

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

ISABELLA DE MEDEIROS BARBOSA

**EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* L. E
Rosmarinus officinalis L. SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS CONTAMINANTES
DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS**

JOÃO PESSOA

2015

ISABELLA DE MEDEIROS BARBOSA

**EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* L. E
Rosmarinus officinalis L. SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS CONTAMINANTES
DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS**

JOÃO PESSOA

2015

ISABELLA DE MEDEIROS BARBOSA

**EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* L. E
Rosmarinus officinalis L. SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS CONTAMINANTES
DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Departamento de 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. Dr. Evandro Leite de Souza

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Marciane Magnani

JOÃO PESSOA

2015

B866i Barbosa, Isabella de Medeiros.
Efeito inibitório dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. sobre bactérias patogênicas contaminantes de hortaliças minimamente processadas / Isabella de Medeiros Barbosa. -- João Pessoa, 2015.
80f. : il.
Orientador: Evandro Leite de Souza
Coorientadora: Marciane Magnani
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS
1. Nutrição. 2. Vegetais – processamento mínimo. 3. Óleo essencial. 4. População bacteriana mista. 5. Aplicação combinada.

UFPB/BC

CDU: 612.39(043)

ISABELLA DE MEDEIROS BARBOSA

**EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* L. E
Rosmarinus officinalis L. SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS CONTAMINANTES
DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS**

Dissertação aprovada em _____ de _____ de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

Orientador

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães

(DCF/CCS/UFPB)

Examinador Interno

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

(CES/UAS/UFCG)

Examinador Externo

Por todas as vezes que compreenderam quando não pude estar presente...
Por me apoiarem em todos os momentos que precisei...
Por vibrarem comigo a cada vitória alcançada...
Por todos os dias me darem a certeza de que sempre terei um porto seguro...

À minha família...

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me educarem para que eu me tornasse uma pessoa de bem; por me mostrarem, desde pequena, a importância dos estudos e nunca medirem esforços para me ofertar o melhor em termos de educação; por me alcançarem todos os dias com o amor e o cuidado, mesmo com a distância; por tudo que fizeram e fazem por mim até hoje... a vocês, meu eterno respeito, amor e gratidão!

À minha amada família... avós, irmã, tios e primos! Obrigada pela força, pelo apoio e por todos os momentos que compartilhamos até hoje... vocês são a melhor parte da minha vida!

Ao meu orientador, professor Dr. Evandro Leite de Souza, que me acolheu desde a época da graduação como aluna de iniciação científica. Obrigada por suas orientações, pela assistência e por me confiar o desenvolvimento de mais um trabalho!

À minha co-orientadora, professora Dr^a. Marciane Magnani, pelo suporte durante a execução do trabalho e por sua disponibilidade sempre que precisei. Suas contribuições foram de grande importância!

À professora Maria Lúcia da Conceição, Lucita, por seu carinho, amizade e respeito. Por seu abraço caloroso e suas palavras de apoio e incentivo. Por ser tão 'mãe' de todos nós que fazemos parte do laboratório, sempre torcendo e vibrando com nossas conquistas!

Aos professores da banca examinadora, Fillipe de Oliveira Pereira e Hemerson Iury Ferreira Magalhães, por terem aceito o convite e por todas as contribuições relevantes deixadas para a melhoria desse trabalho.

À Universidade Federal da Paraíba, pelo suporte e estrutura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da UFPB, seu corpo docente, direção e funcionários pelo trabalho que desenvolvem e pela oportunidade cedida para obtenção do título de Mestre.

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

Aos amigos...

Alberto... meu bom amigo e 'fiel escudeiro', obrigada por sua amizade, disponibilidade, comprometimento e, é claro, pelas boas músicas compartilhadas nos momentos de trabalho. Trabalhar com você, sem dúvida, foi uma imensa gratidão!

Kataryne e Jossana... não sei o que seria de mim sem a ajuda de vocês no dia-a-dia pra tirar minhas dúvidas! Sou muito grata por todo o apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Carol, Vanessa, Paloma, Helena e Samara... minhas companheiras nessa jornada (quase) sem fim! Obrigada por todos os momentos bons, ruins, engraçados e estressantes ao lado de vocês, pela troca de experiências, apoio, carinho e amizade construída ao longo desses dois anos!

Iara e Vitória... queridas amigas do mestrado! Obrigada por todas as vezes que pude contar com vocês e por todas as vezes que me ouviram e me aconselharam!

Ana Júlia, Geany, Rayssa, Nelson, Estefânia, Jéssica, Winnie, Roberta, Thais, Rhayane, Raquel, Digian, Valdenice, Eryka, Layane, Maiara, Nayara... e todos aqueles que fazem parte da querida família do 'labinho'! Obrigada pelos sorrisos, pela companhia, pelas brincadeiras do dia a dia e por todas as vezes que pude contar com cada um de vocês!

Fernanda, Suênia e Carol... sou grata a Deus por Ele ter cruzado nossos caminhos e permitir que pudéssemos apertar cada vez mais os laços dessa amizade. Sem dúvida, vocês tornaram essa caminhada mais leve! De coração... muito obrigada!

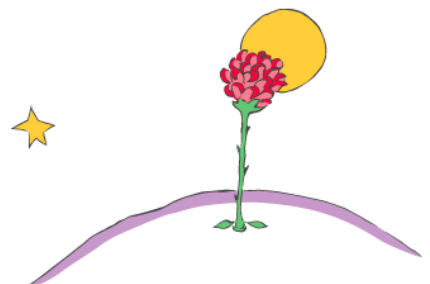
E nada disso seria possível sem a presença dEle em minha vida...

Ele que conhece o meu coração, meus anseios e minhas necessidades...

O meu maior e melhor amigo...

Obrigada, meu bom Deus, por andar sempre de mãos dadas comigo!

Que Ele abençoe cada um de vocês!



"Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante"

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Hortaliças minimamente processadas são produtos prontos para consumo que foram submetidos a processos de modificação física como corte, descascamento e fatiamento, mas que preservam as características de um alimento fresco. Quando processados sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, esses produtos podem representar risco microbiológico e, portanto, a sanitização é uma etapa crítica do processamento. No presente estudo foi avaliado o efeito da aplicação dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. - orégano (OEOV) e *Rosmarinus officinalis* L. - alecrim (OERO), isolados e combinados em concentrações sub-inibitórias, contra as bactérias patogênicas contaminantes de hortaliças minimamente processadas *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis. A identificação dos constituintes dos óleos essenciais (OEs) foi realizada por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS). Os efeitos inibitórios foram avaliados pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), índice de concentração inibitória fracional (FICI) e avaliação de contagens de células viáveis em caldo vegetal e em vegetais frescos artificialmente contaminados. Timol e eucaliptol foram os compostos majoritários detectados no OEOV e OERO, respectivamente. O valor da CIM do OEOV foi de 0,6 µL/mL frente às cepas teste em inóculo simples e misto, enquanto o valor da CIM do OERO foi de 5µL/mL frente *L. monocytogenes* e *E. coli* e 10 µL/mL frente *S. Enteritidis* em inóculo simples e 10 µL/mL contra o inóculo misto. O ICIF dos OEs combinados foi de 0,5 frente o inóculo bacteriano misto, sugerindo interação sinérgica. A incorporação do OEOV e OERO isolados (CIM) ou em diferentes concentrações sub-inibitórias no caldo vegetal resultou em diminuição de contagens de células viáveis de todas as cepas de teste ao longo de 24 h. Uma redução ≥ 3 ciclos log na contagem de células viáveis de *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Enteritidis* foi observada após a exposição a CIM do OEOV. Quando expostas a CIM do OERO, essa redução foi observada para as células de *L. monocytogenes* e *E. coli*, enquanto *S. Enteritidis* apresentou menor redução (até 1,7 ciclos log) na contagem de células viáveis. A incorporação de OEOV e OERO combinados em concentrações sub-inibitórias resultou em redução da contagem inicial de células viáveis de todas as cepas ensaiadas, embora o tempo necessário para estabelecer esta diminuição variou de acordo com a cepa e quantidade de cada OE na combinação. Da mesma forma, OEs aplicados isoladamente ou em combinação reduziram as contagens de células viáveis de todas as cepas teste quando ensaiadas em vegetais frescos artificialmente infectados. No entanto, a exposição dos vegetais aos OEs isolados e em combinação durante 10 minutos causou uma maior redução nas contagens de células viáveis quando comparado aos resultados obtidos após 5 minutos de exposição. Em ambos os ensaios observou-se que os efeitos inibitórios dos OEs variaram de acordo com o tempo e o tipo de cepa. Esses achados reforçam a utilização racional dos OEOV e OERO combinados em concentrações sub-inibitórias para garantir a segurança e prolongar a vida de prateleira de vegetais frescos. Sugere-se ainda a realização de pesquisas científicas voltadas para o estudo da toxicidade em animais e/ou com células humanas, de modo a assegurar a inocuidade destes OEs quando aplicados em alimentos.

Palavras-chave: vegetais minimamente processados; óleo essencial; orégano; alecrim; população bacteriana mista; aplicação combinada.

ABSTRACT

Minimally processed vegetables are ready-to-eat products that undergo to a physical modification processes such as cutting, peeling and slicing, but preserve characteristics of a fresh food. When processed under unsatisfactory sanitary conditions, these products may represent microbiological risk and, therefore, sanitation becomes a critical step processing. In the present study the effects of the application of the essential oils (EOs) from *Origanum vulgare* L. – oregano (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. – rosemary (ROEO), alone or combined at sub-inhibitory concentrations were assessed against the pathogenic bacteria contaminants of minimally processed vegetables, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis. The identification of the EOs' constituents was performed by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). The inhibitory effects were evaluated by determination of minimum inhibitory concentration (MIC), fractional inhibitory concentration index (FICI) and assessment of viable cell counts in vegetable broth and artificially infected vegetable over time. Thymol and eucalyptol were the major compounds identified in OVEO and ROEO, respectively. MIC value of OVEO was 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ against the test strains either in single and mixed inoculum. MIC value of ROEO was 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ against *L. monocytogenes* and *E. coli* and 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ against *S. Enteritidis* in single inocula, while it was 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ against the mixed inoculum. FICI of the combined EOs was 0.5 against the mixed bacterial inoculum, suggesting synergic interaction. The incorporation of OVEO and ROEO alone (MIC) or at different sub-inhibitory concentrations in vegetable broth resulted in decrease of viable cell counts of all test strains along the 24 h. A ≥ 3 log cycles reduction in viable cell count of *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Enteritidis* was observed after exposure to OVEO at MIC. When exposed to ROEO at MIC, the same reduction was observed for cells of *L. monocytogenes* and *E. coli*, while *S. Enteritidis* presented smaller decrease (up to 1.7 log cycles) in viable cell counts. The incorporation of OVEO and ROEO combined at sub-inhibitory concentrations resulted in a decrease in initial viable counts of all strains tested, although the time requested to stablish this decrease varied according to the strain and amount of each EO in combination. Likewise, the EOs applied alone or in combination reduced the viable cell counts of all test strains when essayed in artificially infected vegetables. However, the exposure of vegetables to EOs for 10 minutes caused a greater reduction in viable cell counts compared to results obtained after 5 minutes of exposure. In both essays was observed that the inhibitory effects of the EOs varied according to the time and strain. These findings reinforce the rational use of OVEO and ROEO combined at sub-inhibitory concentrations to guarantee the safety and extend the shelf-life of fresh vegetables. It is also suggested carrying out scientific researches aimed to study the toxicity in animals and /or human cells, in order to ensure the health safety of these oils when used in food.

Keywords: minimally processed vegetables; essential oil; mixed bacterial population, combined application.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

- Figura 1.** Etapas do processamento mínimo de frutas e hortaliças. 17
- Figura 2.** Estrutura química dos principais constituintes dos óleos essenciais. 27
- Figura 3.** Representação dos alvos da célula bacteriana sugeridos como sítios de ação dos óleos essenciais e seus constituintes. 28
- Figura 4.** Fluxograma para padronização do inóculo bacteriano. 34
- Figura 5.** Fluxograma para determinação da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. frente inóculo simples e misto. 35
- Figura 6.** Fluxograma para avaliação do efeito sinérgico dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. frente inóculo misto. 36

Artigo

- Fig. 1** Reduction cycles (Log₁₀ CFU/mL) in the initial viable cell counts of *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A), *E. coli* UFEPEDA 224 (B) and *S. Enteritidis* UFEPEDA 414 (C) in vegetable broth (7°C) as a function of different concentrations of the essential oils from *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO) alone or in combination. (×): Control; (●): MIC OVEO: 0.6 µL/mL; (■): MIC ROEO: 10 µL/mL; (○): 1/2 MIC OVEO: 0.3 µL/mL + 1/2 MIC ROEO 5 µL/mL; (□): 1/2 MIC OVEO: 0.3 µL/mL + 1/4 MIC ROEO: 2.5 µL/mL; (Δ) 1/4 MIC OVEO: 0.15 µL/mL + 1/2 MIC ROEO: 5 µL/mL; (*): 1/4 MIC OVEO: 0.15 µL/mL + 1/4 MIC ROEO: 2.5 µL/mL. 77
- Fig. 2** Reduction cycles (Log₁₀ CFU/mL) in the initial viable cell counts of *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A - B), *E. coli* UFEPEDA 224 (C - D) and *S. Enteritidis* UFEPEDA 414 (E - F) in fresh-cut vegetables (28°C) as a function of different concentrations of the essential oils from *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO) alone or in combination, after a 5-min (A, C, E) and 10-min (B, D, F) treatment (white bars: reduction caused by OVEO at its MIC: 0.6 µL/mL; grey bars: reduction caused by ROEO at its MIC: 10 µL/mL; diagonal dashed bars: reduction caused by 1/2 MIC OVEO: 0.3 µL/mL + 1/2 MIC ROEO: 5 µL/mL; vertical dashed bars: reduction caused by at 1/2 MIC OVEO: 0.3 µL/mL + 1/4 ROEO: 2.5 µL/mL; black bars: control). 78

LISTA DE TABELAS

Referencial Teórico

- Tabela 1.** Estudos que relatam a ocorrência de micro-organismos patogênicos em hortaliças minimamente processadas. 20

Artigo

- Table 1.** GC-MS analysis of the essential oils from *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO). 79
- Table 2.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oils from *O. vulgare* L. (OVEO) and *R. officinalis* L. (ROEO) against *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Enteritidis* in single and mixed inoculum. 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
GRAS	Generally Recognized as Safe
HMP	Hortaliças Minimamente Processadas
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracional
IFPA	International Fresh-Cut Produce Association
IFT	Institute of Food Technologists
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
OEOV	Óleo Essencial de <i>Origanum vulgare</i> L.
OERO	Óleo Essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
OMAFRA	Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs
OVEO	<i>Origanum vulgare</i> Essential Oil
ROEO	<i>Rosmarinus officinalis</i> Essential Oil
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS	17
2.2	MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS DE IMPORTÂNCIA EM HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS	20
2.3	SANITIZAÇÃO DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS ..	23
2.4	POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	MATERIAL	32
3.1.1	Óleos essenciais	32
3.1.2	Hortaliças	32
3.1.3	Micro-organismos	32
3.2	MÉTODOS	33
3.2.1	Identificação dos constituintes dos óleos essenciais	33
3.2.2	Padronização do inóculo microbiano	33
3.2.3	Preparação do caldo vegetal	34
3.2.4	Ensaio de atividade antimicrobiana	35
3.2.4.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	35
3.2.4.2	<i>Avaliação do efeito da ação combinada dos óleos essenciais</i>	36
3.2.5	Influência dos óleos essenciais sobre a viabilidade das cepas bacterianas	37
3.2.6	Efeito dos OEs na sobrevivência de bactérias patogênicas em hortaliças minimamente processadas	38
3.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
	REFERÊNCIAS	39
	APÊNDICE	51

1 INTRODUÇÃO

Os consumidores têm modificado seus hábitos alimentares de forma progressiva, tornando-se mais conscientes dos benefícios que uma alimentação saudável pode trazer à saúde. Essas mudanças nas tendências de consumo têm impulsionado, de forma paralela, a indústria de alimentos na busca do desenvolvimento de novas tecnologias atrativas para este emergente perfil de consumidores, dentre as quais se destaca o processamento mínimo de vegetais.

