**. Toronto, Canada. 2006. 171p.

OMS-OLIU, G.; Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 139-148, 2010.

OTTAVIANI, D.; et al. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 538– 545, 2011.

OTTO, C. C. et al. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, p. 26, 2010.

PARISH, M. et al. Methods to reduce or eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, p. 161-173, 2003.

PARK, E.J. et al. The decontaminative effects of acidic electrolyzed water for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on green onions and tomatoes with differing organic demands. **Food Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 386-390, 2009.

PARK, W. P.; LEE, D. S. Effect of chlorine treatment on cut watercress and onion. **Journal of Food Quality**, v.18, n.5, p. 415-424, 1995.

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

PONCE, A.G. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 294–300, 2008.

PONNIAH, J. et al. *Listeria monocytogenes* in raw salad vegetables sold at retail level in Malaysia. **Food Control**, v. 21, n.5, p. 774-778, 2010.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

PORTO, E.; EIROA, M. N. U. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Vegetables. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 21 n. 4, p. 282-286, 2001.

PRASHAR, A. et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martini*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 569-575, 2003.

RAGAERT, P.; DEVLIEGHIERE F.; DEBEVERE, J. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v.44, n. 3, p. 185-194, 2007.

RAJKOVIC, A. et al. Resistance of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* after exposure to repetitive cycles of mild bactericidal treatments. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 889–895, 2009.

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

- RICO, D. et al. Effect of ozone and calcium lactate treatments on browning and texture properties of fresh-cut lettuce. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 8, p. 2179-2188, 2006.
- RODGERS, S. et al. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 4, p. 721-731, 2004.
- RUÍZ-CRUZ, S. et al. Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. **Food Control**, v. 18, n. 11, p. 1383-1390, 2007.
- SADIQ, R.; RODRIGUEZ, M.J. Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and the predictive models for their occurrence: a review. **Science of the Total Environment**, v. 321, n. 1-3, p. 21-46, 2004.
- SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogens pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrossols. **Lebensmittel Wissenschaft and Technology**, v. 36, n. 5, p. 467-473, 2003.
- SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 549-557, 2004.
- SANDASI, M.; LEONARD, C.M.; VILJOEN, A.M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19, n. 11, p. 1070-1075, 2008.
- SANDRI, I.G. et al. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 823-828, 2007.
- SANTOS, R.I. et al. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. (ed). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. ed. 3. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
- SANTOS, Y. T. L. Qualidade sanitária de hortaliças cultivadas em um distrito sanitário de Salvador-BA e eficiência de soluções antimicrobianas sobre linhagens de *Escherichia coli*. Salvador. **Dissertação. Universidade Federal da Bahia-UFBA**, 46, 2007.
- SANTOS, I.; CUNHA, I. Patógenos emergentes em alimentos. **Segurança e qualidade Alimentar**, v. 1, n. 2, p. 10-13, 2007.

SANTOYO, S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 4, p. 790-795, 2005.

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

SAPERS, G.M. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 5–11, 2001.

SAPERS, G. M.; SIMMONS, G. Hydrogen peroxide disinfection of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 52, n. 2, p. 48-52, 1998.

SHEEN, S., HWANG, C.-A; JUNEJA, V.K. Modeling the impact of chlorine on the behavior of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 1095–1100, 2011.

SIGMASTAT version 3.5, Systat software, Jandel Scientific, San Jose, California, USA. Integrated with SigmaPlot 10.0 for Windows [Computer program], 2007.

SINGH, N. et al. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. **LWT – Food Science and Technology**, v. 35, n. 8, p. 720-729, 2002.

SILVA, S.R.P. et al. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 594-598, 2007.

SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.J.E. Development and evaluation of a model predicting the survival of *E. coli* O157H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1646-1653, 2000.

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G.-J.E. Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 31-35, 2000.

SKOVGAARD, N. New trends in emerging pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 217-224, 2007.

- SMALL, D.A. et al. Comparative global transcription analysis of sodium hypochlorite, peracetic acid, and hydrogen peroxide on *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 5, p. 1093-1105, 2007.
- SOLIMAN, K. M.; BADEAA, R. I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food Chemical Toxicology**, v. 40, n. 11, p.1669-1675, 2002.
- 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. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.
- 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**, n. 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.
- STOJKOVIC, D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 1017-1022, 2011.
- STOSKOPF, M. K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, p. 269-277, 1993.
- SUSLOW, T. **Microbial food safety is your responsibility!** University of California, Vegetable Research Information Center, 2002, p.7.
- TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. Early events and pattern formation in *Listeria monocytogenes* biofilms. **Biofilms**, v.1, n. 1, p.351-359, 2004.
- TEIXEIRA, G.H.A. et al. Processamento mínimo de mamão formosa. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 47-50, 2001.
- TURINA, A.V. et al. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 101-113, 2006.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 205-210, 2010.

ULTEE, A., SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 373-378, 2001.

ULTEE, A.; KETS, P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 2011.

UYTTENDAELE, M. et al. Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water, or thyme essential oil solution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 263-271, 2004.

VAN DE BRAAK, S. A. A. J.; LEIJTEN, G. C. J. J. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, **Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries**, p. 116, 1999.

VANETTI, M. C. D. Controle microbiológico e higiene no processamento mínimo. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 2, 2000, Viçosa, **Palestras...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. p. 44-52.

WAGNER, M.; BRUMELIS, D.; GEHR, R. Disinfection of waste water by hydrogen peroxide or peracetic acid: development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent. **Water Environment Research**, v. 74, n.1, p. 33-50, 2002.

WHO – World Health Organization. **Foodborne diseases emerging**. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en/>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

XANTHOPOULOS, V.; TZANETAKIS, N; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Occurrence and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in minimally processed fresh vegetable salads. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 393–398, 2010.

XU, W. et al. Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n.1, p. 126-133, 2007.

ZHOU, T. et al. Determination of acceptability and shelf life of ready-to-use lettuce by digital image analysis. **Food Research International**, v. 37, n. 9, p. 875-881, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL

Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole

Running title: Antibacterial effects of carvacrol and 1,8-cineole

Kataryne Árabe Rimá de Oliveira^a, Jossana Pereira de Sousa^a, José Alberto da Costa Medeiros^a, Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo^b, Marciane Magnani^c, José Pinto de Siqueira Júnior^d, Evandro Leite de Souza^{a*}

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

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

^c *Laboratory of Food Biochemistry, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

^d *Laboratory of Genetic of Microorganisms, Department of Molecular Biology, Exact and Nature Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

* Author for correspondence: Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

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

e-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Telephone number: + 55 83 3216 7807

Fax number: + 55 83 3216 7094

Abstract

This study assessed the effect of the combined application of carvacrol (CAR) and 1,8-cineole (CIN) against bacteria associated with minimally processed vegetables (MPV) in mixed culture using the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index, time-kill assays in vegetable-based broth, vegetable matrices and confocal and scanning electron microscopy analyses. CAR and CIN displayed Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of 1.25 and 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively, and the FIC indices of the combined compounds were 0.25 against *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* in mixed inoculum, suggesting a synergic interaction. The application of CAR and CIN alone (MIC) or combined (1/8 MIC + 1/8 MIC) in vegetable-based broth caused a significant decrease ($p < 0.05$) in viable cell counts over 24 h. CAR and CIN in combination reduced ($p < 0.05$) the mixed bacterial inoculum in vegetable-based broth and in experimentally inoculated fresh-cut vegetables. Moreover, the exposure to these compounds changed the membrane permeability and caused severe ultrastructural changes in cell surfaces. The enhancing inhibitory effects observed for sub-inhibitory concentrations of CAR and CIN in combination suggests the combination of these compounds as an interesting approach for controlling bacterial growth and survival in MPV.

Keywords: Minimally processed vegetables; Carvacrol; 1,8-cineole; Combined application; Mixed bacterial inoculum

1. Introduction

Minimally processed vegetables (MPV) undergo processes involving physical modification, including selection, washing, peeling, cutting, sanitization, rinsing, drying and packaging, to extend their shelf life and preserve their nutritive properties but still retain characteristics of fresh food (FDA, 2008). During the last decade, the consumption of ready-to-eat vegetables has become popular due to increased interest in healthy and nutritive diets, thus leading to an increase in the production of MPV in many countries (Alegre et al., 2010).

MPV are consumed primarily raw, representing a potential microbiological safety hazard, especially when processing occurs under unsatisfactory sanitary conditions (Gleeson and O'Beirne, 2005). Moreover, the emergence of pathogenic microorganisms not previously associated with raw vegetable products has enhanced the potential for foodborne outbreaks related to MPV because new processing and preservation techniques create new ecological routes for bacterial contamination and survival (Martin-Belloso, 2007). Among the emerging food-related bacteria, psychrotrophic pathogens, such as *Aeromonas hydrophila* (Uyttendaele et al., 2004) and *Listeria monocytogenes* (Carrasco et al., 2008), and spoilage bacteria of the genus *Pseudomonas*, such as *P. fluorescens* (Ragaert et al., 2007), have been associated with MPV, usually products stored at low temperatures. In addition, bacterial resistance to classic sanitizers used for MPV, such as hypochlorite and its derivatives, has been reported (Rajkovic et al., 2009).

Therefore, research on novel and effective practices to control bacterial survival and growth in MPV are needed. In this context, essential oils and their constituents have been considered potential candidates to be applied to MPV to ensure their microbiological safety and stability (Bakkali et al., 2008). Although more than sixty different constituents are present in essential oils, the majority constituents can account for up to 90% of their composition (Burt, 2004). The essential oils from *Origanum vulgare* L. (oregano) and *Rosmarinus*

officinalis L. (rosemary), whose main constituents are carvacrol (CAR) (66.9%) and 1,8-cineole (CIN) (32.2%), respectively (Azerêdo et al., 2011), have shown broad-spectrum antimicrobial activity that includes the inhibition of known bacterial contaminants of ready-to-eat vegetables (Sousa et al., 2012a; Sousa et al., 2012b). These essential oils and their constituents appear to have no significant or marginal toxic effects on humans and raise no concerns regarding the possible level of use in foods (Kurekci et al., 2013).

Although some studies have demonstrated the antimicrobial activity of CAR and CIN against foodborne pathogenic and spoilage bacteria in individual culture, studies regarding the efficacy of these compounds when applied alone or in combination in inhibiting bacterial mixed cultures are scarce or non-existent. Assessing the effect of CAR and CIN on a mixed culture of food-related bacteria has become an interesting issue because different bacterial species could survive and grow in the same environment in foods, where the microbial behavior could be different due to the establishment of new environmental conditions (Buchanan et al., 1993). Considering these aspects, the present study was carried out to investigate the antibacterial effects of CAR and CIN when used alone or in combination against a mixed culture of bacteria associated with the contamination of MPV using the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index, time-kill assays in vegetable broth, vegetable matrices and confocal and scanning electron microscopy analysis.

2. Materials and methods

2.1. Antimicrobial agents

The CAR and CIN compounds were supplied by Sigma Aldrich (Sigma, France). Solutions of the tested compounds were prepared within a range of 160 to 0.075 $\mu\text{L}/\text{mL}$ using bacteriological agar (0.15 g/100 mL) as a stabilizing agent (Bennis et al., 2004).

2.2. Bacterial strains and mixed inoculum preparation

L. monocytogenes ATCC 7644, *A. hydrophila* ATCC 7966 and *P. fluorescens* ATCC 11253, which were obtained from the Microorganism Collection, Laboratory of Food Microbiology, Federal University of Paraíba (João Pessoa, Brazil), were used as test microorganisms. Stock cultures were kept on Brain–Heart-Infusion agar – BHI (Himedia, India) slants under refrigeration (7 ± 1 °C).

The utilized inocula were obtained from overnight cultures of each strain grown on BHI slants at 35 °C according to a previously described procedure (Sousa et al., 2012a). A loopful of pure culture was diluted in sterile saline solution (0.85 g/100 mL) to obtain a final concentration of approximately 10^8 colony-forming units per milliliter (cfu/mL), which corresponded to a turbidity of the 0.5 McFarland standard, for each microorganism. The suspension was serially diluted in phosphate-buffered saline (PBS; 10^{-1}) to provide a viable cell count of approximately 7 log cfu/mL of each of the tested strains. The mixed inoculum (*L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens*) was obtained by mixing the different bacterial suspensions at a ratio of 1:1:1.

2.3. Preparation of vegetable-based broth

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

2.4. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC values of CAR and CIN were determined using macrodilution in broth. For this, four milliliters of double-strength nutrient broth (Himedia, India) was inoculated with 1 mL of the mixed inoculum, added to 5 mL of the CAR or CIN solution and vortexed for 30 s. The system was statically incubated for 24 h at 35 °C. The MIC was defined as the lowest concentration of CAR or CIN that was required to prevent visible bacterial growth (Nostro et al., 2001). Control flasks without CAR or CIN were similarly tested.

2.5. Determination of the FIC index

The checkerboard method was performed using macrodilution in broth to obtain the FIC index for the combined application of CAR and CIN. The FIC index was calculated as follows: (MIC of CAR in combination with CIN/MIC of CAR alone) + (MIC of CIN in combination with CAR/MIC of CIN alone). CAR and CIN were assayed at the MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC, 1/16 MIC and 1/32 MIC in different combinations of each of the different concentrations of each compound. Synergy was defined as $FIC \leq 0.5$; indifference (no interaction) was defined as $FIC > 0.5$ to 4; and antagonism was defined as $FIC > 4$ (Mackay et al., 2000; Hemaiswarya, et al., 2008; Azerêdo et al., 2011).