Nos últimos anos, as hortaliças minimamente processadas (HMP) ganharam grande aceitação por parte dos consumidores, fato que pode ser atribuído, principalmente, ao desejo dos consumidores por produtos frescos, com apelo de promoção de saúde e reduzido tempo de preparação (MILLAN-SANGO; MCELHATTON; VALDRAMIDIS, et al., 2015; ZHOU et al., 2004; ODUMERU et al., 2002). HMP são aquelas hortaliças que sofreram qualquer tipo de alteração física, mas que oferecem ao consumidor conveniência, sabor e alto valor nutritivo, conservando as características de frescor do produto original. Além disso, são produtos prontos para consumo, pois não requerem nenhum tipo de tratamento adicional antes de serem consumidos (processamento ou cocção) (FDA, 2008; IFPA, 1999). Dentre as hortaliças comumente encontradas na forma minimamente processada, podem ser citadas acelga, alface, rúcula, repolho e couve (MORETTI, 2007).

Entretanto, esses produtos podem ser contaminados com micro-organismos patogênicos em todas as etapas, desde o seu crescimento até o consumo, por meio de diversos fatores como o solo, adubo, água, insetos, meio ambiente, manejo pós-colheita, lavagem, corte e transporte (LEHTO et al., 2011; FDA, 2008; BHAGWAT; MATTHEWS, 2006; BEUCHAT, 2002). Assim, a crescente associação de surtos com HMP intensificou as preocupações com a segurança dos consumidores ao consumir este tipo de produto (SANT'ANA et al., 2012a). Entre os patógenos clássicos considerados ameaças para a segurança da HMP, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* são os principais micro-organismos apontados, no entanto, bactérias patogênicas emergentes, como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Aeromonas hydrophila*, também têm sido citados como agentes etiológicos de surtos associados ao consumo de HMP (CDC, 2013; ETHELBERG et al., 2010; JOHNSEN et al., 2010; FRIESEMA et al., 2008; FRIESEMA et al., 2007; SAGOO et al., 2003).

O processo de higienização de HMP, que inclui a sanitização, se faz necessário para a remoção de sujeira e resíduos de pesticidas, como também visam reduzir as populações microbianas a níveis aceitáveis que não causem riscos aos consumidores. Portanto, a lavagem e a sanitização são consideradas etapas críticas no processamento e na promoção da segurança microbiológica desses alimentos (SAPERS, 2003; SAGOO et al., 2003; BERBARI; PASCHOALINO; SILVEIRA, 2001).

Uma variedade de sanitizantes, incluindo cloro, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e ozônio, tem sido aplicada para reduzir a população bacteriana inicial em vegetais (SUWA; OIE; FURUKAWA, 2013; GIL et al., 2009; BEUCHAT, 1998). O cloro é, provavelmente, o sanitizante mais utilizado para a sanitização de vegetais frescos. No entanto, alguns estudos mostraram que as concentrações de cloro (50-200 ppm) tradicionalmente utilizados no processo de sanitização não são eficazes para reduzir satisfatoriamente a carga de patógenos em vegetais (LEE; BAEK, 2008; DELAQUIS et al., 2002; BEHRSING et al., 2000).

Atualmente, há uma crescente pressão dos consumidores para a substituição de antimicrobianos quimicamente sintetizados por alternativas mais naturais para alcance da segurança microbiológica de alimentos (SIROLI et al. 2015; GYAWALI; IBRAHIM, 2014; XU et al., 2007). Dentre as alternativas propostas, destacam-se os óleos essenciais (OEs) de plantas, que são considerados produtos “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (GRAS) nas doses normalmente utilizadas em alimentos (BURT, 2004) e aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso como flavorizantes em alimentos e bebidas (FDA, 2002). Estudos realizados anteriormente demonstraram que os OEs de *Origanum vulgare* L. - orégano (OEOV) e de *Rosmarinus officinalis* L. - alecrim (OERO) apresentaram atividade antimicrobiana de amplo espectro frente a micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes contaminantes de alimentos (AZERÊDO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; BARROS et al., 2009).

Torna-se importante ainda destacar que um alimento abriga uma população mista de micro-organismos, incluindo diferentes espécies de bactérias, onde as características desta população diferem em muitos aspectos de uma população isolada. Portanto, a avaliação das propriedades antimicrobianas dos OEs, a partir da execução de experimentos laboratoriais incluindo culturas mistas, pode permitir a obtenção de resultados mais fidedignos do comportamento microbiano das cepas teste frente à ação do antimicrobiano ensaiado (OLIVEIRA et al., 2015).

Considerando esses aspectos, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito inibitório do OEOV e OERO, isolados ou em combinação, frente a uma cultura mista de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), por meio da determinação da concentração inibitória mínima, índice de concentração inibitória fracional e avaliação da viabilidade celular das bactérias teste quando cultivadas em caldo vegetal e em vegetais folhosos frescos, na perspectiva de disponibilizar informações científicas sobre a potencialidade antimicrobiana de produtos naturais de possível uso em alimentos frente a bactérias de importância em HMP.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

As hortaliças minimamente processadas são vegetais que sofreram qualquer tipo de alteração física, mas que oferecem ao consumidor alto valor nutritivo, conveniência e sabor, mantendo ainda o estado fresco original. As etapas do processamento mínimo envolvem pré-seleção, classificação, lavagem, corte, sanitização, enxágue, centrifugação, embalagem e armazenamento refrigerado (Figura 1) (IFPA, 1999).

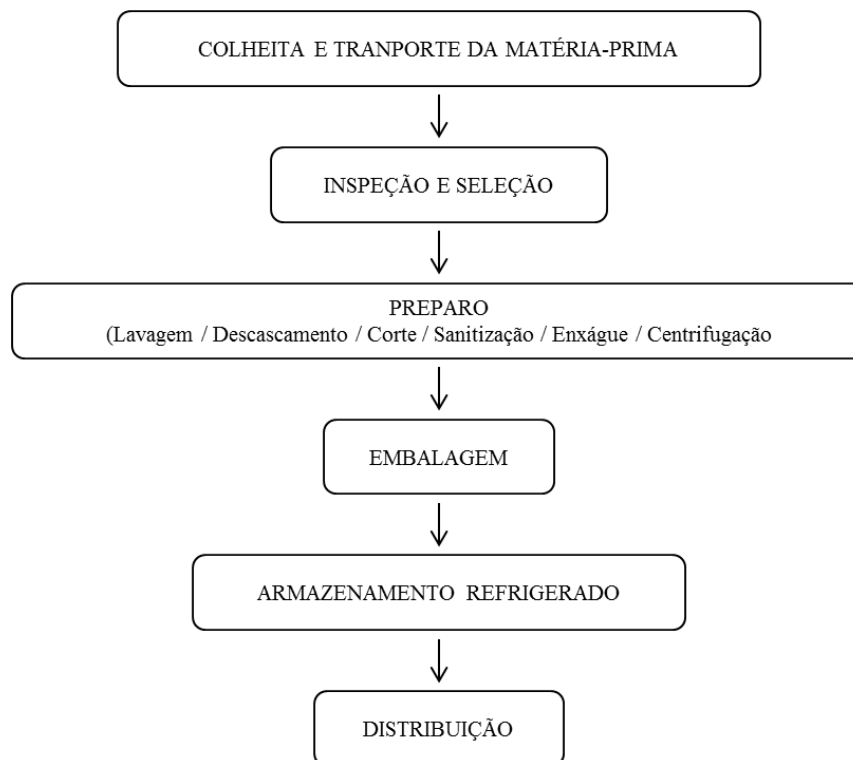


Figura 1. Etapas do processamento mínimo de frutas e hortaliças (Adaptado de Berbari, Paschoalino e Silveira, 2001).

Os produtos minimamente processados estão disponíveis no mercado norte-americano desde a década de 30, quando saladas embaladas começaram a ser comercializadas em quitandas e pequenos mercados dos Estados Unidos (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 (MORETTI, 2007; ODUMERU et al., 2003). Dentre as hortaliças comumente encontradas na forma minimamente processada, podem ser citadas as hortaliças 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).

As hortaliças são consideradas componentes essenciais da dieta humana, fontes de nutrientes indispensáveis, como vitaminas, minerais e fibras. Nos últimos 30 anos tem crescido o número de evidências sugerindo que o consumo regular e em quantidades suficientes desses alimentos, além de promover a nutrição básica, pode melhorar as funções fisiológicas, incrementar a saúde e bem-estar, reduzindo riscos de doenças crônico-degenerativas, tais como doenças cardiovasculares e câncer (PALEKAR et al, 2015; LUO et al., 2015; ZHANG et al., 2013; NEGRI et al., 1991).

Diante disso, o alimento deixou de ser uma parte da vida cotidiana, antes aceita de forma inconsciente, para tornar-se alvo de maior atenção dos consumidores (SANTOS; JUNQUEIRA, 2012). A comercialização de hortaliças tem mudado consideravelmente nos últimos anos, de modo que a qualidade dos produtos, assim como sua apresentação ao consumidor, são características marcantes nessa mudança. Para o consumidor, os alimentos devem ser saudáveis, seguros e práticos. Essas alterações no padrão de consumo têm criado uma demanda para a indústria de alimentos na busca de novas tecnologias de produção de alimentos que atendam esta perspectiva de consumo dos indivíduos, a exemplo da adoção do processamento mínimo de vegetais, cujo propósito é fornecer ao consumidor um produto com vida útil prolongada e livre de qualquer contaminação inaceitável de natureza biológica, química ou física que possa causar dano à saúde ou à integridade do consumidor (CORTEZ-VEGA et al., 2013; SANTOS; JUNQUEIRA, 2012; OMS-OLIU et al., 2010; SANT'ANA et al., 2002).

Entretanto, não é simples preservar os atributos naturais dos vegetais, pois, diferente da maioria das técnicas de processamento que buscam a estabilização e o prolongamento da vida útil dos alimentos, o processamento mínimo pode aumentar a perecibilidade desses produtos. As injúrias provocadas no tecido vegetal durante o processamento mínimo aumentam a exposição dos tecidos, provocando alterações fisiológicas, químicas e microbiológicas (PINHEIRO et al., 2005; SANTOS; JUNQUEIRA, 2012).

A qualidade microbiológica e segurança de HMP tem sido motivo de preocupação nas últimas décadas, devido à sua maior associação com surtos de doenças transmitidas por alimentos (GURLER, 2015; MENG; DOYLE, 2002). Desde as etapas de pré-colheita, as hortaliças estão sujeitas a diversos fatores de estresse, os quais podem influenciar de forma significativa a atividade de micro-organismos nestes substratos. Durante a produção agrícola, a contaminação pode ser oriunda do solo, da água de irrigação, do adubo orgânico ou de fezes animais. Na colheita, armazenamento e transporte, pode ocorrer a contaminação cruzada com os operadores, equipamentos e *containers* (SHEEN; HWANG; JUNEJA, 2011; BEUCHAT, 2002). As operações de descascamento e corte, por sua vez, promovem a liberação de fluidos nutritivos, tornando um ambiente propício não somente à penetração de micro-organismos da superfície para o interior do vegetal, mas principalmente ao seu crescimento e proliferação (IFT e FDA, 2001). Por fim, as condições de distribuição (temperatura, umidade relativa, composição atmosférica e tempo de exposição) também contribuem para a senescência e perda da resistência à deterioração (ARTÉS et al., 2007). Em suma, diversas são as causas que levam ao curto tempo de vida útil das HMP, que vão desde o número e tipo de micro-organismos contaminantes, até as condições de acondicionamento e armazenamento desses vegetais.

Diante deste panorama, em 2006, o *Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs* – Ontario/Canada (OMAFRA, 2006), publicou o *Minimally Processed Fruits and Vegetables – Good Manufacturing Practices Guidebook*, que fornece diretrizes para uma série de práticas de segurança alimentar. Por sua vez, no ano de 2008, a *Food and Drug Administration* (FDA) lançou o *Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables*, que se trata de um documento de orientação destinado a todas as empresas de processamento mínimo de alimentos e determina medidas mais rigorosas de controle na cadeia produtiva desses produtos. Esse documento aborda principalmente os riscos microbiológicos e as medidas de controle adequadas para esses perigos, em face dos constantes surtos de doenças por contaminação microbiológica que vêm ocorrendo nesse mercado.

Neste novo cenário de mudanças nos hábitos alimentares, a conveniência e a praticidade não devem estar dissociadas da finalidade maior a que se destina um alimento minimamente processado, que é promover a saúde e o bem-estar a quem o consome (AZERÊDO, 2011).

2.2 MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS DE IMPORTÂNCIA EM HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

Com o advento do processamento mínimo, as hortaliças passaram a figurar no cenário de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos. A ocorrência do elevado número de surtos veiculados por esses alimentos se dá, principalmente, pelo fato das hortaliças serem consumidas cruas, não havendo nenhum tipo de tratamento térmico que possa assegurar a inativação dos micro-organismos presentes na matéria-prima e/ou àqueles adquiridos durante o processamento (SANT'ANA et al., 2012b; OMAFRA, 2006).

No caso das HMP, a contagem microbiana total após o processamento varia de 3,0 a 6,0 log UFC/g e inclui, em sua maioria, micro-organismos dos grupos Pseudomonadaceae e Enterobacteriaceae, além de bactérias lácticas e leveduras. Podem ainda ser contaminadas com patógenos humanos presentes na matéria-prima ou inseridos durante ou após a colheita (RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007). Na Tabela 1 são listados alguns estudos que relatam a ocorrência de bactérias patogênicas em HMP.

Tabela 1. Estudos que relatam a ocorrência de micro-organismos patogênicos em hortaliças minimamente processadas.

Autor	Micro-organismos isolados
Gurler et al., 2015	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.
Sant'ana et al., 2012b	<i>L. monocytogenes</i>
Song et al., 2015	<i>Staphylococcus aureus</i>
Skočková et al., 2013	<i>E. coli</i>
Oliveira et al., 2011	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.
Verhoeff-bakkenes et al., 2011	<i>Campylobacter</i> spp.
Xanthopoulos et al., 2010	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Meldrum et al., 2009	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>

Bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, são de grande importância para a saúde pública e estão relacionados com surtos de origem alimentar em razão do consumo de frutas e hortaliças frescas contaminadas (PÉREZ-RODRÍGUEZ, 2014; BEUCHAT, 2002). O uso de temperatura baixa, que constitui um importante fator para retardar a deterioração de produtos minimamente processados, não é um processo seguro para impedir o crescimento de alguns desses agentes, uma vez que diversos patógenos são psicotróficos, ou seja, são capazes de crescer e se multiplicar sob condições de refrigeração (VANETTI, 2000). Os demais patógenos, mesmo que não cresçam nas condições de estocagem do produto refrigerado, podem sobreviver e, quando ingeridos, podem causar danos à saúde do consumidor.