2.6. Time-kill assay

The effect of the compounds alone (MIC CAR; MIC CIN) and in combination (1/8 MIC CAR + 1/8 MIC CIN) on the cell viability of bacterial strains in vegetable-based broth over 24 h was evaluated using the viable cell count procedure. For this, 4 mL of vegetable-based broth was inoculated with 1 mL of the mixed inoculum, and 5 mL of the solution of CAR or CIN alone (final concentration of the MIC) or in combination (1/8 MIC CAR + 1/8 MIC CIN) was added to the system and gently shaken for 30 s at 7 °C (to better mimic the

storage of MPV). At different time intervals (0, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h), 1 mL of the suspension was serially diluted (10^{-1} a 10^{-5}) in PBS and inoculated on Petri dishes containing sterile selective medium for each tested bacteria: *Listeria* selective agar (Himedia, India), *Aeromonas* selective isolation medium (Himedia, India) and *Pseudomonas* selective agar (Himedia, India), which were then incubated for 24 h at 35 °C (Sousa et al., 2012a). Control flasks without CAR or CIN were similarly tested. The results were expressed as the log of cfu/mL.

2.7. The effect of CAR and CIN on the survival of bacteria in fresh vegetables

Portions (90 g) of a pool of iceberg lettuce, chard or rocket (in a rate of 1:1:1) that were previously washed with sterile distilled water were shredded aseptically and inoculated with the bacteria according to the following procedure: the portion of vegetables was submerged in 900 mL of the mixed inoculum (*L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* at a ratio of 1:1:1, approximately 7.0 log cfu/mL), softly rotated with a sterile glass stem for 5 min to ensure effective inoculation and air-dried for 1 h in a bio-safety cabinet. Subsequently, the vegetables were submerged in 250 mL of solutions of CAR or CIN alone (MIC) or in a mixture (1/8 CAR + 1/8 CIN) for 5 min at room temperature. Then, a 25-g sample of the vegetables was aseptically obtained, transferred into a sterile stomacher bag containing 225 mL of sterile peptone water (1 g/L) and homogenized for 60 s. Subsequently, a decimal dilution series (10^{-2} – 10^{-5}) was made in the same diluent, and bacterial enumeration was performed by spread-plating 0.1 mL of the appropriate sample dilution on sterile selective agar (Xu et al., 2007). Control flasks containing sterile distilled water were tested in the same way. The results were expressed as the log of cfu/mL.

2.8. *Fluorescent cell viability assay*

Mixed inocula were exposed for 15 and 30 min to CAR or CIN alone (MIC) or combined (1/8 MIC CAR + 1/8 MIC CIN) in vegetable broth and stained using a LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit for microscopy (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) as described by the manufacturer. This assay uses mixtures of SYTO® 9 green fluorescent nucleic acid stain, which stains all cells green, and the red fluorescent nucleic acid stain propidium iodide (PI), which only penetrates those cells whose cell membranes have been damaged. Double staining with PI and SYTO 9 was performed by incubating the samples with 1.50 µM PI and 250.5 nM SYTO 9 for 15 min at room temperature. Aliquots of the mixed bacterial inoculum exposed to isopropyl alcohol (700 mL/L) for 1 h were used as positive controls for membrane permeabilization, and mixed bacterial cells incubated in the absence of CAR and CIN were used as a negative control. The cells were observed using a TCS SP2 AOBS confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at excitation/emission wavelengths of 480/500 nm for the SYTO 9 stain and 490/635 nm for the PI stain (Leonard et al., 2010). The collected images were analyzed using the Lite 2.0 software.

2.9. *Scanning electron microscopy (SEM)*

Mixed inoculum exposed to CAR and CIN alone (MIC) or in combination (1/8 MIC CAR + 1/8 MIC CIN) in vegetable broth for 1 and 4 h were harvested by centrifugation at $10,000 \times g$ for 12 min at 4 °C, washed in PBS and fixed for 24 h at 4 °C with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PBS. After washing in the same buffer, the cells were post-fixed for 30 min with osmium tetroxide (0.01 g/L) in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and allowed to adhere to poly-lysine-coated coverslips. The samples were dehydrated in ethanol, critical-point-dried with CO₂, coated with a 20-nm-thick gold layer and observed using a Quanta 200

FEG (FEI, Hillsboro, OR, USA) scanning electron microscope. The bacterial cells not exposed to CAR and CIN alone or in combination were similarly processed and used as a control (Tyagi and Malik, 2010).

2.10. Reproducibility and statistics

All assays were performed in triplicate in three independent experiments, and the results were expressed as an average of the assays. Statistical analysis was performed to determine significant differences ($p < 0.05$) using ANOVA followed by Duncan's test using the Sigma Stat 3.5 software (Jandel Scientific Software, San Jose, California).

3. Results

3.1. MIC of CAR and CIN

The MIC values obtained for CAR and CIN against the mixed inoculum of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* were 1.25 and 40 $\mu\text{L/mL}$, respectively. CIN revealed a MIC value that was 32-fold higher than those observed for CAR.

3.2. FIC index of the combined application of CAR and CIN

The FIC index for the combined application of CAR and CIN against the tested strains in mixed inoculum was 0.25, suggesting a synergic interaction of these compounds. CAR and CIN inhibited the bacterial growth when tested up to a combination of $1/8 \text{ MIC} + 1/8 \text{ MIC}$.

3.3. Time-kill assays

Time-kill assays were performed using CAR or CIN at their MIC and with a combination of $1/8 \text{ MIC} + 1/8 \text{ MIC}$. The results of the inhibition of the mixed inoculum composed of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* when exposed to CAR or CIN alone or in combination in a vegetable-based broth over 24 h are given in Figure 1A –

1C. A significant drop ($p < 0.05$) in the viable cell counts of the three tested strains in mixed culture occurred over the evaluated time interval when CAR or CIN was added to the growth media at the assayed concentrations. The reduction in the initial viable cell counts of *L. monocytogenes* after 8 h of exposure was at least 3 log cycles (approx. 99% reduction in viable cells) when CAR and CIN were applied at their MIC, with no recovery in counts at the later assessed time points. For CAR and CIN in combination (18 MIC + 1/8 MIC) the initial viable cell counts decreased approximately 1 log cycle after 8 h of exposure. However, this reduction reached approximately 2 log cycles (approx. 90% reduction of viable cells) after 24 h of exposure.

The reduction in viable cell counts of *A. hydrophila* caused by CAR and CIN alone or in combination was approximately 2 log cycles after 2 h of exposure, with viable cell counts near 4 log cfu/g in the later assessed time points. *P. fluorescens* presented a decrease in their initial viable cell counts of approximately 2 log cycles after 2 h of exposure to CAR and CIN alone or in combination, and a slight increase in viable cell counts occurred after up to 12 h of exposure, which did not change after 24 h of exposure. *A. hydrophila* and *P. fluorescens* presented no difference ($p > 0.05$) in viable cell counts when growing in vegetable-based broth with CAR or CIN alone or in combination. Otherwise, *L. monocytogenes* presented lower ($p < 0.05$) viable cell counts in broth containing CAR or CIN alone when compared to the counts found in media containing CAR and CIN combined at the assayed sub-inhibitory concentrations. Over the evaluated time points, systems containing CAR or CIN alone or combined showed significantly lower ($p < 0.05$) viable cell counts than the control assay. When the bacteria were cultivated in the vegetable-based broth without CAR or CIN, the viable cell counts were nearly the same or slightly decreased over time, suggesting the occurrence of a competition phenomenon when the tested strains were grown in mixed culture.

3.4. The effect of CAR and CIN on the survival of bacteria in fresh vegetables

The application of CAR and CIN alone (MIC) or in combination (1/8 MIC + 1/8 MIC) caused a sharp reduction ($p < 0.05$) in the viable cell counts of all tested strains in mixed inoculum when experimentally inoculated on hand-cut fresh vegetables. The viable cell counts after the application of CAR or CIN alone or in combination ranged from 4.1 to 5.3 log cfu/g, while, for the control assays, these counts were between 6.1 and 6.8 log cfu/g (Table 1). Lower viable cell counts ($p < 0.05$) were observed for *L. monocytogenes* in vegetables treated with CAR at MIC when compared with those in vegetables treated with CIN at MIC or with CAR and CIN in combination. No differences ($p > 0.05$) were observed in the viable cell counts of *A. hydrophila* or *P. fluorescens* after the application of CAR or CIN alone or in combination.

3.5 Confocal scanning laser microscopy

Cells not exposed to CAR or CIN (control) presented a bright green fluorescence that was indicative of viable and intact cells throughout the incubation period (Fig. 2A). Red-stained cells that were occasionally observed in the control cultures most likely corresponded to senescent bacteria. Cells exposed to CAR or CIN (for 15 and 30 min) alone (MIC) or in combination (1/8 MIC + 1/8 MIC) showed a different staining profile. After 15 min of exposure, a low number of cells that were treated with CAR alone or in combination with CIN at sub-inhibitory concentrations presented intermediate profile staining, which was characterized by yellowish fluorescence (Fig. 2C and 2G). After 30 min of exposure, a red fluorescence signal was observed in all cells, indicating the loss of membrane integrity (Fig. 2D and 2H). The cells treated with CIN alone presented a gradual shift in the fluorescence signal from green (live cells) to red (dead cells) (Fig. 2E and 2F). All of the cells treated with isopropyl alcohol (positive control) were PI positive (Fig. 2B). Still, it was possible to observe

the condensation of the genetic material in cells stained red after 30 min of exposure to the combination of CAR and CIN (Fig. 3). The same changes were observed in cells treated with CAR or CIN alone for 30 min.

3.6. SEM analysis

SEM analysis of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* in mixed inoculum revealed morphological changes due to the exposure to CAR and CIN alone and in combination for 1 or 4 h (Fig. 4A-F). Notable alterations in the bacterial cell structure occurred after 1 h of exposure to CAR (Fig. 4A) and CIN (Fig. 4C) alone or in mixture (Fig. 4E). The cells treated with the compounds alone or in combination showed elongated and distorted forms with strongly wrinkled surfaces (Fig. 4A-F) that differed from the control cells, which displayed normal bacillary morphology with a slightly wavy surface (Fig. 3G, H). Still, another commonly observed alteration in the cells exposed to CAR and/or CIN was the presence of small structures similar to blebs (shiny spots) that pinched off from the bacterial surface (Fig. 4A – F).

4. Discussion

The efficacy of CAR and CIN alone at MIC or in combination at sub-inhibitory concentrations in inhibiting the growth and survival of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* in mixed inoculum that was observed in the present study supported the findings of previous studies using single cultures of the same bacteria (Tyagi and Malik, 2010; Azerêdo et al., 2011; Sousa et al., 2012a). Considering that the use of mixed inoculum has been recommended in studies using specifically defined conditions that limit the growth of bacterial species (Buchanan et al., 1993; Romero et al., 2010), the response of bacteria in

mixed cultures when challenged with CAR and/or CIN could provide more realistic information regarding the antimicrobial efficacy of these compounds in food matrices.

The susceptibilities of mixed inoculum to CAR and CIN, as determined by their MIC values, were significantly different, where CIN showed a MIC value 32-fold greater than that of CAR. When bacteria are tested in mixed culture, extreme growth characteristics are imposed (Buchanan et al., 1993) that may influence the response of the microorganisms to the action of antimicrobial compounds, such as CAR and CIN. It was noted that the MIC values that were obtained for CAR and CIN in the present study were generally higher than those reported by Sousa et al. (2012a) for the same compounds against *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* in single inoculum (CAR 0.6 to 2.5 and CIN 5 to 20 $\mu\text{L/mL}$). It seems likely that the characteristics imposed by the environment, where different bacterial species are subjected to the same conditions, could have influenced the response of the tested strains to the assayed compounds.

The FIC index for the combined application of CAR and CIN was 0.25 against the mixed inoculum of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens*, suggesting a synergic interaction of the assayed compounds. This synergism occurs when the tested antimicrobial compounds combined at sub-inhibitory concentrations present a greater inhibitory effect against the tested bacterial strains when compared to the inhibition caused by these compounds when assayed alone at higher amounts (Oliveira et al., 2010). An earlier study noted the same FIC value for combined CAR and CIN against these bacterial strains in single inoculum (Sousa et al., 2012a). The increased antimicrobial activity caused by the combination of CAR and CIN could be partially explained by their different chemical structures and consequently distinct biochemical properties, which are related to the antimicrobial activity of the tested compounds.

According to Dorman and Deans (2000), the combination of compounds with different chemical structures, such as CAR (phenolic) and CIN (hydrocarbon), may enhance their antimicrobial efficacy, which depends on the chemical composition, lipophilic properties and potency of functional groups or the aqueous solubility of these compounds. Otherwise, the combination of compounds with similar structures may exhibit an additive or indifferent, rather than synergistic, effect (Burt, 2004). An additive effect of the combination of essential oils from *O. vulgare* L. and *Thymus vulgaris* L. (of which CAR is the major compound) against a range of pathogenic and spoilage food-related bacteria has been reported (Gutierrez et al., 2008; Gutierrez et al., 2009).

Time-kill curves of CAR and CIN alone or in combination at the selected sub-inhibitory concentrations in vegetable broth revealed an interesting inhibition of the viability of all tested strains forming the mixed inoculum over 24 h. For most of the interactions, the combination of CAR and CIN at sub-inhibitory concentrations inhibited cell viability similar to that found when these compounds were tested individually at their MIC. The results of the kill-time assays of this study are in agreement with those reported by Azerêdo et al. (2011), who found inhibition of the cell viability of the same bacteria in single culture when exposed to the essential oils of *O. vulgare* L. (CAR 66.9 g/100 g) and *R. officinalis* L. (CIN 32.2 g/100 g) for 24 h.

P. fluorescens was the most resistant bacterium to the compounds tested in this study, with the occurrence of a slight recovery of viable cell counts after a significant drop in the initial time-exposure intervals. It has been reported that *Pseudomonas* spp. are known to show consistently high resistance to plant antimicrobials (Holley and Patel, 2005). A slight decrease in the viable cell counts of *A. hydrophila* and *P. fluorescens* cultivated in vegetable-broth without the addition of CAR or CIN was also observed, revealing a probable competition of the tested bacteria when cultivated in a mixed population. For bacteria growing in a well-

mixed environment in which the input of new nutrients is diminished or even minimal, individuals with similar nutritional requirements may compete for the acquisition of nutrients, which are restricted to early stages of the total population development and become depleted by the same growing population (Kassen et al., 2004; Kirisits et al., 2005).