Entre as bactérias psicotróficas, se destaca *L. monocytogenes*, considerado um patógeno emergente. Segundo Skovgaard (2007), a emergência ocorre quando um micro-organismo passa a habitar em um determinado produto alimentício onde até então não havia sido previamente isolado. *L. monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma infecção de origem alimentar que tem grande impacto sobre a saúde pública (GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Em indivíduos saudáveis, pode causar gastroenterite febril, o que é geralmente leve e auto-limitada. Entretanto, em mulheres grávidas, pode causar aborto e em crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos pode levar a septicemia e meningite (NOORDHOUT et al., 2014).

Salmonella é uma bactéria conhecida mundialmente como agente causador de infecções alimentares em seres humanos (LAN; REEVES; OCTAVIA, 2009). Atualmente esse gênero é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Em cada subespécie são reconhecidos diferentes sorovares, com base na caracterização de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H), totalizando na atualidade 2.610 sorovares (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Estudos estimam que existam aproximadamente 80,3 milhões de casos anuais de doenças de origem alimentar relacionada com *Salmonella* em todo o mundo e *S. Enteritidis* tem sido considerado o sorovar mais comum em casos de infecções em seres humanos (MAJOWICZ et al., 2010; KOTTWITZ et al., 2010; KANG et al., 2009; CDC, 2007; FERNANDES et al., 2003). Alimentos como frutas e hortaliças minimamente processados também podem ser veículos de *Salmonella*, sendo a contaminação decorrente do controle inadequado da temperatura, da adoção de práticas de manipulação incorretas ou por contaminação de alimentos crus em contato com alimentos processados (SHINOHARA et al., 2008; SANT'ANA et al., 2011).

A presença de *E. coli* em alimentos crus é considerada um fator de contaminação fecal, além disso, indica a possível presença de patógenos entéricos, como por exemplo *Salmonella* spp. Há diversas categorias de cepas de *E. coli* que podem carrear diferentes fatores de virulência. Algumas não são invasivas, mas produzem uma toxina que pode causar diarreia aquosa. Outras invadem a parede intestinal, causando inflamação, febre e disenteria. Ainda existem linhagens que causam inflamação do cólon, com sangramento profuso e síndrome hemolítico-urêmica (TORTORA et al., 2005).

Vários estudos têm relatado a presença de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *E. coli* em HMP. Ao analisar um total de 151 amostras de HMP, Santos et al. (2012) encontraram contagens para micro-organismos psicrotróficos entre 6,2 e 7,6 log UFC/g, com um valor médio de contagem para enterobactérias de 5,44 log UFC/g. Também foi detectada a presença de *E. coli* (4 amostras), *Listeria* spp. (duas amostras), *A. hydrophila* (11 amostras) e *B. cereus* (34 amostras).

Um estudo realizado por Maistro et al. (2012) na cidade de Campinas - SP, avaliou um total de 172 amostras de HMP para bactérias aeróbias-mesófilas, coliformes totais, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. Todas as amostras apresentaram populações de micro-organismos aeróbios mesófilos e coliformes totais acima de 4 log UFC/g e 3,4 log UFC/g, respectivamente. Em algumas das amostras analisadas foi detectada a presença de *E. coli* (10 amostras), *Salmonella* spp. (01 amostra) e *L. monocytogenes* (02 amostras).

Um total de 162 amostras de HMP, comercializadas em Ribeirão Preto – SP, foram avaliadas por Oliveira et al. (2011). Bactérias psicrotróficas foram encontradas em 96,7% das amostras com contagens acima de 5 log UFC/g, enquanto os coliformes totais e termotolerantes estavam presentes, respectivamente, em 132 (81,5%) e 107 (66%) amostras. *E. coli* foi isolada de 86 (53,1%) amostras, *Listeria* spp. de 6 (3,7%) amostras e *Salmonella* spp. de 2 (1,2%) amostras. Sant’Ana et al. (2011) avaliaram a qualidade microbiológica de 512 amostras de HMP comercializadas na cidade de São Paulo e constataram a presença de *Salmonella* spp. em quatro amostras. Os sorovares detectados foram *Salmonella* Typhimurium (três amostras) e *S. Enteritidis* (uma amostra). Quatorze amostras apresentaram contagens de *E. coli* acima do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira (10^2 UFC/g).

Embora a legislação brasileira não estabeleça padrões microbiológicos para vegetais minimamente processados, é comum utilizar a Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro

de 2001 (BRASIL, 2001) como referência para garantir a sanidade desses produtos, uma vez que essa Resolução prevê padrões microbiológicos para hortaliças e frutas frescas *in natura*.

Diante disso, torna-se imprescindível que a indústria de HMP controle os aspectos higiênico-sanitários da matéria-prima durante o processo de produção por meio da implementação de programas de qualidade baseados em fundamentos tecnológicos comprovadamente eficientes, os quais podem garantir a disponibilização de produtos ao consumidor que sejam possuidores de qualidade microbiológica satisfatória (OLIVEIRA et al., 2011).

2.3 SANITIZAÇÃO DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

A lavagem e a sanitização são duas etapas críticas durante o processamento mínimo de hortaliças, sendo necessárias para a remoção de sujeira, resíduos de pesticidas e, principalmente, para eliminação dos micro-organismos responsáveis pela deterioração e perda da qualidade desse tipo de produto. Esses processos reduzem também o risco de doenças transmitidas por alimentos devido ao controle do crescimento de bactérias patogênicas nestes substratos (ALLENDE et al., 2008; SAPERS, 2003; BERBARI; PASCHOALINO; SILVEIRA, 2001).

Segundo Moretti (2007), reduções significativas da população microbiana em HMP podem ser obtidas por meio da aplicação de compostos sanitizantes. Entretanto, a eficácia desses compostos depende de fatores que atuam de maneira isolada ou em conjunto, tais como pH, temperatura da água, tempo de contato, natureza da superfície dos produtos e carga microbiana inicial (GIL et al, 2009).

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

O uso de sanitizantes para hortaliças frescas e minimamente processadas, como por exemplo, hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ácido peroxiacético e ozônio, foi aprovado pela FDA (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). Soma-se a isso o fato de que esses compostos podem afetar negativamente a qualidade nutricional e sensorial do produto e o questionamento acerca dos aspectos de segurança alimentar de preservativos sintéticos, uma vez que tais substâncias têm sido citadas como responsáveis pelo desencadeamento de efeitos carcinogênicos, bem como de toxicidade residual (SKANDAMIS; NYCHAS, 2000).

O hipoclorito de sódio tem sido o sanitizante mais utilizado em alimentos para o controle de micro-organismos, sendo de uso rotineiro na lavagem de HMP (LEE; BAEK, 2008; ARTÉS et al., 2007). Contudo, o cloro tem um efeito limitado na redução de micro-organismos em superfícies de hortaliças, alcançando uma redução de um a dois ciclos logarítmicos na população microbiana, além de possuir a desvantagem de formar compostos clorados com potencial efeito carcinogênico (PARK et al., 2009; ALLENDE et al., 2008; SAPERS, 2001). O uso de compostos a base de cloro leva a possibilidade de ocorrência de 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). No entanto, em razão dos sistemas de lavagem com soluções a base de cloro resultar em subprodutos nocivos e, em razão da eficácia restrita na redução de contaminantes, sanitizantes alternativos e inócuos têm sido investigados e pesquisados (GÓMEZ-LÓPEZ, 2013; 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 HMP. Rodgers et al. (2004) demonstraram que uma solução de 5 ppm de ClO_2 foi eficaz para inibir *L. monocytogenes* em alface. 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 HMP, fazem-se necessários mais estudos.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é classificado como um composto GRAS pela FDA para uso em alimentos como agente alvejante, oxidante, redutor e antimicrobiano. O principal objetivo do tratamento de frutas e vegetais 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 peracético. 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., 2007). Sua ação antimicrobiana primária está relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio, causando também desnaturação de proteínas e enzimas, além de 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, o ácido peracético possui desvantagens, as citar instabilidade em altas concentrações (15%) e alto custo quando comparado com outros sanitizantes tradicionais (KUNIGK; ALMEIDA, 2001). O ozônio (O_3), reconhecido como potente agente oxidante, tem-se mostrado mais eficaz que o cloro na eliminação de micro-organismos em produtos vegetais. Este composto estabelece sua ação antimicrobiana por meio da oxidação dos componentes vitais da célula, evitando o crescimento microbiano e permitindo a extensão da vida de prateleira dos vegetais (PARISH et al., 2003).

Atualmente, há um forte debate quanto à segurança dos conservantes químicos, uma vez que muitos destes produtos são considerados como possuidor de propriedades carcinogênicas e teratogênicas, além de toxicidade residual (GÓMEZ-LÓPEZ, 2013; SCHOENY, 2010; ÖLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009; MOREIRA et al., 2005). Garantir a segurança e, ao mesmo tempo, atender à demanda para a conservação de atributos nutricionais e de qualidade, têm resultado na crescente busca de conservantes naturais com potencial aplicação em alimentos, que possam ser utilizados de forma isolada ou em combinação com outra tecnologia. Entretanto, a escolha do antimicrobiano deve ser baseada na sua compatibilidade química e sensorial com o alimento de aplicação, na sua efetividade contra micro-organismos indesejáveis, segurança, dentre outras características de interesse (SETTANNI; CORSETTI, 2008).

Entre as tecnologias emergentes de conservação de alimentos, o uso de agentes antimicrobianos naturais está se tornando uma medida de controle reconhecida mundialmente, seja de forma isolada ou combinada com outras tecnologias de preservação (SILVA-ANGULO, 2014). A aplicação de conservantes naturais com objetivo de aumentar a vida de prateleira de alimentos é considerada um método promissor devido as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Acredita-se ainda que estes novos conservantes possam diminuir os custos de processamento e são ainda acreditadas por reduzirem o surgimento de micro-organismos resistentes ou mesmo apresentarem efetividade na inibição de micro-organismos resistentes as tecnologias clássicas de uso no controle de micro-organismos em alimentos (GYAWALI; IBRAHIM, 2012). Nesse cenário, destacam-se os óleos essenciais (OEs) de plantas, considerados produtos naturais GRAS, pois possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana, apresentando eficácia no controle de bactérias patogênicas e deteriorantes de importância em vegetais prontos para o consumo (AZERÊDO et al. 2011; GUTIERREZ et al., 2008; OUSSALAH et al., 2006; BURT, 2004).

2.4 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários com propriedades biológicas, tais como citotoxicidade, atividades antiparasitária e antimicrobiana (WINK, 2012). Muitos desses compostos naturalmente presentes em plantas, ervas e especiarias têm demonstrado possuir efeito inibitório frente agentes patogênicos de origem

alimentar, de modo que a atividade antimicrobiana destas substâncias depende da sua composição química (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014; ESPINA et al., 2011). Os extratos obtidos de uma diversidade de plantas têm sido utilizados há séculos com objetivo de conferir sabor e aroma aos alimentos, como medicamentos e como agentes conservantes de alimentos (KIM et al., 2011).

OEs são metabólitos secundários de plantas sintetizados em estruturas glandulares das células vegetais, podendo estar concentrados em diversas regiões (flores, brotos, folhas, sementes, frutos, raízes, galhos, cascas e caule) ou armazenados em células secretoras, cavidades ou células epidérmicas e consistem em misturas complexas de compostos orgânicos de baixo peso molecular com diferentes potenciais de atividade antimicrobiana (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012; AIT-OUAZZOU et al., 2011; BAKKALI et al., 2008). Esses compostos, ou constituintes de OEs como geralmente são designados, podem ser divididos de acordo com sua estrutura química em quatro grupos: terpenos, terpenóides, fenilpropenos e outros (Figura 2) (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012)

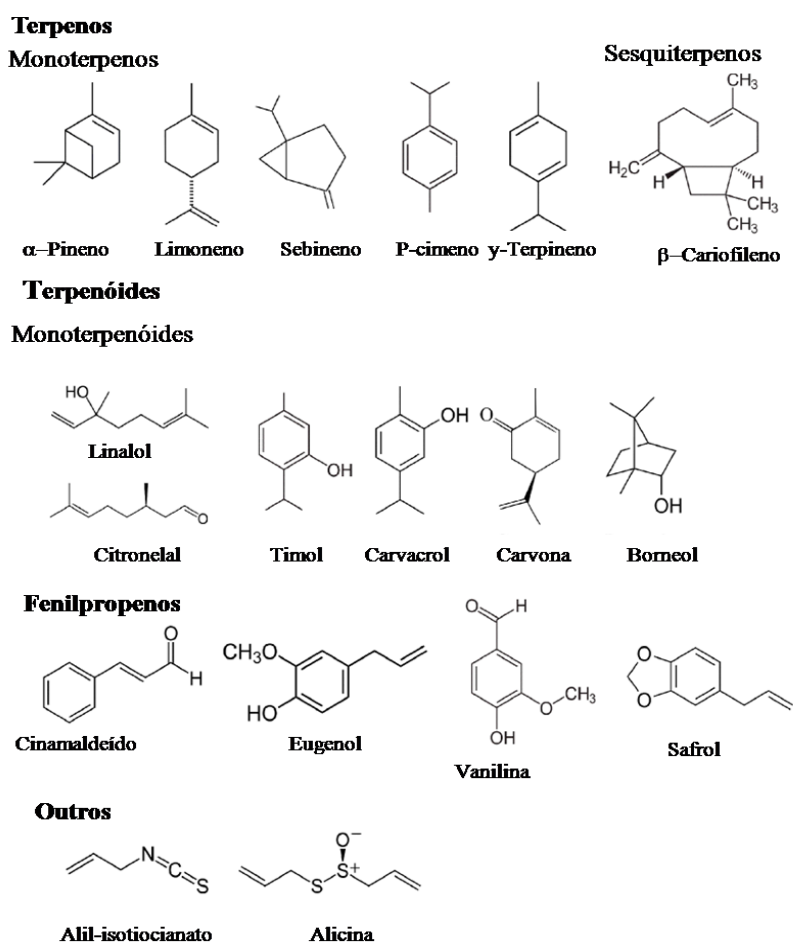


Figura 2. Estrutura química dos principais constituintes dos óleos essenciais (Adaptada de Hyldgaard; Mygind; Meyer, 2012).

Os terpenos mais comuns são os monoterpenos e sesquiterpenos, no entanto, hemiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos também podem estar presentes na composição de OEs. Alguns terpenos são hidrocarbonetos, porém quando possuem um oxigênio em sua estrutura (álcoois, aldeídos ou cetonas) são chamados de terpenóides (BAKKALI et al., 2008).

Alguns autores têm atribuído o potencial antimicrobiano dos OEs aos constituintes presentes em maior quantidade, entretanto os componentes presentes em quantidade inferiores podem exercer efeito sinérgico e/ou aditivo com os constituintes majoritários (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). A eficácia antimicrobiana dos OEs não pode ser baseada em um mecanismo de ação específico, tendo em vista que essas substâncias consistem em uma mistura de componentes químicos que irão agir em diferentes alvos na célula microbiana (Figura 3) (BURT, 2004). Supõe-se, que essa característica possa dificultar o desenvolvimento de tolerância bacteriana aos OEs (SKANDAMIS et al., 2008).