The anti-bacterial effects of CAR and CIN, mainly when applied in combination at sub-inhibitory concentrations, were similar in fresh-cut vegetables and in vegetable-based broth. These results reveal that the application of CAR and CIN in combination at sub-inhibitory concentrations is effective in inhibiting the growth and survival of the test strains in fresh vegetables. This is particularly interesting because the application of CAR and CIN at these same concentrations (1/8 MIC + 1/8 MIC) did not negatively affect the sensory attributes of fresh leafy vegetables after 7 days of refrigerated storage (Sousa et al., 2012a). *L. monocytogenes* was the most sensitive bacteria to CAR or CIN alone or in mixture on leafy vegetables. It has been suggested that essential oil related-compounds are generally more active against gram-positive bacteria, such as *L. monocytogenes*, because the outer membrane surrounding the cell wall of gram-negative bacteria may restrict diffusion of hydrophobic compounds through its lipopolysaccharide covering (Burt, 2004).

CAR and CIN, applied alone or in combination, lead to the loss of integrity of the cell membrane, causing death of the tested bacteria even after short exposure times (15 and 30 min). The fluorescence microscopic images showed that the target for the assessed compounds was the cell membrane because PI (a cationic nucleic acid dye that is excluded from intact plasma membranes but can penetrate into cells with damaged membranes) had already stained the cells after 15 min of exposure to CAR and CIN alone or in combination. Still, other cellular events, such as the disturbance in protein synthesis or enzymatic activity in bacteria, could have been caused by CAR and CIN in bacterial cells, resulting in condensation of genetic material and loss of cell viability (Lincz, 1998; Oussalah et al. 2006; Bouhdid et al.,

2009). Another interesting observation of the confocal microscopy images was the decrease in the intensity of the PI staining in cells after 30 min of exposure to CIN and CAR alone or in combination (Fig. 2D-H), which most likely resulted from the leakage of genetic material from the cells.

The SEM analysis of bacteria tested in mixed inoculum showed marked changes in cell shape (elongation and decreased diameter) accompanied by evident surface alterations (roughness and presence of small vesicles) after 1 h and 4 h of exposure to CAR and CIN alone or in combination. It has been proposed that bacterial cell elongation is a possible strategy for coping with stress-inducing conditions (Pianetti et al., 2008; Pianetti et al., 2009), such as the exposure to antimicrobial compounds that was imposed in the present study. In a previous study, cells of *A. hydrophila* exposed to *O. vulgare* L. and *R. officinalis* L. essential oil, singly and in combination, showed elongated shapes after 3 h of exposure (Azerêdo et al., 2012). The interaction of CAR and CIN with components of the outer membrane (proteins and lipids) that are more exposed to the external surface (Di Pasqua et al., 2007) could be related to the increased roughness in the surface of cells treated with these compounds. Moreover, reduction in the diameters of treated cells could be due to the leakage of cytoplasmic content caused by CAR and CIN increasing the permeability of cytoplasmic membranes (Storia et al., 2011). Finally, structures, similar to blebs (vesicles), on the outside surfaces of antimicrobial-treated cells may represent a collection of cytoplasmic constituents that were pushed through cracks produced in the cell wall (Oliveira et al., 2010).

5. Conclusions

The findings presented in this study showed a synergistic effect of CAR and CIN, which, when combined at sub-inhibitory concentrations, were effective in inhibiting the growth and survival of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* in mixed culture.

Moreover, these compounds decreased the cell viability, changed the membrane permeability and caused ultrastructural alterations in the cells of the tested strains. Our results reinforce the idea that the combination of essential oil constituents with different structures, particularly CAR and CIN, could arise as an alternative strategy for the sanitization of MPV.

Acknowledgements

The authors are grateful to the National Council of Technological and Scientific Development – CNPq (Brazil) for financial support and for a scholarship to the first author (K.A.R. de Oliveira).

References

- Alegre, I., Abadias, M., Anguera, M., Oliveira, M., Viñas, I., 2010. Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiology* 27, 70–76.
- Azerêdo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Neto, N.J.G., Oliveira, M.E.G., Souza, E.L., 2011. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International* 44, 1541–1548.
- Azerêdo, G.A., Stamford, T.L.M., Figueiredo, R.C.B., Souza, E.L., 2012. The Cytotoxic Effect of Essential Oils from *Origanum vulgare* L. and/or *Rosmarinus officinalis* L. on *Aeromonas hydrophila*. *Foodborne Pathogens and Disease* 9, 298-304.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils — a review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.
- Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., Remmal, A., 2004. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology* 38, 454–458.

- Bouhdid, S., Abrini J., Zhiri A., Espuny M.J., Manresa, A. , 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1558-8.
- Buchanan, R.L., Bagi, L.K., Goins, R.V., Phillips, J.G., 1993. Response surface models for the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* 10, 303–305.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253.
- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2008). Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Control* 19, 487–494.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G., 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4863–4870.
- Dorman, H. J. D., Deans, S. G., 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 83, 308–316.
- [FDA] U.S. Food and Drug Administration, 2008. Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables. Available at: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ProducePlantProducts/ucm064458.htm> (Accessed: 20 October 2013).
- Gleeson, E., Beirne, D. O., 2005. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control* 16, 677–685.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* 124, 91–97.

- Gutierrez, J., 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 Microbiology* 26, 142–150.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15, 639–652.
- Holley, R. A., Patel, D., 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22, 273–292.
- Kassen, R., Llewellyn, M., Rainey, P. B., 2004. Ecological constraints on diversification in a model adaptive radiation. *Nature* 431, 984–988.
- Kirisits, M. J., Prost, L., Starkey, M., Parsek, M. R., 2005. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4809–4821.
- Kurekci, C., Padmanabha, J., Bishop-Hurley, S.L., Hassan, E., Al Jassim, R.A.M., McSweeney, C.S., 2013. Antimicrobial activity of essential oils and five terpenoid compounds against *Campylobacter jejuni* in pure and mixed culture experiments. *International Journal of Food Microbiology* 66, 450-457.
- Leonard, C.M., Virijevec, S., Reginier, T., Combrinck, S., 2010. Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *South African Journal of Botany* 76, 676–680.
- Lincz, L., 1998. Deciphering the apoptotic pathway: All roads lead to death. *Immunology and Cell Biology* 76, 1-19.
- Mackay, M.L., Milne, K., Gould, I.M., 2000. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *International Journal of Antimicrobial Agents* 15, 125–129.
- Martin-Belloso, O., 2007. Pros and cons of minimally processed foods. *Trends in Food Science and Technology* 18, 582-582.