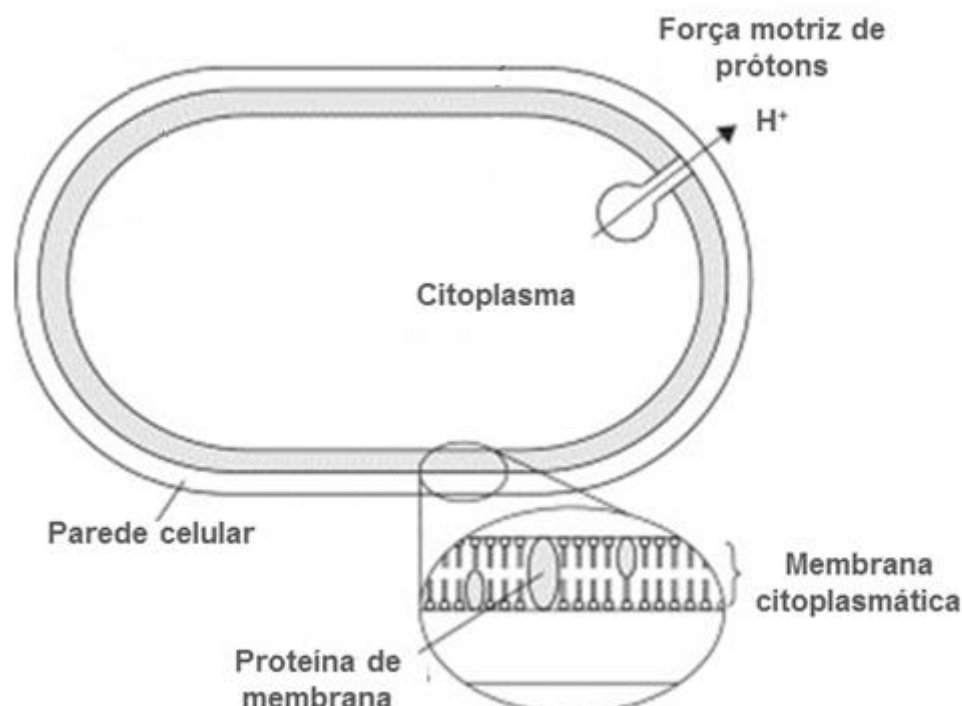


Figura 3. Representação dos alvos da célula bacteriana sugeridos como sítios de ação dos óleos essenciais e seus constituintes (Adaptada de Burt, 2004).

Como citado anteriormente, atribui-se a atividade antimicrobiana de OEs principalmente aos terpenos presentes em sua composição. Segundo Turina et al. (2006), os possíveis mecanismos de ação dos OEs são: alteração da bicamada lipídica da membrana celular microbiana, com aumento da permeabilidade e posterior liberação de constituintes intracelulares vitais, além de danos causados nos sistemas enzimáticos do microrganismo. Acredita-se, que estes compostos se dissolvam na membrana microbiana e, desta forma, penetrem na célula onde podem interagir com mecanismos essenciais para o metabolismo celular (MARINO; BERSANI; COMI, 2001). Os danos causados a integridade celular podem interferir na manutenção do estoque energético das células e, conseqüentemente, nos processos dependentes de energia, tais como transporte de solutos, regulação do metabolismo, síntese de macromoléculas, como toxinas extracelulares; e motilidade (SILVA et al., 2010; COX et al., 2001; TRUMPOWER; GENNIS, 1994).

Dentre os OEs investigados quanto a atividade biológica, aquele obtido das folhas de orégano (*Origanum vulgare* L.) tem se revelado como possuidor de destacáveis propriedades antioxidantes (CASTILHO et al., 2012; ALBANO; MIGUEL, 2011), antibacteriana (SILVA et al., 2013; SOUZA et al., 2010; MOREIRA et al., 2005; NOSTRO et al., 2004), antifúngica e antimutagênica (FARÍAS et al., 2010; FIGIEL et al., 2010; ÖZBEK et al., 2008; YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ, 2006). Souza et al. (2007) em estudo inicial sobre o potencial antimicrobiano de diferentes OEs de especiarias de origem brasileira, encontrou uma destacável propriedade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* L. (OEOV) sobre uma variedade de bactérias patogênicas e deteriorantes, como também de espécies leveduriformes de interesse em alimentos. O OEOV consiste em uma fonte rica de monoterpênicos lipofílicos, dos quais os principais responsáveis por sua atividade antimicrobiana são os isômeros carvacrol e timol (SILVA et al., 2010).

Um aspecto importante a ser considerado para a aplicação do OEOV como antimicrobiano natural em alimentos consiste no seu impacto sensorial sobre os produtos. Se altas concentrações forem necessárias para garantir a atividade antimicrobiana em matrizes alimentares, as alterações no sabor e odor dos alimentos podem exceder os limites aceitáveis. Com vistas a evitar os efeitos indesejáveis sobre os atributos sensoriais, pesquisas vêm sendo realizadas com a combinação de doses subinibitórias desse óleo essencial (OE) com outros agentes ou processos antimicrobianos (AZEREDO et al., 2011; DIMITRIJEVIĆ et al., 2007).

Neste sentido, o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) (OERO), que embora não faça parte do grupo de OEs possuidores de elevado poder antimicrobiano, tem em suas moléculas grupos funcionais com propriedades biológicas, as quais podem, de

maneira aditiva ou sinérgica, interagir com os componentes presentes no OEOV. Seu uso tem sido voltado para a área medicinal, em virtude de suas constatadas propriedades anti-inflamatória, neuroprotetora (BENINCÁ et al., 2011; IZUMI et al., 2007; PENG et al., 2007), hepatoprotetora (SOTELO-FELIX et al., 2002), antioxidante (PÉREZ-FONS; GARZN; MICOL, 2010), antimutagênica e antimicrobiana (OLUWATUYI; KAATZ; GIBBSONS, 2004). Este conjunto de propriedades confere a essa especiaria um atrativo funcional para uma possível aplicação em indústrias de alimentos.

A atividade antimicrobiana do alecrim é atribuída à presença de flavonóides, ácidos fenólicos e da fração OE. Entretanto, o OERO quando comparado aos de outras especiarias (orégano, sálvia e tomilho) tem se mostrado menos efetivo na inibição do crescimento de diversas espécies microbianas. Acredita-se que a baixa atividade aconteça quando ocorre no OERO a presença majoritária de α -pineno, um hidrocarboneto monoterpênico sem núcleos aromáticos e grupos funcionais polares (PORTE e GODOY, 2001). A diminuída atividade do α -pineno em relação a de outros constituintes do OERO foi confirmada por Jiang et al. (2011), quando realizaram estudo a fim de comparar a atividade antimicrobiana do OERO com a de alguns de seus compostos isolados, incluindo o α -pineno e 1,8-cineol. Os autores verificaram que o OE foi o que apresentou maior atividade, seguido pelo 1,8-cineol.

A atividade antimicrobiana dos OEs em matrizes alimentares tem sido avaliada em diversos estudos. No entanto, essa atividade em sistemas de alimentos é, em geral, reduzida quando comparado aos testes *in vitro*, devido à influência de gorduras, carboidratos, proteínas, sais e pH sobre a eficácia desses agentes (BURT, 2004). Segundo Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008) esses componentes poderiam proteger as bactérias contra a ação de OE. Os autores também relatam a possibilitar de reparação mais rápida das células injuriadas em alimentos, o que se relaciona a maior disponibilidade de nutrientes nestes substratos, quando comparada aos meios laboratoriais.

Outro fator importante a ser ressaltado em relação a atividade antimicrobiana de OEs é que a ação combinada de OEs e/ou constituintes individuais pode causar uma potenciação do efeito antimicrobiano. Isso se estende ainda à mistura de OEs com outros tipos de antimicrobianos (SOLORZANO-SANTOS; MIRANDA NOVALES, 2011). Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008) e Lambert et al. (2001), quando combinaram o OEOV com o OE de tomilho detectaram um efeito antimicrobiano aditivo frente a bactérias contaminantes de alimentos. No estudo realizado por Azerêdo et al. (2011) verificou-se efeito sinérgico entre o OEOV e OERO, cujos componentes majoritários são, respectivamente, carvacrol e 1,8-cineol,

frente à *A. hydrophila*, *L. monocytogenes* e *Y. enterocolitica*, e efeito aditivo contra *P. fluorescens*.

Em estudo *in vitro*, Dimitrijević et al. (2007) detectaram efeito sinérgico entre o ácido láctico e os OEs de alecrim ou tomilho, quando usados em concentrações subinibitórias. Fu et al. (2007) também investigaram a possível interação entre os OEs de cravo e alecrim em concentrações subinibitórias, e verificaram que o efeito antimicrobiano foi influenciado não apenas pela proporção entre os OEs, mas foi, sobretudo, microrganismo-dependente. Os autores verificaram efeito antimicrobiano aditivo contra *S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. vulgaris* e *P. aeruginosa*, e efeito sinérgico contra *Candida albicans* e antagônico para *Aspergillus niger*. Apostolidis, Kwon e Shetty (2008) verificaram que embora haja um teor mais elevado de compostos fenólicos no OE OV quando aplicado isoladamente, a eficácia antimicrobiana ocorreu de forma mais intensa quando o este OE foi aplicado em combinação com o extrato de cranberry. Isto implica que o perfil qualitativo dos compostos fenólicos pode ser mais importante do que a sua quantidade total

Estes resultados suportam a ideia de que, quando usados em combinação, as concentrações requeridas podem ser menores, minimizando assim o impacto sobre os atributos sensoriais. Os efeitos benéficos dessas combinações, sejam de natureza aditiva ou sinérgica, são de interesse industrial, uma vez que menores concentrações seriam utilizadas em sistemas de conservação de alimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Óleos essenciais

Os OEs de *Origanum vulgare* L. (lote ORETU679; densidade a 20°C: 0,90, índice de refração a 20°C: 1,49) e *Rosmarinus officinalis* L. (lote ROSTUN04; densidade a 20°C: 0,94, índice de refração a 20°C: 1,51) foram obtidos da empresa Laszlo Aromaterapia Indústria e Comércio Ltda. (Minas Gerais, Brasil). Este fornecedor extrai OEs em escala industrial por destilação a vapor. Os OEs foram ensaiados em concentrações que variaram de 40-0,03 µL/mL. As emulsões destes óleos foram preparadas em Caldo BHI (Himedia, Índia), utilizando-se ágar bacteriológico (0,15 % p/v) como agente estabilizador (DE SOUZA et al., 2010).

3.1.2 Hortaliças

As hortaliças, alface (*Lactuca sativa* L.), e acelga (*Beta vulgaris* L. var. cicla), foram obtidas em supermercados da cidade de João Pessoa - PB, tomando-se o cuidado em escolher aquelas que não apresentavam quaisquer sinais de alteração de causa biológica, química e/ou física. Os vegetais foram adquiridos nos dias dos experimentos, sendo transportados em caixas isotérmicas para o Laboratório, onde foram realizadas as análises.

3.1.3 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados nos ensaios antimicrobianos foram cepas tipo padrão de *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *E. coli* (UFPEDA 224) e *S. Enteritidis* (UFPEDA 414), gentilmente cedidas da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos

da Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. As cepas foram mantidas em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) adicionado de 15% de glicerol e armazenadas a -20°C.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Identificação dos constituintes dos óleos essenciais

Os componentes que formam o OEOV e OERO foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu). A análise por GC-MS foi realizada sob as seguintes condições: coluna capilar RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm); temperatura programação: 60-240 ° C (3°C / min); Temperatura do injetor: 250°C; temperatura do detector: 220°C; gás carreador: hélio ajustado a 0,99 mL / min de velocidade; energia ionizante: 70 eV; faixa de massa (m / z): 40-500. Para a identificação dos constituintes individuais essenciais petróleo foi utilizado o banco de espectros própria biblioteca de GC / MS, NIST / EPA / NIH Mass Spectral Banco de Dados (Versão 1.7). A quantificação dos componentes foi obtida pelas áreas de cada um dos componentes detectados e expressa em área percentual (%).

3.2.2 Padronização do inóculo microbiano

A padronização do inóculo bacteriano foi realizada de acordo com a metodologia descrita por McMahon et al. (2008) (Figura 4). Cada cepa foi estriada em placa de Petri contendo ágar BHI, incubadas a 35°C por 18 - 24 horas (*overnight*) e, posteriormente, cultivadas em 10 mL de Caldo BHI a 35°C por 17 horas sob agitação (150 rpm). Em seguida, a massa celular dos cultivos foi coletada por centrifugação (5200 rpm / 15 min / 4°C), lavada duas vezes em solução salina (NaCl a 0,85% p/v) e ressuspensa em 10 mL de solução salina. As suspensões microbianas foram diluídas seriadamente (10^{-1} a 10^{-8}) e foi realizada a leitura da Densidade Óptica de cada diluição em espectrofotômetro a 625 nm (DO_{625}), utilizando-se solução salina como branco. Para a determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) em cada leitura, foram semeados 0,1 mL de cada diluição em placas de Petri

contendo ágar BHI. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C e, após o período de incubação, foram submetidas à contagem do número de colônias formadas. A partir do número de colônias obtido em cada diluição, correlacionou-se a contagem bacteriana (UFC/mL) à leitura da DO_{625} . A DO do inóculo utilizado nos ensaios foi de 0,1 ($\sim 10^7$ UFC/mL). Após a padronização do inóculo de cada cepa, foi realizada a mistura dos inóculos na proporção de 1:1:1, para formação do inóculo misto, o qual foi utilizado nos ensaios antimicrobianos (OLIVEIRA et al., 2015).

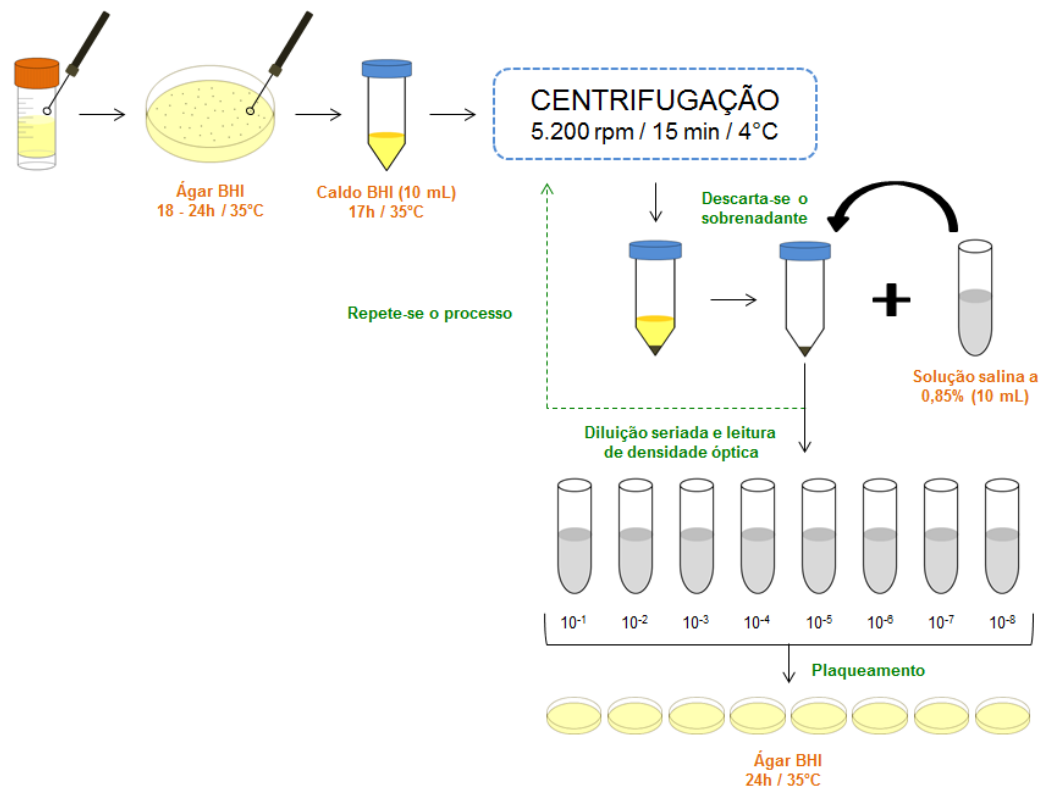


Figura 4. Fluxograma para padronização do inóculo bacteriano.

3.2.3 Preparação do caldo vegetal

Uma mistura (1:1) das amostras contendo 60 g de hortaliças foi triturada com 400 mL de água destilada usando um misturador doméstico e filtrada em vácuo utilizando papel de filtro Whatman nº1. O material obtido foi esterilizado por filtração em Millipore 0,22 µm. O caldo filtrado foi armazenado a -20°C em alíquotas de 50 mL, e quando requerida uma alíquota foi descongelado sob refrigeração ($7 \pm 1^\circ\text{C}$) e utilizados para ensaios (AZERÊDO et al., 2011).

3.2.4 Ensaios de atividade antimicrobiana

3.2.4.1 Determinação 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). As emulsões dos OEs foram preparadas em caldo BHI adicionado de ágar bacteriológico (0,15 % p/v) como agente emulsoestabilizador da emulsão e o inóculo microbiano ($\sim 10^7$ UFC/mL) foi preparado como descrito no item 3.2.2. Quatro mililitros de caldo BHI foi inoculado com 1 mL do inóculo bacteriano (simples ou misto), misturado com 5 mL da emulsão de OEOV ou OERO e homogeneizados vigorosamente durante 30 segundos utilizando um vórtex. O sistema foi estaticamente incubado durante 24 h a 35°C (Figura 5). A CIM foi definida como a menor concentração de cada OE necessária para prevenir o crescimento bacteriano visível. Frascos sem a adição de OE foram testados de forma semelhante como controle (NOSTRO et al., 2001).

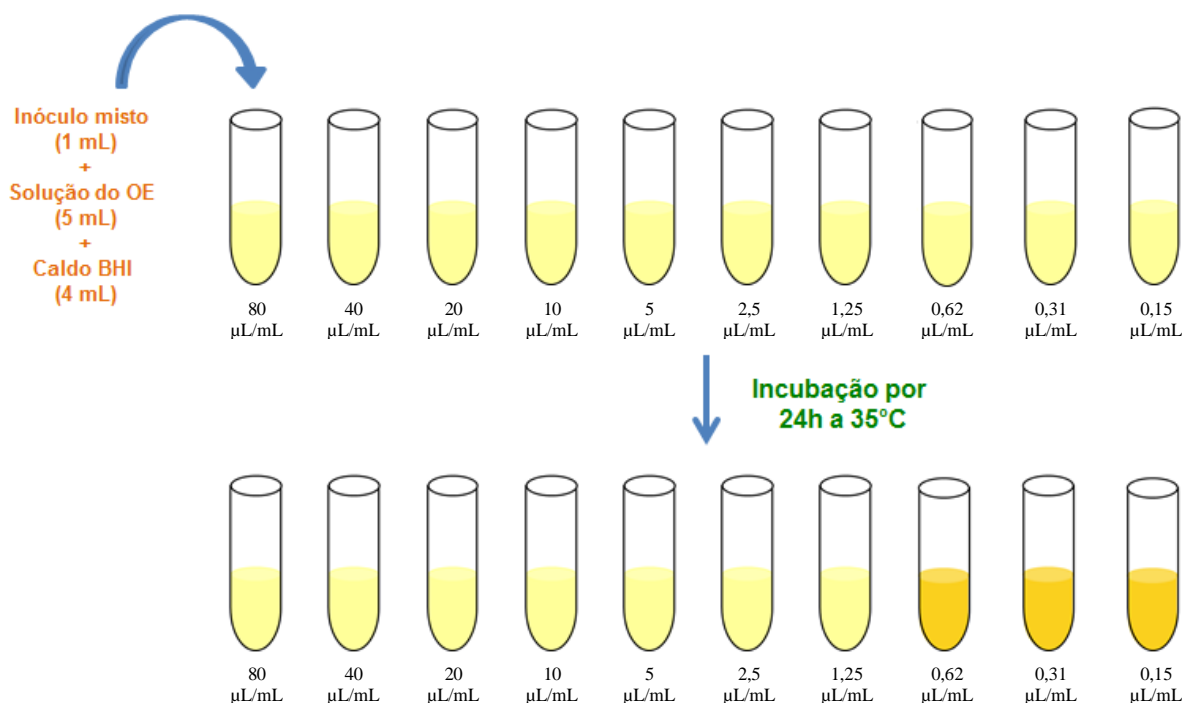


Figura 5. Fluxograma para determinação da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. frente inóculo simples e misto.

3.2.4.2 Avaliação do efeito da ação combinada dos óleos essenciais

Para avaliar o efeito sinérgico dos OEs frente ao inóculo misto, foi realizada a determinação da Concentração Inibitória Fracional (CIF) pelo método de *Checkerboard*. As emulsões dos OEs foram preparadas em caldo BHI adicionado de ágar bacteriológico (0,15 % p/v) como agente estabilizador da emulsão e o inóculo microbiano foi preparado como descrito no item 3.2.2. Foram utilizadas concentrações finais iguais a CIM x 2, CIM, $\frac{1}{2}$ CIM, $\frac{1}{4}$ CIM, $\frac{1}{8}$ CIM e $\frac{1}{16}$ CIM, que foram de 1,2 a 0,038 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 10 a 0,31 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para o OEOV e OERO, respectivamente. Os antimicrobianos foram associados como no esquema da Figura 6.

Foram adicionados 45 μL de cada emulsão de óleo e em seguida 10 μL do inóculo misto. Na horizontal, o OEOV foi adicionado a cada poço, da esquerda para direita, de forma crescente. Na vertical, o OERO foi adicionado, de cima para baixo, de forma decrescente. Após a adição do inóculo, as microplacas foram incubadas a 35°C por 24h e após esse período foi realizada a leitura adicionando-se 30 μL do revelador resazurina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizado como indicador de crescimento bacteriano.

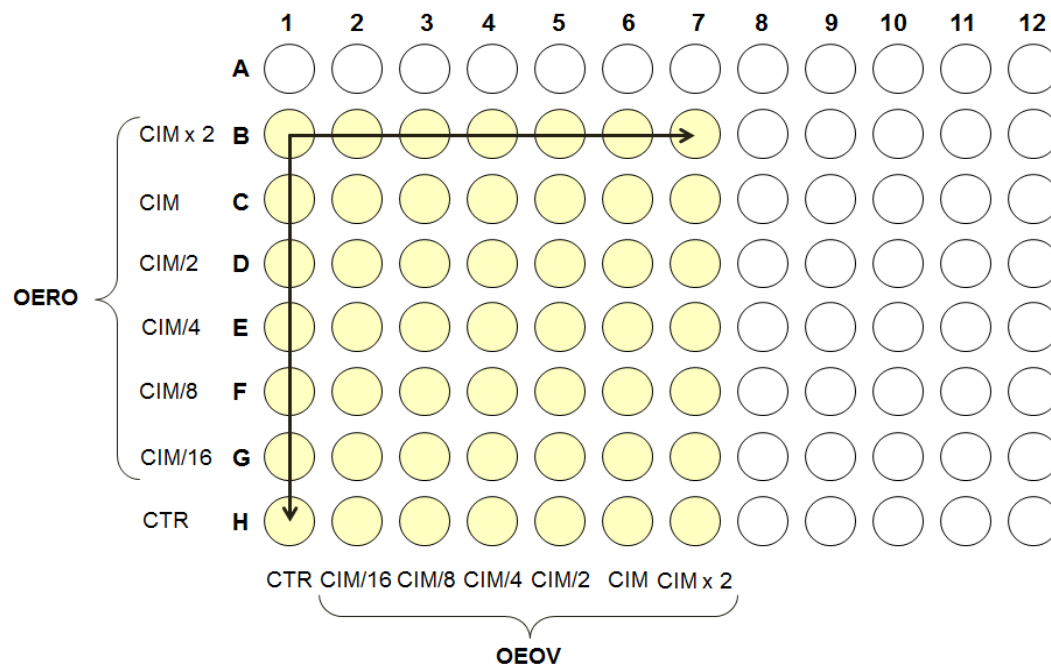


Figura 6. Fluxograma para avaliação do efeito sinérgico dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. frente inóculo misto.

Para a avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{ICIF} = \text{CIF (OEOV)} + \text{CIF (OERO)}$$

$$\text{ICIF} = \frac{(\text{CIM OEOV na combinação})}{(\text{CIM do OEOV})} + \frac{(\text{CIM OERO na combinação})}{(\text{CIM do OERO})}$$

Os resultados obtidos foram interpretados como sinergismo ($\text{FIC} \leq 0.5$), adição ($0.5 < \text{FIC} < 1$); indiferença ($1 < \text{FIC} < 4$) e antagonismo ($\text{FIC} > 4$) (GUTIERREZ et al., 2008; SCHELZ; MOLNAR; HOHMANN, 2006).

3.2.5 Influência dos óleos essenciais sobre a viabilidade das cepas bacterianas

Os ensaios de interferência dos OEs (isolados e em combinação) sobre a viabilidade das cepas bacterianas foram realizados pelo método de contagem de células viáveis. Para isso, 4 mL de caldo vegetal foi inoculado com 1 mL da suspensão bacteriana (inóculo misto), em seguida adicionado 5 mL da emulsão dos OEs isolados (CIM OEOV e CIM OERO) ou em combinação ($\frac{1}{2}$ CIM OEOV + $\frac{1}{2}$ CIM OERO; $\frac{1}{2}$ CIM OEOV + $\frac{1}{4}$ CIM OERO; $\frac{1}{4}$ CIM OEOV + $\frac{1}{2}$ CIM OERO; $\frac{1}{4}$ CIM OEOV + $\frac{1}{4}$ CIM OERO).

Por fim, o sistema foi agitado por 30 segundos e incubado sob temperatura de refrigeração a 7°C. Em diferentes intervalos de tempos (0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas) uma alíquota de 1 mL da suspensão foi seriadamente diluída (1:10 v/v) de 10^{-1} a 10^{-5} em solução salina e uniformemente inoculada em placas de Petri estéreis contendo meio seletivo estéril para os micro-organismos testes: Listeria Agar Base seletivo + Suplemento seletivo para Listeria II para *L. monocytogenes*; Salmonela-Shigela Ágar para *S. Enteritidis* e Eosyne-Metilen-Blue (EMB) Ágar para *E. coli*, sendo então incubadas por 24-48 h a 35°C (Azeredo et al, 2011; Sousa et al, 2012). Sistemas sem a adição das emulsões de OE foram utilizados como controle.

3.2.6 Efeito dos OEs na sobrevivência de bactérias patogênicas em hortaliças minimamente processadas

Porções de 90 g de um pool de alface e acelga (em uma proporção de 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*, *S. enteritidis* e *E. coli* em uma proporção de 1:1:1, aproximadamente 10^7 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 submersas em 250 mL das emulsões dos OEs isolados (CIM OEOV e CIM OERO) e em combinação ($1/2$ CIM OEOV + $1/2$ CIM OERO; $1/2$ CIM OEOV + $1/4$ CIM OERO).

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 segundos. Posteriormente, uma série de diluições decimais (10^{-2} - 10^{-5}) foi realizada no mesmo diluente e a enumeração de bactérias foi determinada pela inoculação de 0,1 mL de cada diluição da amostra em ágar seletivo estéril: Listeria Agar Base seletivo + Suplemento seletivo para Listeria II para *L. monocytogenes*; Salmonela-Shigela Ágar para *S. Enteritidis* e Eosyne-Metilen-Blue (EMB) Ágar para *E. coli*, sendo então incubadas por 24-48 h a 35°C (Azeredo et al, 2011; Sousa et al, 2012). Frascos isentos das emulsões de OE foram utilizados como controle.

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como uma média dos ensaios. A análise estatística foi realizada para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$), utilizando ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey com o software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia), enquanto para confecção dos gráficos foi utilizado o software Prisma versão 6.

REFERÊNCIAS

- AIT-OUAZZOU, A. et al. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 320-329, 2011.
- ALBANO, S.M.; MIGUEL, M.G. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. **Industrial Crops and Products**, v.33, p.338-343, 2011.
- 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, 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, p. 11-15, 2009.
- APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.I.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.317-324, 2008.
- ARTÉS, F. et al. Improved strategies for keeping overall quality of fresh-cut produce. **Acta Horticulturae**, v. 33, p. 245-258, 2007.
- AZERÊDO, G.A. et al. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541-1548, 2011.
- BADAWY, M.E.I.; ABDELGALEIL, S.A.M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776-782, 2014.
- BAJPAI, V.K.; BAEK, K.H.; KANG, S.C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chemistry and Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.
- BARROS, J.C. et al. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, p. 1139-1143, 2009.
- BEHRSING, J. et al. Efficacy of chlorine for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, p. 187-192, 2000.

BENINCÁ, J.P. et al. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. **Food Chemistry**, v.124, p.468-475, 2011.

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

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

BEUCHAT, L.R. **Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: A review**. Food Safety Unit, World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2. 1998.

BHAGWAT, A.A.; MATTHEWS, K. Microbiological safety of fresh-cut produce: Where are we now? In: Matthews, K. (Ed.), **Microbiology of fresh produce**. Washington, DC: ASM Press. pp. 121-165, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasil**, n. 7-E, p. 46-53, 10 jan. 2001. Seção I.

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

CASTILHO, P.C. et al. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v.23, p.552-558, 2012.

CDC - CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. **Multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to ready-to-eat salads** – United States, 2013. Available at: <http://www.cdc.gov/ecoli/2013/O157H7-11-13/index.html> (accessed 02.02.2015).

CDC - CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. **Multistate outbreak of human Salmonella infections associated with frozen pot pies** – United States, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.57, p. 1277-1280, 2007.

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, p. 1753-1764, 2013.

COX, S. et al. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. **Molecules**, v. 6, p. 87-91, 2001.

de SOUZA, E.L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 308-311, 2010.

DELAQUIS, P. et al. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat iceberg lettuce washed in warm chlorinated water. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 459-464, 2002.

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

ESPINA, L. et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, p. 896-902, 2011.

ETHELBERG, S. et al. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. **Euro Surveillance**, v. 15, 2010. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19484>> Acesso em: 10 jan. 2015.

FARIÁS, G. et al. Morphological, yielding and quality descriptors of four clones of *Origanum* spp. (*Lamiaceae*) from the Argentine Littoral region Germplasm bank. **Industrial Crops and Products**, v.32, p. 472-480, 2010.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables**. 2008. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/ucm064458.htm>>. Acesso em: 07 dez. 2014.

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. 2014.

FERNANDES, S.A. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 59-63, 2003.

FIGIEL, A. et al. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. **Journal of Food Engineering**, v.98, p.240-247, 2010.

FRIESEMA, I. et al. An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, , September – October 2007. **Euro Surveillance**, v. 13, 2008. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19065>> Acesso em: 10 jan. 2015.

FRIESEMA, I. STEC O157 outbreak in the Netherlands, September – October, 2007. **Euro Surveillance**, v. 12, 2007. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3297>> Acesso em: 10 jan. 2015.

FU, Y. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v.21, p.989-994, 2007.

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

GIL, M.L. et al. 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 37-45.