- Nostro, A., Bisignano, G., Cannatelli, M.A., Crisafi, G., Germano, M.P., Alonzo, V., 2001. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 17, 517–520.
- Nostro, A., Cannatelli, M.A., Musolino, A.D., Procopio, F., Alonzo, V., 2002. *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology* 35, 181–184.
- Oliveira, C.E.V., Stamford, T.L.M., Gomes Neto, N.J., Souza, E.L., 2010. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *International Journal of Food Microbiology* 137, 312–316.
- Oussalah, M.; Caillet, S.; Saucier, L.; Lacroix, M., 2006. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18, 414-420.
- Pianetti, A., Battistelli, M., Citterio, B., Parlani, C., Falcieri, E., Bruscolini, F., 2009. Morphological changes of *Aeromonas hydrophila* in response to osmotic stress. *Micron* 40, 426–433.
- Piuri M., Sanchez-Rivas C., Ruzal S.M., 2005. Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *International Journal of Food Microbiology* 98, 84–95.
- Ragaert, P., Devlieghere, F., Debevere, J., 2007. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 44, 185–194.
- Rajkovic, A., Smigic, N., Uyttendaele, M., Medic, H., De Zutter, L., Devlieghere, F., 2009. Resistance of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* after exposure to repetitive cycles of mild bactericidal treatments. *Food Microbiology* 26, 889–895.

Romero, S.M., Fernández Pinto, V., Patriarca, A., Vaamonde, G., 2010. Ochratoxin A production by a mixed inoculum of *Aspergillus carbonarius* at different conditions of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 140, 277-281.

Sigmastat version 3.5, Systat software, Jandel Scientific, San Jose, California, USA. Integrated with SigmaPlot 10.0 for Windows [Computer program], 2007.

Sousa, J. P., Azerêdo, G. A., Torres, R. A., Vasconcelos, M. A. S., Conceição, M. L., Souza, E. L., 2012a. Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 154, 45–151.

Sousa, J. P., Torres, R. A., Azerêdo, G. A., Figueiredo, R. C. B. Q., Vasconcelos, M. A. S., Souza, E. L., 2012b. 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* 158, 9–13.

Storia, A., Ercolini, D., Marinello, F., Pasqua, R., Villani, F., Mauriello, G., 2011. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Research in Microbiology* 162, 164–172.

Tyagi, A.K., Malik, A., 2010. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Food Microbiology* 143, 205–210.

Uyttendaele, M., Neyts, K., Vanderswalmen, H., Notebaert, E., Debevere, J., 2004. Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water, or thyme essential oil solution. *International Journal of Food Microbiology* 90, 263–271.

Vega-Manriquez, X., Lopez-Vidal, Y., Moran, J., Adams, L. G., Gutierrez-Pabello, J. A., 2007. Apoptosis-Inducing Factor Participation in Bovine Macrophage *Mycobacterium bovis*-Induced Caspase-Independent Cell Death. *Infection and Immunity* 75, 1223–1228.

Xu, W., Qu, W., Huang, K., Guo, F., Yang, J., Zhao, H., Luo, Y., 2007. Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 45, 126–133.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. Viable cell counts of *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A), *A. hydrophila* ATCC 7966 (B) and *P. fluorescens* ATCC 11253 (C) in a mixed population cultivated in vegetable broth at 7 °C as a function of antimicrobial concentration: (□): control (0 µL/mL); (●): carvacrol (MIC: 1.25 µL/mL); (○): 1,8-cineole (MIC: 40 µL/mL); (■): carvacrol (1/8 MIC: 0.156 µL/mL) + 1,8-cineole (1/8 MIC: 5 µL/mL). Detection limit of the test: 2.0 log cfu/mL.

Fig. 2. Confocal microscopy of a mixed culture of *L. monocytogenes* ATCC 7644, *A. hydrophila* ATCC 7966 and *P. fluorescens* ATCC 11253 in a vegetable broth exposed to carvacrol (CAR) and 1,8-cineole (CIN) alone or in combination for 15 and 30 min (7 °C) and labeled with SYTO 9 (green fluorescence: viable cells) and PI (red fluorescence: non-viable cells). (A) Negative control – viable cells; (B) Positive control – cells treated with alcohol (70%) for 1 h; (C, D) cells treated with CAR: 1.25 µL/mL for 15 (C) and 30 min (D); (E, F) cells treated with CIN: 40 µL/mL for 15 (E) and 30 min (F); and (G, H) cells treated with 1/8 MIC CAR: 0.15 µL/mL + 1/8 MIC CIN: 5 µL/mL for 15 (G) and 30 min (H).

Fig. 3. Merged images of a mixed culture of *L. monocytogenes* ATCC 7644, *A. hydrophila* ATCC 7966 and *P. fluorescens* ATCC 11253 exposed to carvacrol (CAR) and 1,8-cineole (CIN) in combination (1/8 MIC CAR: 0.15 µL/mL + 1/8 MIC CIN: 5 µL/mL) for 30 min and labeled with PI (red fluorescence; arrows: highlights the appearance of condensed genetic material in red stained-cells; Vega-Manriquez et al., 2007).

Fig. 4. Scanning electron microscopy of a mixed culture of *L. monocytogenes* ATCC 7644, *A. hydrophila* ATCC 7966 and *P. fluorescens* ATCC 11253 exposed to carvacrol (CAR) and 1,8-cineole (CIN) alone or in mixture. (A, B) Cells treated with CAR: 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for 1 h (A) and 4 h (B). (C, D) Cells treated with CIN: 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for 1 h (C) and 4 h (D). (E, F) Cells treated with CAR: 0.156 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + CIN: 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for 1 h (E) and 4 h (F). (G, H) Control cells (not treated with CAR or CIN) after cultivation for 1 h (G) and 4 h (H).

Table 1. Counts (log cfu/g) of *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *P. fluorescens* in mixed culture when experimentally inoculated in fresh-cut leafy vegetables and exposed to carvacrol and 1,8-cineole (alone or in mixture) for 5 min.

Treatment	Bacterial strains		
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>P. fluorescens</i>
	ATCC 7394	ATCC 7966	ATCC 11253
Carvacrol (MIC)	4.1 (\pm 0.2) ^{Cb}	4.7 (\pm 0.2) ^{Ba}	4.8 (\pm 0.1) ^{Ba}
1,8- cineole (MIC)	4.8 (\pm 0.3) ^{Ba}	5.1 (\pm 0.1) ^{Ba}	5.3 (\pm 0.2) ^{Ba}
Mixture *	4.9 (\pm 0.1) ^{Bb}	5.3 (\pm 0.2) ^{Ba}	5.3 (\pm 0.3) ^{Ba}
Control	6.8 (\pm 0.2) ^{Aa}	6.1 (\pm 0.3) ^{Ab}	6.3 (\pm 0.1) ^{Ab}

MIC of carvacrol: 1.25 μ L/mL; MIC of 1,8-cineole: 40 μ L/mL; *1/8 MIC of carvacrol: 0.15 μ L/mL + 1/8 MIC of 1,8-cineole: 5 μ L/mL; Control: 0 μ L/mL of carvacrol or 1,8-cineole; ^{A - C} Means in the same row with different uppercase letters are significantly different ($p < 0.05$) according to the Duncan test; ^{a - b} Means in the same column with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$) according to the Duncan test

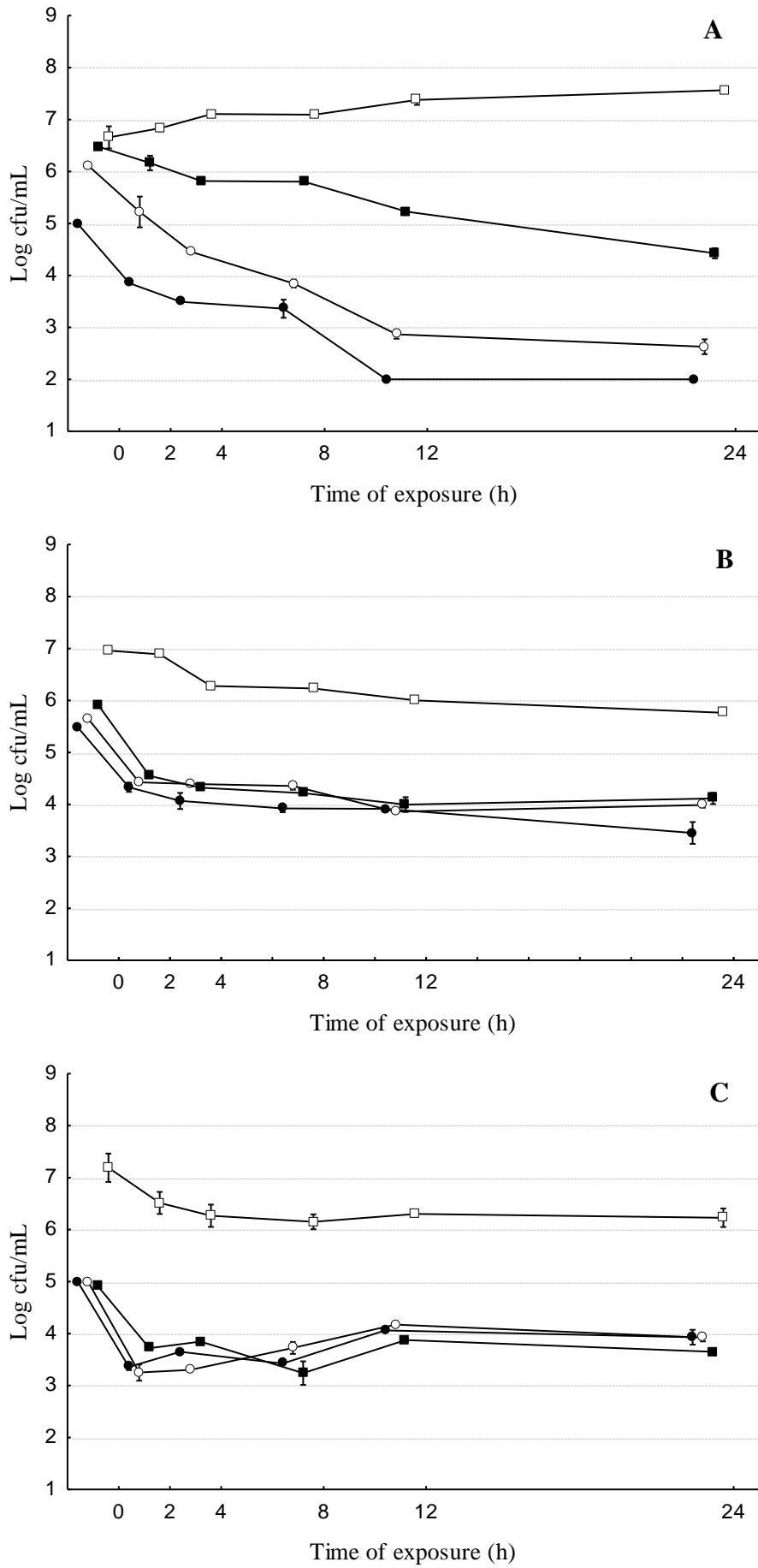


Fig. 1

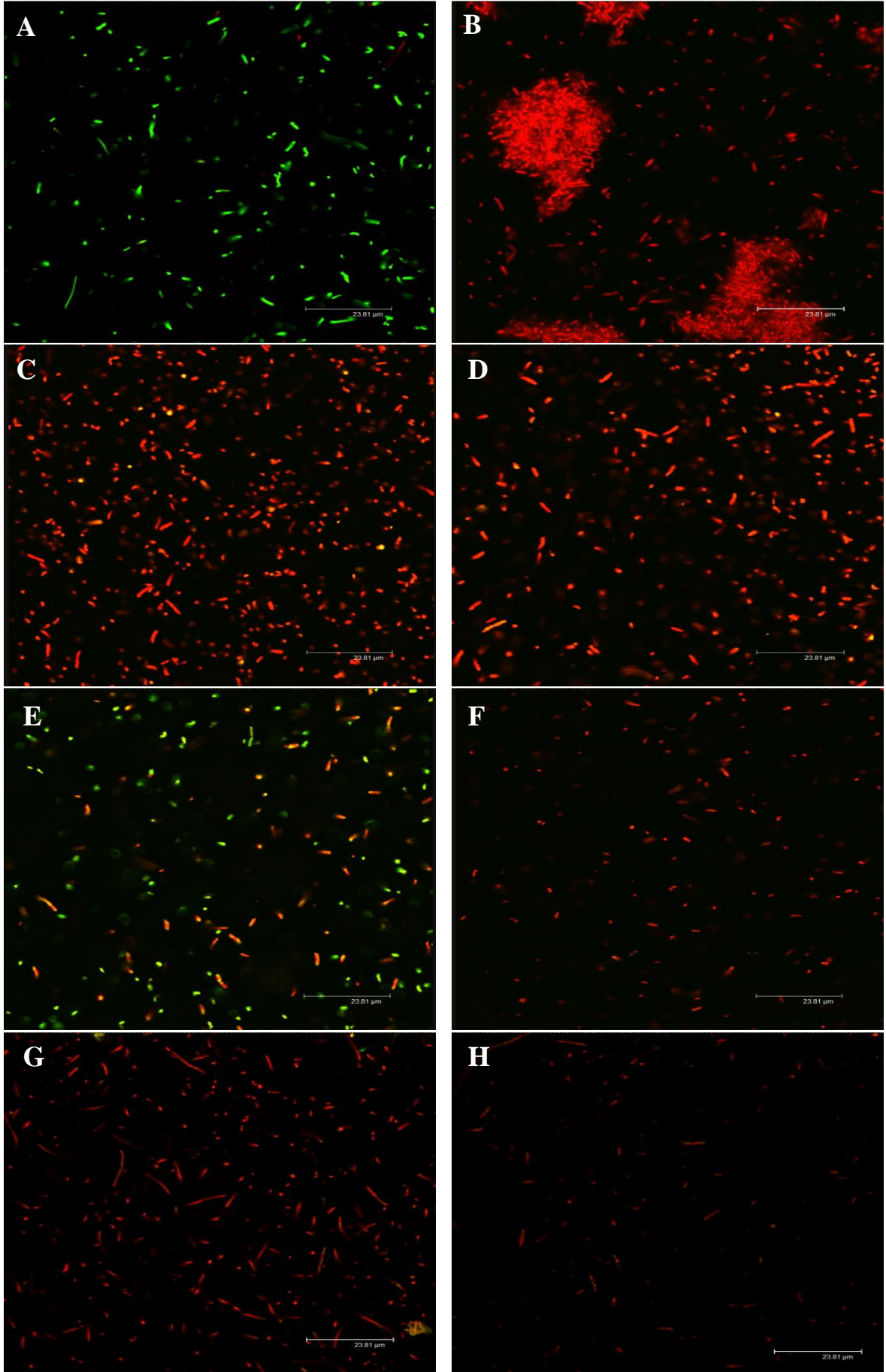


Fig. 2