GÓMEZ-LÓPEZ, V.M. Generation of trihalomethanes with chlorine-based sanitizers and impact on microbial, nutritional and sensory quality of baby spinach. **Postharvest Biology and Technology**, v. 85, p. 210-217, 2013.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003 - 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann - Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 26-29, 2010.

GURLER, Z. et al. The microbiological quality of ready-to-eat salads in Turkey: A focus on *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 196, p. 79-83, 2015.

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

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

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 29-45, 2012.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.1-24, 2012.

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

Institute of Food Technologists (IFT) and FDA. **Analysis and Evaluation of Preventative Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce**, 2001. (acessado em 26/10/2014).

IZUMI, M.; et al. Carnosic acid and carnosol as neuroprotective electrophilic compounds. **Neuroscience Letters**, v.58, p.260-265, 2007.

JIANG, Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental toxicology and pharmacology**, v.32 p.63-68, 2011.

JOHNSEN, B.O. et al. A large outbreak of *Listeria monocytogenes* infection with short incubation period in a tertiary care hospital. **Journal of Infection**, v. 61, p. 465-470, 2010.

KANG, Z.W. et al. Genotypic and phenotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolated from chickens and humans in Korea. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 71, p. 1433-1438, 2009.

KIM, S.Y. et al. Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. **Journal of Food Science**, v. 76, p. M41-M46, 2011.

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

KOTTWITZ, L.B.M. et al. Avaliação epidemiológica de surtos de salmoneloses ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 32, p. 9-15, 2010.

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

LAMBERT, R.J.W. 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, p. 453-462, 2001.

LAN, R.; REEVES, P. R.; OCTAVIA, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. **Infection Genetics and Evolution**, v. 5, p. 996-1005, 2009.

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

LEHTO, M. et al. Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. **Food control**, v. 22, p. 469-475, 2011.

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, p. 53-60, 2010.

LUO, A. et al. Consumption of vegetables may reduce the risk of liver cancer: Results from a meta-analysis of case-control and cohort studies. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 39, p. 45-51, 2015.

MAISTRO, L.M. et al. Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP – Brazil, as assessed by traditional and alternative methods. **Food Control**, v. 28, p. 258-264, 2012

MAJOWICZ, S.E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella gastroenteritis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 882-889, 2010.

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

MCMAHON, M.A. et al. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 263-268, 2008.

MELDRUM, R.J. et al. Assessment of the microbiological safety of salad vegetables and sauces from kebab take-away restaurants in the United Kingdom. **Food Microbiology**, v. 26, p. 573-577, 2009.

MENG, J.; DOYLE, M. P. Introduction: Microbiological food safety. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 395-397, 2002.

MILLAN-SANGO, D.; MCELHATTON, A.; VALDRAMIDIS, V.P. Determination of the efficacy of ultrasound in combination with essential oil of oregano for the decontamination of *Escherichia coli* on inoculated lettuce leaves. **Food Research International**, v. 67, p. 145-154, 2015.

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

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

NEGRI, E. et al. Vegetable and fruit consumption and cancer risk. **International Journal of Cancer**, v. 48, p. 350-354, 1991.

NOORDHOUT, C.M. et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, p. 1073-1082, 2014.

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, p. 517-520, 2001.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to orégano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.191-195, 2004.

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, p. 197-209, 2002.

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

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

OLIVEIRA, M.A. et al. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v.22, p. 1400-1403, 2011.

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

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

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. et al. Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, p. 139-148, 2010.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 414-420, 2007.

ÖZBEK, T. et al. Investigation of the antimutagenic potentials of the methanol extract of *Origanum vulgare* L. subsp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Turkish Journal of Biology**, v.32, p.271-276, 2008.

PALEKAR, M.P. et al. Reduction of *Salmonella enterica* serotype Poona and background microbiota on fresh-cut cantaloupe by electron beam irradiation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 202, p. 66-72, 2015.

PARISH, M. et al. Methods to reduce or eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, 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, p. 386-390, 2009.

PENG, C.H. et al. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and antitumor effects. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** v.71, p.2223-2232, 2007.

PÉREZ-FONS, L.; GARZÓN, M.T.; MICOL, V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid OrderJ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.161-171, 2010.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. et al. Quantitative assessment of the *Salmonella* distribution on fresh-cut leafy vegetables due to cross-contamination occurred in an industrial process simulated at laboratory scale. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p. 86-91, 2014.

PINHEIRO, N.M.S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de fortaleza. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 153-156, 2005.

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

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

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, p. 721-731, 2004.

RUIZ-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, p. 1383-1390, 2007.

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

SAGOO, S.K. et al. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 403-409, 2003.

SANT'ANA, A. S. et al. Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1235-1237, 2011.

SANT'ANA, A. et al. Análise de Perigos no Processamento Mínimo de Vegetais. **Higiene Alimentar**. v. 16, p. 80-84, 2002.

SANT'ANA, A.S. et al. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 52-58, 2012a.

SANT'ANA, A.S. et al. Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.155, p. 1-9, 2012b.

SANTOS, A.P.R.; JUNQUEIRA, A.M.R. Gestão da qualidade na couve minimamente processada no distrito federal: o caso da agroindústria machadinho. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, p. 337-352, 2012.

SANTOS, M.I et al. Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. **Food Control**, v. 23, p. 275-281, 2012.

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

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

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

SCHELZ, Z.; MOLNAR, J.; HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Fitoterapia**. v. 77, p. 279-85, 2006.

SCHOENY, R. Disinfection by-products: a question of balance. **Environmental Health Perspective**, v. 118, p. A466-A467, 2010.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 123-138, 2008.

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

SHINOHARA, N.K.S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.13, p.1675-1683, 2008.

SILVA, J.P.L. et al. Oregano essential oil: influence of the chemical composition on the inhibitory activity against *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 136-141, 2010.

SILVA, N. et al. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 19, p. 503-510, 2013.

SILVA-ANGULO, A.B. et al. Growth kinetics of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* under exposure to carvacrol and the occurrence of sublethal damage. **Food Control**, v. 37, p. 336-342, 2014.

SIROLI, L. et al. Natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed lamb's lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 103, p. 35-44, 2015

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

SKANDAMIS, P.N. et al. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. **Food Microbiology**. v. 25, p. 294-303, 2008.

SKOČKOVÁ, A. et al. Characteristics of *Escherichia coli* from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 196-201, 2013.

SKOVGAARD, N. New trends in emerging pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, 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, p. 1093-1105, 2007.

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

SONG, M et al. Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food commodities in Shanghai. **International Journal of Food Microbiology**, v. 16, p. 1-8, 2015.

SOTELO-FÉLIX, J.I. et al. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (*Lamiaceae*) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p. 145-154, 2002.

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, p. 9-13, 2012.

SOUZA, E L. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, p. 409-413, 2007.

SOUZA, E.L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 308-311, 2010.

SUWA, M.; OIE, S.; FURUKAWA, H. Efficacy of disinfectants against naturally occurring and artificially cultivated bacteria. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, p. 360-363, 2013.

TORTORA, G.R.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Editora Artmed, 8^aed., 2005.

TRUMPOWER, B.L., GENNIS, R.B. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. **Annual Review in Biochemistry**, v. 63, p. 675-716, 1994.

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

VANETTI, M.C.D. **Controle microbiológico e higiene no processamento mínimo.** In: Encontro Nacional Sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças, Viçosa, MG, Anais. Viçosa, MG: UFV, p. 44-52, 2000.

VERHOEFF-BAKKENESA, L. et al. Consumption of raw vegetables and fruits: A risk factor for *Campylobacter* infections. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p. 406-412, 2011.

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

WINK, M. Medicinal Plants: A Source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 12771-12791, 2012.

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

XU, W. 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, p. 126-133, 2007.

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

ZHANG, W. et al. Vegetable-based dietary pattern and liver cancer risk: results from the Shanghai women's and men's health studies. **Cancer Science**, v. 104, p. 1353-1361, 2013.

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

APÊNDICE

ARTIGO ORIGINAL

The efficacy of the combined application of oregano and Rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in fresh vegetables

Running title: Synergism of oregano and rosemary essential oils

The efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in fresh vegetables

Running title: Synergism of oregano and rosemary essential oils

Abstract

This study assessed the effect of the combined application of essential oils (EOs) from *Origanum vulgare* L. – oregano (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. – rosemary (ROEO), alone or in combination at sub-inhibitory concentrations, against three pathogenic bacteria that are associated with fresh vegetables: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis. The inhibitory effects were evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the fractional inhibitory concentration index (FICI) and assessing the viable cell counts in the vegetable broth and artificially infected vegetables over time. The MIC value of OVEO was 0.6 µL/mL against the test strains either in single and mixed inoculum. The MIC value of ROEO was 5 µL/mL against *L. monocytogenes* and *E. coli* and 10 µL/mL against *S. Enteritidis* in single inocula, whereas it was 10 µL/mL against the mixed inoculum. The FICI of the combined EOs was 0.5 against the mixed bacterial inoculum, which suggested a synergic interaction. The incorporation of OVEO and ROEO alone (MIC) or combined at different sub-inhibitory concentrations in vegetable broth resulted in a decrease in the viable cell counts of all test strains over 24 h. Similarly, the EOs alone or in the tested combinations reduced the viable cell counts of all test strains in experimentally infected fresh vegetables. These findings reinforce the rationale for the use of OVEO and ROEO in combination at sub-inhibitory concentrations to guarantee the safety and extend the shelf life of fresh vegetables.

Keywords: ready-to-eat vegetables; essential oils; enhancing effect; mixed bacterial population

1. Introduction

Demographic changes related to population aging and new life style trends have brought an increasing demand for ready-to-eat (RTE) foods. This demand has changed the status of foodborne diseases worldwide and had an important economic and social impact (Oliveira et al., 2015). In recent years, minimally processed vegetables (MPV) gained significant acceptance by consumers, which could be attributed to an increased consumer desire for fresh vegetables with reduced preparation times (Millan-Sango, McElhatton & Valdramidis, 2015; Zhou et al., 2004; Odumeru et al., 2002). Prior to their sale, MPV are submitted to simple operations such as washing, peeling, slicing, shredding, sanitization, rinsing, drying and packaging to extend their shelf life and preserve their nutritive value while retaining the characteristics of fresh food (FDA, 2008).

Fresh vegetables are no longer considered a low-risk food in terms of safety. Fruits and vegetables can be contaminated with pathogens during all stages, from growth until consumption. The sources of contamination include the soil, manure (from humans and other animals), water, insects, post-harvest handling, washing, cutting and transportation (Bhagwat & Matthews, 2006; Beuchat, 2002). Sanitization is crucial to decrease the occurrence of microbial hazards in MPV because minimal processing is not an end-point preservation treatment (Sagoo et al., 2003). The increased association of MPV with foodborne outbreaks has intensified consumers' concerns regarding the safety of these products (Sant'ana et al., 2012). Among the classical pathogens that are considered threats to the safety of MPVs, *Salmonella* spp. and pathogenic *Escherichia coli* have been particularly concerning (CDC,

2013); however, emerging pathogens, such as *L. monocytogenes*, have more recently been linked to outbreaks associated with the consumption of fresh vegetables worldwide (Ethelberg et al., 2010; Johnsen et al., 2010; Friesema et al., 2008; Friesema et al., 2007; Sagoo et al., 2003). The decontamination methods used for vegetables aim to reduce the microbial populations of the processing system without necessarily eliminating them. A variety of disinfectants, including chlorine, hydrogen peroxide, organic acids and ozone, have been used to reduce the initial bacterial populations on vegetables (Suwa, Oie & Furukawa, 2013; Gil et al., 2009; Beuchat, 1998). Chlorine and chlorine-based compounds, such as hypochlorite, are probably the most widely used sanitizer for the treatment of fresh vegetables. However, some studies have shown that the chlorine concentrations (50–200 ppm) that are traditionally used for decontamination are not effective in successfully reducing pathogen loads on vegetables (Lee & Baek, 2008; Delaquis et al., 2002; Behrsing et al., 2000). Considering that fresh vegetables have the potential to harbor pathogenic bacteria, the development of new and effective sanitizing procedures has received much attention (Oliveira et al.; 2015; Sousa et al., 2013; Azerêdo et al., 2011).

There has been increasing pressure to replace chemically synthesized antimicrobials with natural alternatives in the food industry (Xu et al., 2007). This pressure has led to a particularly increased interest in the use of essential oils (EOs) as natural sanitizers for fresh vegetables. EOs from *Origanum vulgare* L. – oregano (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. – rosemary (ROEO) have been found to be effective in inhibiting a variety of bacteria, including those that contaminate RTE vegetables (Azerêdo et al., 2012; Sousa, et al., 2012). Many EOs and their individual constituents are considered to be ‘Generally Recognized as Safe’ (GRAS) at the doses typically used in foods (Burt, 2004) and have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for use in edible products (FDA, 2002).

Therefore, this study was performed to assess the inhibitory effects of OVEO and ROEO alone or in combination against a mixed culture of bacteria associated with the contamination of fresh vegetables, namely *E. coli*, *L. monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis. The effects were measured by determining the minimum inhibitory concentration and fractional inhibitory concentration index and assessing cell viability in vegetable broth and in fresh vegetables over time.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The OVEO (batch ORETU679; density at 20°C: 0.90; refractive index at 20°C: 1.49) and ROEO (batch ROSTUN04; density at 20°C: 0.94; refractive index at 20°C: 1.51) were purchased from Laszlo Aromaterapia Indústria e Comércio Ltda. (Minas Gerais, Brasil). Their quality parameters are described in an accompanying technical report. This supplier extracts essential oils on an industrial scale by steam distillation. The EOs were assayed at concentrations ranging from 80 to 0.03 µL/mL. EO emulsions were prepared in brain-heart infusion (BHI) broth (Himedia, India) using bacteriological agar (1.5 g/L) as a stabilizing agent (de Souza et al., 2010).

Listeria monocytogenes ATCC 7644, *Escherichia coli* UFEPEDA 224 and *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis UFEPEDA 414 used as test microorganisms were gently provided by the Microorganism Collection, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil). An inoculum of each test bacterium was obtained by preparing suspensions in sterile saline solution (NaCl 0.85% p/v) from overnight cultures grown in BHI agar at 37 °C. Each strain was grown in BHI broth at 37°C for 18 h (late exponential growth phase), harvested by centrifugation (4500 g, 15 min, 4°C), washed twice in sterile PBS and re-suspended in sterile PBS to obtain standard cell suspensions, for which the OD reading at

625 nm (OD_{625}) was 0.1, to provide viable cell counts of approximately 8 log colony forming unit per milliliters - CFU/mL (McMahon et al., 2008). A mixed inoculum was obtained by mixing the different bacterial suspensions at a ratio of 1:1:1. This level of inoculum was used because vegetable decontamination studies require high numbers of cells in the inoculum to enable the measurement of several log reductions in colony forming unities per gram - CFU/g (Beuchat et al., 2001).

Time-kill assays were performed using a vegetable broth composed of iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.) and chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) as the substrates for bacterial cultivation. The leafy vegetables were purchased from a local wholesale market in João Pessoa (Brazil) on the day of harvest and transported for less than 30 min under refrigerated conditions. A mixture (1:1) of the samples containing 60 g of each leafy vegetable was mashed with 400 mL of distilled water using a domestic blender. The mixture was then vacuum filtered using Whatman no. 1 filter paper. The obtained material was sterilized by filtration using a Millipore 0.22 μm filter unit (Azerêdo et al., 2011). The filtered broth was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 50-mL aliquots, and when required, an aliquot was thawed under refrigeration ($7 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) and used for the assays.

2.2 Identification of the EO constituents

The constituents of OVEO and ROEO were identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry – GC-MS (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu, Kyoto, Japan). GC-MS analysis was performed under the following conditions: a RTX-5MS capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); temperature programing: 60–240 $^{\circ}\text{C}$ (3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$); injector temperature: 250 $^{\circ}\text{C}$; detector temperature: 220 $^{\circ}\text{C}$; carrier gas: helium adjusted to 0.99 mL/min speed; ionizing energy: 70 eV; mass range (m/z): 40-500. To identify the individual EO constituents, the spectra bank of the GC/MS, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database (Version 1.7) was

used. The quantification of the constituents was obtained by normalizing the areas of each detected constituent and expressed the result in terms of the percentage area (%).

2.3 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC values of OVEO and ROEO against a single and mixed inoculum of the test strains were determined using macrodilution in broth (Nostro et al., 2001). Four milliliters of double strength BHI broth (Himedia, India) was inoculated with 1 mL of bacterial inoculum (single or mixed), mixed with 5 mL of the solution of OVEO or ROEO and vigorously mixed for 30 s using a vortex. The system was statically incubated for 24 h at 35 °C. The MIC was defined as the lowest concentration of each EO required to prevent visible bacterial growth (Nostro et al., 2001). Control flasks without the EOs were tested in a similar process.

2.4 Determination of the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI)

The checkerboard method was performed using macrodilution in broth to obtain the FICI for the combined application of OVEO and ROEO using a mixed inoculum of the test strains (Oliveira et al., 2015). The FICI was calculated as follows: (MIC of OVEO in combination with ROEO/MIC of OVEO alone) + (MIC of ROEO in combination with OVEO/MIC of ROEO alone). The OVEO and ROEO were assayed at the MIC x 2, MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC and 1/16 MIC with different combinations of each different concentration of each EO. The results were interpreted as synergy ($FIC \leq 0.5$), addition ($0.5 \leq FIC \leq 1$), indifference ($1 \leq FIC \leq 4$) and antagonism ($FIC > 4$) (Gutierrez, Barry-Ryan & Bourke, 2008; Schelz, Molnar & Hohmann, 2006).

2.5 Effects of the tested EOs on the survival of bacteria in vegetable broth

The effect of EOs alone (MIC) and in combination (1/2 MIC OVEO + 1/2 MIC ROEO; 1/2 MIC OVEO + 1/4 MIC ROEO; 1/4 MIC OVEO+ 1/2 MIC ROEO; 1/4 MIC OVEO + 1/4 MIC ROEO) on the survival of bacterial strains in mixed inoculum in vegetable broth was evaluated using the viable cell count procedure. For this test, 4 mL of vegetable broth was inoculated with 1 mL of the bacterial inoculum. Then, 5 mL of the single or combined EO solutions was added to the system and gently shaken for 30 s to produce a final viable cell count of each bacteria of approx. $7 \log$ CFU/mL. The system was incubated at 7 °C. At different time intervals (2, 4, 8 12 and 24 h), 1 mL of the suspension was serially diluted (10^{-1} – 10^{-5}) in a sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) and inoculated onto media selective for each bacteria. The selective media were *Listeria* selective agar + Listeria Selective Supplement II (Himedia, India) for *L. monocytogenes*, Eosyne-Metilen-Blue (EMB) agar (Himedia, India) for *E. coli* and *Salmonella – Shigella* agar (Himedia, India) for *S. Enteritidis* for 24 – 48 h at 37 °C (Azêredo et al., 2011; Sousa et al., 2012). Control flasks without the EOs were similarly tested. The plates inoculated with aliquots collected from broth containing the EOs were always incubated for 24 h longer at adequate temperature than were those collected from the control systems. The results were expressed as the log of the survival fraction in relation to the initial bacterial population (CFU/mL at time zero).

2.6 Effects of the EOs on bacterial survival in fresh vegetables

The effect of the EOs alone (MIC) or in combination (1/2 MIC OVEO + 1/2 MIC ROEO; 1/2 MIC OVEO + 1/4 MIC ROEO) on the survival of the bacterial strains in the mixed inoculum on fresh vegetables was evaluated using the viable cells count procedure. For this procedure, portions (90 g) of a pool of iceberg lettuce and chard (at a rate of 1:1) that were previously washed with sterile distilled water were shredded aseptically and inoculated with the bacteria according to the following procedure: the vegetable sample were submerged

in 900 mL of mixed inoculum, gently 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 OVEO or ROEO solutions either alone or in combination for 5 or 10 min at 25 °C. Then, a 25-g sample of the vegetables was aseptically obtained, transferred into a sterile stomacher bag containing 225 mL of sterile saline solution (0.85 g/100 mL) and homogenized for 60 s. Subsequently, a decimal dilution was made in the same diluent, and bacterial counting was performed by spread-plating 0.1 mL of the appropriate sample dilution on sterile selective agar (*Listeria* selective agar + *Listeria* Selective Supplement II (Himedia, India) for *L. monocytogenes*, EMB agar for *E. coli* (Himedia, India) and *Salmonella – Shigella* agar (Himedia, India) for *S. Enteritidis* (Azêredo et al., 2011; Sousa et al., 2012) for 24 – 48 h at 37°C (Xu et al., 2007)). Control flasks containing sterile distilled water were tested in the same way. Plates inoculated with aliquots collected from systems containing the tested EOs were always incubated for 24 h longer at adequate temperatures than were those collected from control systems. The results were expressed as the log of survival fraction (log CFU/mL) in relation to the counts detected in control systems.

2.7 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 a post hoc Tukey test in the Sigma Stat 3.5 software (Jandel Scientific Software, San Jose, California).

3. Results

3.1 Identification of the EO constituents

As shown in Table 1, the GC-MS analysis identified six compounds at concentrations greater than 1 g/100 g of the total mass in both OVEO and ROEO (Table 1). Thymol (69.3 %) was the most prevalent compound in OVEO, followed by *p*-cymene (13.1 %) and γ -terpinene (6.01 %). The compounds myrcene (1.1 %), linalool (2.71 %) and α -pinene (1.6 %) were found in minor amounts. For ROEO, the compounds detected at higher amounts were eucalyptol (35.75 %), camphor (28.7 %) and limonene (24.88 %). Other compounds (viz. α -pinene, *p*-cymene and γ -terpinene) were found in the range of 1.29 – 1.97 % in ROEO.

3.2 MIC values and the checkerboard assay

The MIC value obtained for OVEO was 0.6 μ L/mL against *L. monocytogenes* ATCC 7644 (*L. monocytogenes*), *E. coli* UFEPEDA 224 (*E. coli*) and *S. Enteritidis* UFEPEDA 414 (*S. Enteritidis*) either in the single and mixed inoculum (Table 2). The MIC value of ROEO was 5 μ L/mL against *L. monocytogenes* and *E. coli* and 10 μ L/mL against *S. Enteritidis* in single inoculum. The MIC value of ROEO was 10 μ L/mL against the mixed inoculum. The FICI for the combined application of OVEO and ROEO against the mixed inoculum was 0.5, which suggested a synergistic interaction. The OVEO and ROEO inhibited the bacterial growth when tested up to a combination of 1/4 MIC + 1/4 MIC. The test strains had the ability to grow at the tested subinhibitory concentrations of both OVEO and ROEO when applied alone (data not shown).

3.3 Effects on cell viability of bacteria in vegetable broth

The effects of OVEO and ROEO alone at the MIC or in different combinations of 1/4 MIC and 1/2 MIC on the survival of a mixed population of *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Enteritidis* cultivated in vegetable broth were assessed. A sharp drop ($p < 0.05$) in the viable cell counts of all tested strains was observed over the assessed time intervals when either

OVEO or ROEO was incorporated into the vegetable broth, with the exception of *S. Enteritidis* exposed to ROEO at its MIC (Fig. 1A – 1C). The decrease in the initial viable cell counts of *L. monocytogenes* and *E. coli* exposed to OVEO at MIC ≥ 3 log CFU/mL cycles ($> 99.99\%$ reduction) occurred as early as 2 and 4 h of exposure, respectively. When ROEO was assayed at its MIC, a decrease of ≥ 3 log cycles in the viable counts of *L. monocytogenes* and *E. coli* was observed after 4 and 8 h, respectively (Fig. 1A – 1B). For *S. Enteritidis*, a ≥ 3 - log cycles decrease in the viable cells count was observed after 8 h in the OVEO-treated cells. Cells of *S. Enteritidis* treated with ROEO at MIC were found to have a smaller decrease (up to 1.7 CFU/mL log cycles; $> 90\%$ reduction) in the viable counts early in the assessed time intervals (after 1 – 4 h of exposure). However, a slight and linear recovery was noted in the cell counts observed later during the assessed time intervals (Fig. 1C).

The incorporation of OVEO and ROEO in vegetable broth in combinations of 1/2 MIC OVEO + 1/2 MIC ROEO, 1/2 MIC OVEO + 1/4 MIC ROEO and 1/4 MIC OVEO + 1/2 MIC ROEO resulted in a ≥ 3 log CFU/mL cycles-decrease in the initial viable count of *L. monocytogenes* and *E. coli*, although the time required to establish this decrease varied according to the target strain and the amount of combined EOs. The combination of 1/2 MIC OVEO + 1/2 MIC ROEO caused similar reductions in the *L. monocytogenes* and *E. coli* viable counts after 4 and 8 h of exposure, respectively. For the combination of 1/4 MIC OVEO + 1/2 MIC ROEO, this reduction was noted after 24 h in both strains. The decrease in the viable counts of *E. coli* and *L. monocytogenes* treated with 1/4 MIC OVEO + 1/4 MIC ROEO were near to 2.5 log CFU/mL cycles ($> 99.9\%$ reduction) after 24 h of exposure. Only the combination of 1/2 MIC OVEO + 1/2 MIC ROEO could cause a ≥ 3 log CFU/mL cycles-decrease in the *S. Enteritidis* count. The other tested combinations caused decreases in the range of 1.5 to 2.7 log cycles ($> 90\%$ to $> 99.9\%$ reduction) at the end of the assessed

exposure time. Over the evaluated time interval, the systems containing OVEO and/or ROEO showed lower ($p < 0.05$) viable cells counts than the control systems.

3.4 Effects on the cell viability of bacteria on artificially infected fresh vegetables

Regarding the results obtained in the vegetable broth, the combinations of 1/4 MIC OVEO + 1/2 MIC ROEO and 1/4 MIC OVEO + 1/4 MIC ROEO were not assayed in fresh vegetables because they did not cause a ≥ 3 -log cycles-decrease in the viable cell counts over the assessed time period or because the time periods required to establish this effect were longer than those observed for the other combinations tested.

The application of OVEO and ROEO to fresh vegetables, either alone or in combination at different subinhibitory concentrations, caused a reduction ($p < 0.05$) in the initial viable cell counts of all assayed strains in mixed inoculum (Fig. 2A- 2F). After a 5-min treatment, only OVEO at its MIC caused a ≥ 3 -log cycles-decrease in the initial counts of all strains. The reductions caused by the other treatments were in a range of 1.5 to 2.8 log cycles ($> 90\%$ to $> 99.9\%$). After 10 min of treatment, either OVEO or ROEO at their respective MICs or the combination 1/2 MIC OVEO + 1/2 MIC ROEO caused a similar decrease in the viable cell counts of *L. monocytogenes* and *E. coli* (Fig. 2C and Fig. 2E). The decrease in the viable counts of *S. Enteritidis* exposed to ROEO alone or to the tested combinations was in the range of 1.5 to 2.5 log cycles (Fig. 2E and 2F). Overall, the exposure of the EOs for 10 min caused a greater decrease ($p < 0.05$) in the viable cell counts in comparison to 5 min. Viable cell counts in the control systems (5 min and 10 min) were always close to 7 log CFU/mL, and these counts were higher ($p < 0.05$) than those found when the strains were treated with OVEO and/or ROEO.

In both assays using vegetable broth and fresh vegetables, *L. monocytogenes* was found to be most sensitive to the EOs alone or in combination, whereas *S. Enteritidis* was found to

be the least sensitive. Furthermore, the inhibitory effects of the EOs occurred in a time-dependent manner.

4. Discussion

This study showed the inhibitory effects of OVEO and ROEO alone at MIC or in combination at different subinhibitory concentrations on the survival of *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Enteritidis* in single or mixed inocula. These results are interesting because studies testing the effects of EOs (or their individual constituents) on pathogenic or spoiling bacteria in mixed culture are still scarce. The low available number of studies with candidate compounds for use as antimicrobials in foods using mixed populations of target bacteria is somewhat conflicting because the use of multispecies inocula (or even multi-strain inocula) has been recommended in studies that have used specifically defined conditions that limit the growth or survival of the bacterial species (Romero et al., 2010). Some researchers have stated that the response of mixed cultures of bacteria to challenge with EOs or their individual constituents could provide more realistic information regarding the antimicrobial efficacy of these compounds on food substrates (Kurekci et al., 2015; Oliveira et al., 2015).

OVEO showed stronger inhibitory effects against all test bacteria in both single and mixed inocula than did ROEO, based on their respective MIC values (the MIC of OVEO was 16-fold lower than that of ROEO). *S. Enteritidis* was most tolerant to ROEO, and the MIC value against this bacterium was one-fold greater than the MIC values for the other test bacteria. Still, this greater tolerance of *S. Enteritidis* may have had some influence on the higher MIC value (a one-fold increase) observed in ROEO against the bacterial strains in the mixed inoculum. The low observed MIC value of OVEO against the test strains ($< 1 \mu\text{L}/\text{mL}$, VanVuuren, 2008) reinforced the noteworthy antibacterial effects of this EO, in contrast to the high MIC value showed by ROEO. The difference in the inhibitory effects of OVEO and

ROEO (considering their often-detected MIC values) has been related to their particular profile of major constituents (Carović-Stanko et al., 2010). An approximate general ranking of the individual constituents of the EOs possessing the highest antimicrobial effects is as follows: phenols > aldehydes > ketones > alcohols > ethers > hydrocarbons (Ballester-Costa et al., 2013). This finding reinforced the consistency of the low MIC values found for OVEO, as thymol – THY (phenolic) was found to be its major constituent, whereas eucalyptol - EUC (1,8 – cineole) (terpene hydrocarbon) was found to be the major constituent of ROEO.

Although ROEO has often been found to have high MIC values against food-related bacteria, this EO is still considered a potential substance for antimicrobial use in foods, particularly vegetable products, given its beneficial impact on sensory aspects, primarily when applied in combination with EOs that could adversely affect the sensory acceptance of foods (de Sousa et al., 2013; Azerêdo et al., 2011). Though OVEO (which often has high amounts of THY or carvacrol – CAR) has been reported to produce a changeable “warmly pungent flavor” in food during storage, ROEO (which often contains high amounts of EUC) produces a changeable “distinctive but pleasant mint-like flavor” in the amounts that are usually proposed for use in foods. The combined application of OVEO and ROEO in vegetables could exploit a possible synergistic interaction and produce desirable antibacterial effects without causing undesirable changes to the food flavor and/or aroma.