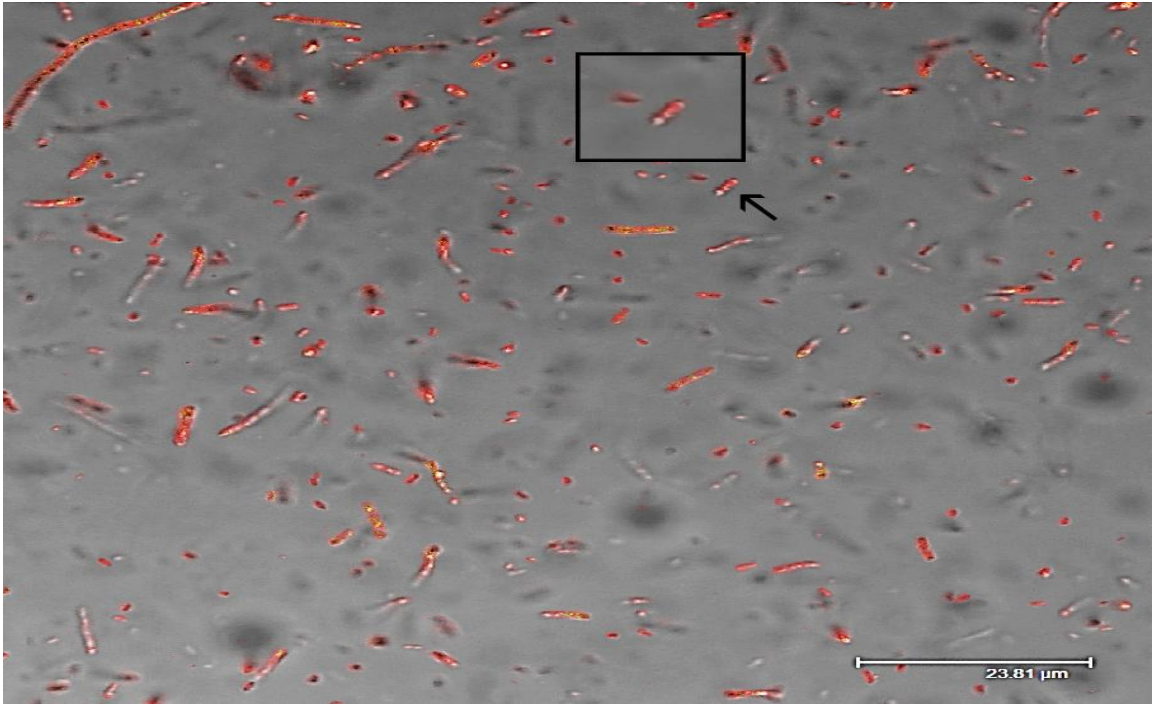


Fig. 3

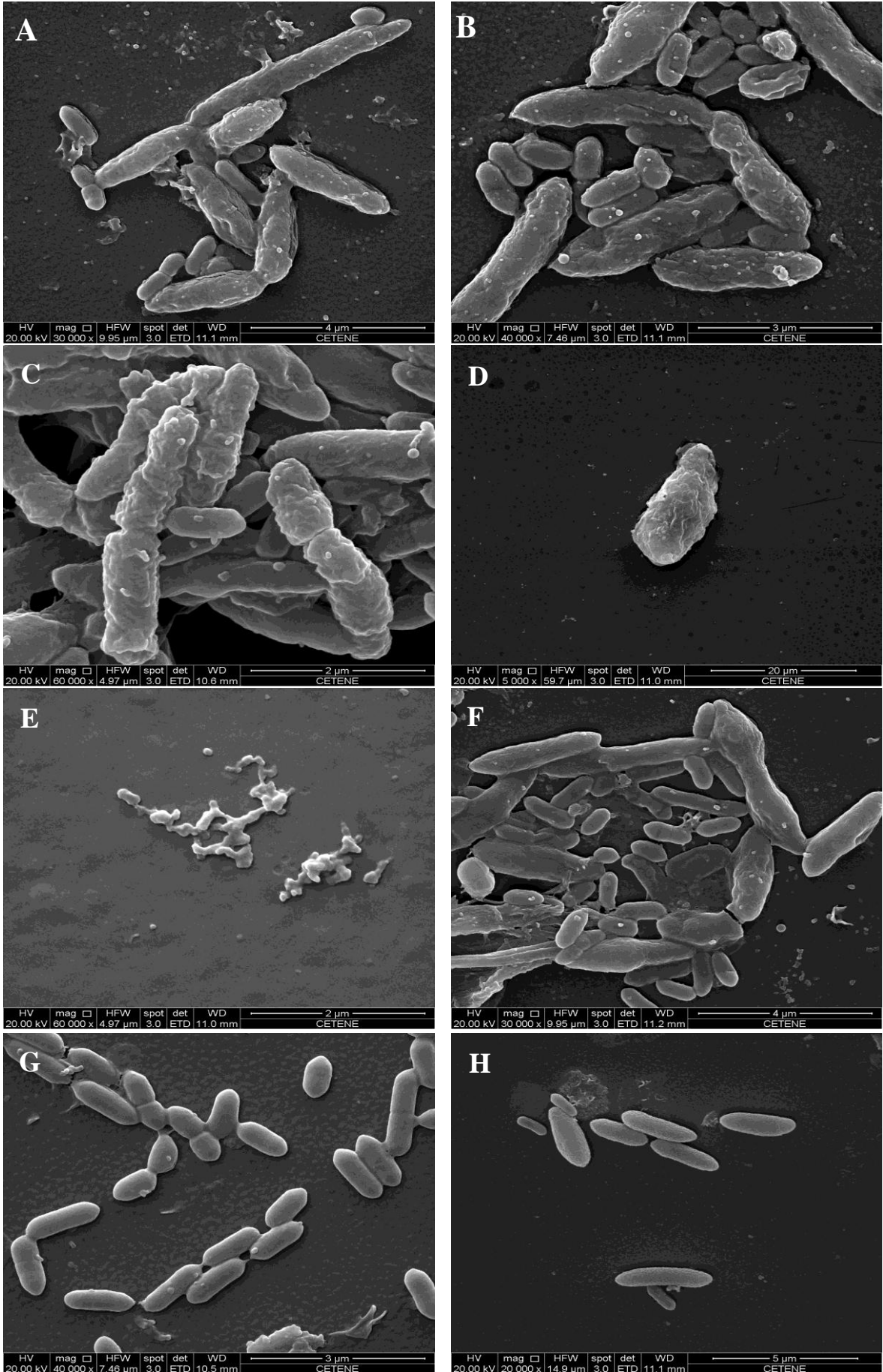


Fig. 4