The FICI for the combined application of OVEO and ROEO was 0.5 against the mixed inoculum of *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Enteritidis*, thus demonstrating a synergic interaction of these EOs. A synergistic interaction occurs when the combination of antimicrobials at sub-inhibitory concentrations ($\leq 1/4$ MIC) produces a greater inhibitory effect against the target organisms when compared to the inhibition caused by these antimicrobials when tested individually or at higher concentrations (Oliveira et al., 2010). Regarding the general interpretation of the FICI assays, synergy could occur at a $FICI \leq 1$

(combination of $\leq 1/2$ MIC); however, because the dilution method can present a ± 1 error, the dilution convention suggests that synergy is ≤ 0.5 . However, a minor synergy (i.e., up to an FICI 1) may still be of practical importance (Gould et al., 1991). This was considered when choosing the sub-inhibitory concentrations of OVEO and ROEO (1/2 MIC and 1/4 MIC of each EO in different combinations) to use in assays of bacterial survival over time.

A previous study noted the same FICI (0.5) for the combined application of OVEO and ROEO against *Aeromonas hydrophila*, *L. monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* in single populations (Azerêdo et al., 2011), whereas the combination of CAR and CIN showed a FICI of 0.25 against the same bacteria in a mixed population (Oliveira et al., 2015). The authors stated that the enhanced inhibitory effects observed for OVEO and ROEO in combination could be partially explained by differences in the chemical structures of their major constituents (CAR/THY and EUC). These differences were predicted to result in distinct interactions with the target cell structures, which are primarily related to the antimicrobial activity of the tested EOs (Sousa et al., 2015; Azerêdo et al., 2012).

Ultrastructural studies of bacterial cells treated with CAR and EUC have suggested that the oxygenated groups present in EUC disturb the bacterial membrane structures, even when EUC is present in the growth media at sub-inhibitory concentrations; therefore, EUC could allow CAR to be more easily transported into the bacterial cells, where it can interact with different intracellular targets (Sousa et al., 2015; de Sousa et al.; 2013). Overall, the presence of EUC in the growth media was found to decrease the required amount of CAR needed to promote antimicrobial effects. CAR is a THY-isomer presenting structural differences due to the position of its hydroxyl group (OH group); however, CAR and THY have similar mechanisms of action against bacterial cells (Lambert et al., 2001).

The FICI assay was used in combination with the time-kill studies given the availability of information about the kinetic of microbial inactivation, resulting in a dynamic picture of

the antimicrobial interactions (Mackay, Milne, & Gould, 2000). The time-kill curves of bacteria exposed to OVEO and ROEO alone or in combination at the selected subinhibitory concentrations in vegetable broth revealed a significant decrease ($> 99\%$ to $\geq 99.999\%$) in the viable counts over time, with a distinct behavior of *S. Enteritidis* challenged with ROEO at MIC. However, for most of the interactions, the highest reductions (> 3 log cycles; 99.99%) were found in OVEO and ROEO at MIC and at the combinations 1/2 MIC OVEO + 1/2 MIC ROEO and 1/2 MIC OVEO + 1/4 MIC ROEO.

The OVEO and ROEO, alone or in combination at the selected subinhibitory concentrations, effectively decreased the counts of *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Enteritidis* in artificially infected fresh vegetables after a 5- or 10-min treatment, although the effects were more pronounced as the exposure time increased. The antimicrobial effects of the EOs either alone or in combination was lower in the fresh vegetables than in the vegetable broth. This lower level of bacterial inactivation observed on the vegetables following treatment with the EOs could be because the bacteria attach or infiltrate into the protective structures of the vegetables (lenticels, cuticle cells, broken trichomes and bruises), thereby impairing the contact with the individual constituents of the EOs (Azêredo et al., 2011; Burnett & Beuchat, 2001). Overall, the type of chemical agent, contact time, temperature, microbial load and chemical and physical properties of the vegetable surface could all have an influence on the bacterial response to sanitizers (Lee and Baek, 2008; Delaquis et al., 2002; Behrsing et al., 2000).

Given the obtained data, the following ranking of bacterial tolerance to the EOs tested was *S. Enteritidis* $>$ *E. coli* $>$ *L. monocytogenes*. This is not surprising because Gram-negative bacteria are generally less sensitive to EOs than Gram-positive bacteria (Mazzarrino et al., 2015; Hyldgaard, Mygind & Meyer, 2012). In Gram-negative bacteria (such as *S. Enteritidis* and *E. coli*), this greater tolerance is due to the presence of the outer membrane, which limits

the diffusion of hydrophobic compounds (such as the individual EO constituents) through lipopolysaccharide coverage (Vaara, 1992). Thus, the EO concentrations must be sufficient to allow diffusion through the external membrane and the lipid bilayer to reach the bacterial membrane for antibacterial effects to be established (de Oliveira, de Araújo Soares & Piccoli et al., 2013).

It is noteworthy that to successfully demonstrate sanitizing efficacy of any product intended for the treatment of food-contact surfaces, the product must demonstrate a 99.999% reduction (5 log cycles) in the pathogen (of concern) counts in suspension following a 30-s exposure to a pre-selected concentration (AOAC, 2013). However, to the best of our knowledge, no criteria regarding the inactivation level are currently available to substantiate the efficacy of sanitizers in vegetables and fruits. The treatment of raw vegetables in water containing chlorine (traditionally used as a sanitizer of fruits and vegetables) at concentrations of 50 – 250 ppm and with exposure times of 1 - 10 min can effectively decrease the population of pathogenic bacteria (including *L. monocytogenes*, *E. coli* and *Salmonella* spp.), aerobic microorganisms, psychrotrophic microorganisms, yeast and molds by 90 – 99.9% (1 - 3 log cycles) (FAO/WHO, 2008). Based on the available studies, the combinations of OVEO and ROEO at the selected subinhibitory concentrations were predicted to sanitize fresh vegetables infected with *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Enteritidis* because they could reduce the initial population by 99 – 99.99% (2 - 3 log cycles) after 10 min of exposure. These results are also promising because products capable of establishing a ≥ 99.99 % killing effect (≥ 3 log cycles reductions) are considered to possess bactericidal effects (LaPlante, 2007).

5. Conclusions

The results obtained revealed a synergistic interaction between OVEO and ROEO, as the combination of these EOs at subinhibitory concentrations were effective in inhibiting the survival of the pathogenic bacteria associated with fresh vegetables in mixed inoculum. When tested alone or in combination at sub-inhibitory concentrations, these EOs decreased the survivor cells of *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Enteritidis* in vegetable broth and in fresh vegetables. Overall, these findings support the use of OVEO and ROEO at sub-inhibitory concentrations as alternatives to guarantee the safety and extend the shelf life of fresh and RTE vegetables.

Acknowledgements

The authors would like to thank the National Council of Technological and Scientific Development – CNPq (Brazil) for financial support and for a scholarship awarded to the first author (I. M. Barbosa).

References

- AOAC International (2013). Method 960.09 Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants. *Official Methods of Analysis*. 18th Ed., Gaithersburg, MD.
- Azerêdo, G.A., Figueiredo, R.C.B.Q., Souza, E. L. & Stamford, T.L.M. (2012). Changes in *Listeria monocytogenes* induced by *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils alone and combined at subinhibitory amounts. *Journal of Food Safety*, 32, 226-235.
- Azerêdo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Gomes Neto, N.J., Oliveira, M.E.G. & de 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.

- Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A. & Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Industrial Crops and Products*, 50, 304-311.
- Behrsing, J.; Winkler, S.; Franz, P. & Premier, R. (2000). Efficacy of chlorine for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 19, 187-192.
- Beuchat, L.R. (1998). Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: A review. *Food Safety Unit, World Health Organization*. WHO/FSF/FOS/98.2.
- Beuchat, L.R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Journal of Microbial Infections*, 4, 413-423.
- Beuchat, L.R., Frändberg, E., Deak, T., Alzamora, S.M., Chen, J.; Guerrero, S. et al. (2001). Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeasts: an interlaboratory study. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 89-96.
- Bhagwat, A.A. & Matthews, K. (2006). Microbiological safety of fresh-cut produce: Where are we now? In: Matthews, K. (Ed.), *Microbiology of fresh produce* (pp. 121-165). Washington, DC: ASM Press.
- Burnett, S.L. & Beuchat, L.R. (2001). Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and some reasons related to difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27, 104-110.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Carović-Stanko, K., Orlić, S., Politeo, O., Strikić, F., Kolak, I., Milos, M. et al. (2010). Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa*. *Food Chemistry*, 119, 196-201.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to ready-to-eat salads. Available at: <http://www.cdc.gov/ecoli/2013/O157H7-11-13/index.html> (Accessed: February 3rd, 2015).

de Oliveira, T.L.C., de Araújo Soares, R. & Piccoli, R.H. (2013). A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 93, 645-651.

de Souza, E.L., Oliveira, C.E.V., Conceicao, M.L., Barros, J.C. (2010). Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 308-311.

de Souza, L.L., de Andrade, S.C.A., Athayde, A.J.A.A., de Oliveira, C.E.O., de Sales, C.V., Madruga, M.S. et al. (2013). Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic Aspergilli and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *International Journal of Food Microbiology*, 165, 312-318.

Delaquis, S., Stewart, S., Cazaux, S. & Toivonen, P. (2002). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat iceberg lettuce washed in warm chlorinated water. *Journal of Food Protection*, 65, 459-464.

Ethelberg, S.; Lisby, M.; Böttiger, B.; Schultz, A.C.; Villif, A., Jensen, T. et al. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. (2010). Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19484> (Accessed: January 10th, 2015).

FDA – Food and Drug Administration. (2002). Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=173> (Accessed: December 10th, 2014).

FDA – Food and Drug Administration. (2008). Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables. Available at: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/ucm064458.htm> (Accessed: December 7th, 2014).

Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO). (2008) Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables – Meeting Report. *Microbiological Risk Assessment Series*.

Friesema, I.; Schimmer, B.; Stenvers, O.; Heuvelink, A.; de Boer, E.; van der Zwaluw, K. et al. (2007). STEC O157 outbreak in the Netherlands, September – October 2007. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3297> (Accessed: January 10th, 2015).

Friesema, I.; Sigmundsdottir, G., van der Zwaluw, K.; Heuvelink, A.; Schimmer, B.; de Jager, C. et al. (2008). An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September – October, 2007. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19065> (Accessed: January 10th, 2015).

Gil, M.I., Selma, M.V., López-Galvez, F. & Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 37-45.

Gould, I.M., Wilson, D., Milne, K., Peterson, A., Golder, D. & Russel, D. (1991). Interaction of imipenem with erythromycin and tetracycline assessed by microdilution checkboard techniques. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 35, 2407-2409.

- 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.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. & Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-24.
- Johnsen, B.O., Lingaas, E., Torfoss, D., Strøm, E.H. & Nordøy, I. (2010). A large outbreak of *Listeria monocytogenes* infection with short incubation period in a tertiary care hospital. *Journal of Infection*, 61, 465-470.
- 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*. 166, 450-457.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., & Nychas, G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.
- LaPlante, K.L. (2007). In vitro activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57, 413-418.
- Lee, S.Y. & Baek, S.Y. (2008). Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. *Food Microbiology*, 4, 582-587.
- 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.

- Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C. et al. (2015). *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794-803.
- McMahon, M.A., Tunney, M.M., Moore, J.E., Blair, I.S., Gilpin, D.F. & McDowell, D.A. (2008). Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *Letters in Applied Microbiology*, 47, 263-268.
- Millan-Sango, D., McElhatton, A. & Valdramidis, V.P. (2015). Determination of the efficacy of ultrasound in combination with essential oil of oregano for the decontamination of *Escherichia coli* on inoculated lettuce leaves. *Food Research International*, 67, 145-154.
- Nostro, A., Bisignano, G.; Cannatelli, M.A., Crisafi, G., Germano, M.P. & Alonzo, V. (2001). Effects of *Helichysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17, 517-520.
- Odumeru, J.A., Bouter, J., Knight, K., Lu, X. & Mckellar, R. (2002). Assessing of a thermal-chemical process to extend the shelf life of ready-to-use lettuce. *Journal of Food Quality*, 26, 197-209.
- Oliveira, C.E.V., Stamford, T.L.M., Gomes Neto, N.J. & de Souza E.L. (2010). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat model using synergies. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 312-316.
- Oliveira, K.A.R., Medeiros, J.A.C., Figueiredo, R.C.B.Q., Magnani, M., Siqueira Junior, J.P., Souza, E.L. (2015). Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. *Food Control*, 47, 334-339.
- Romero, S.M., Pinto, V.F., 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.

Sagoo, S.K., Little, C.L., Ward, L., Gillespie, I.A. & Mitchell, R.T. (2003). Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. *Journal of Food Protection*, 66, 403-409.

Sant'Ana, A.S., Barbosa, M.S., Destro, M.T., Landgraf, M. & Franco, B.D.G.M (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 52-58.

Schelz, Z, Molnar J. & Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77, 279-285.

Sousa, J.P., Oliveira, K.A.R., Figueiredo, R.C.B.Q. & Souza, E.L. (2015). Influence of carvacrol and 1,8-cineole on cell viability, membrane integrity and morphology of *Aeromonas hydrophila* cultivated in a vegetable-based broth. *Journal of Food Protection*, 78, 424-429.

Sousa, J.P., Torres, R.A., Azerêdo, G.A., Souza, E.L., Figueiredo, R.C.B.Q., Vasconcelos, M.A.S. et al (2012). 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.

Souza, E.L., Azerêdo, G.A., Sousa, J.P., Figueiredo, R.C.B.Q. & Stamford, T.L.M. (2013). Cytotoxic effects of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils alone and combined at sublethal amounts on *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable broth. *Journal of Food Safety*, 33, 163-171.

Suwa, M., Oie, S., Furukawa, H. (2013). Efficacy of disinfectants against naturally occurring and artificially cultivated bacteria. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36, 360-363.

Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology Reviews*, 56, 395-411.

- Van Vuuren, S.F. (2008). Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 462-472.
- Xu, W., Qu, W., Huang, K., Guo, F., Yang, J., Zhao, H. & Luo, Y. (2007). Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 126-133.
- Zhou, T., Harrison, A.D., McKellar, R., Young, J.C., Odumeru, J., Piyasena, P., Lu, X. et al. (2004). Determination of acceptability and shelf life of ready-to-use lettuce by digital image analysis. *Food Research International*, 37, 875-881.

Fig. 1 Reduction cycles (Log_{10} CFU/mL) in the initial viable cell counts of *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A), *E. coli* UFEPEDA 224 (B) and *S. Enteritidis* UFEPEDA 414 (C) in vegetable broth (7 °C) as a function of different concentrations of the essential oils from *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO) alone or in combination. (x) Control; (□) MIC OVEO: 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$; (○): MIC ROEO: 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$; (■): 1/2 MIC OVEO: 0.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + 1/2 MIC ROEO 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$; (●): 1/2 MIC OVEO: 0.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + 1/4 MIC ROEO: 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$; (▲): 1/4 MIC OVEO: 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + 1/2 MIC ROEO: 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$; (◆): 1/4 MIC OVEO: 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + 1/4 MIC ROEO: 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Fig. 2 Reduction cycles (Log_{10} CFU/mL) in the initial viable cell counts of *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A - B), *E. coli* UFEPEDA 224 (C - D) and *S. Enteritidis* UFEPEDA 414 (E - F) in fresh-cut vegetables (28 °C) as a function of different concentrations of the essential oils from *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO) alone or in combination, after a 5-min (A, C, E) and 10-min (B, D, F) treatment (white bars: reduction caused by OVEO at its MIC: 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$; grey bars: reduction caused by ROEO at its MIC: 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$; diagonal dashed bars: reduction caused by 1/2 MIC OVEO: 0.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + 1/2 MIC ROEO: 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$; vertical dashed bars: reduction caused by at 1/2 MIC OVEO: 0.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + 1/4 ROEO: 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$); black bars: control.

Fig. 1

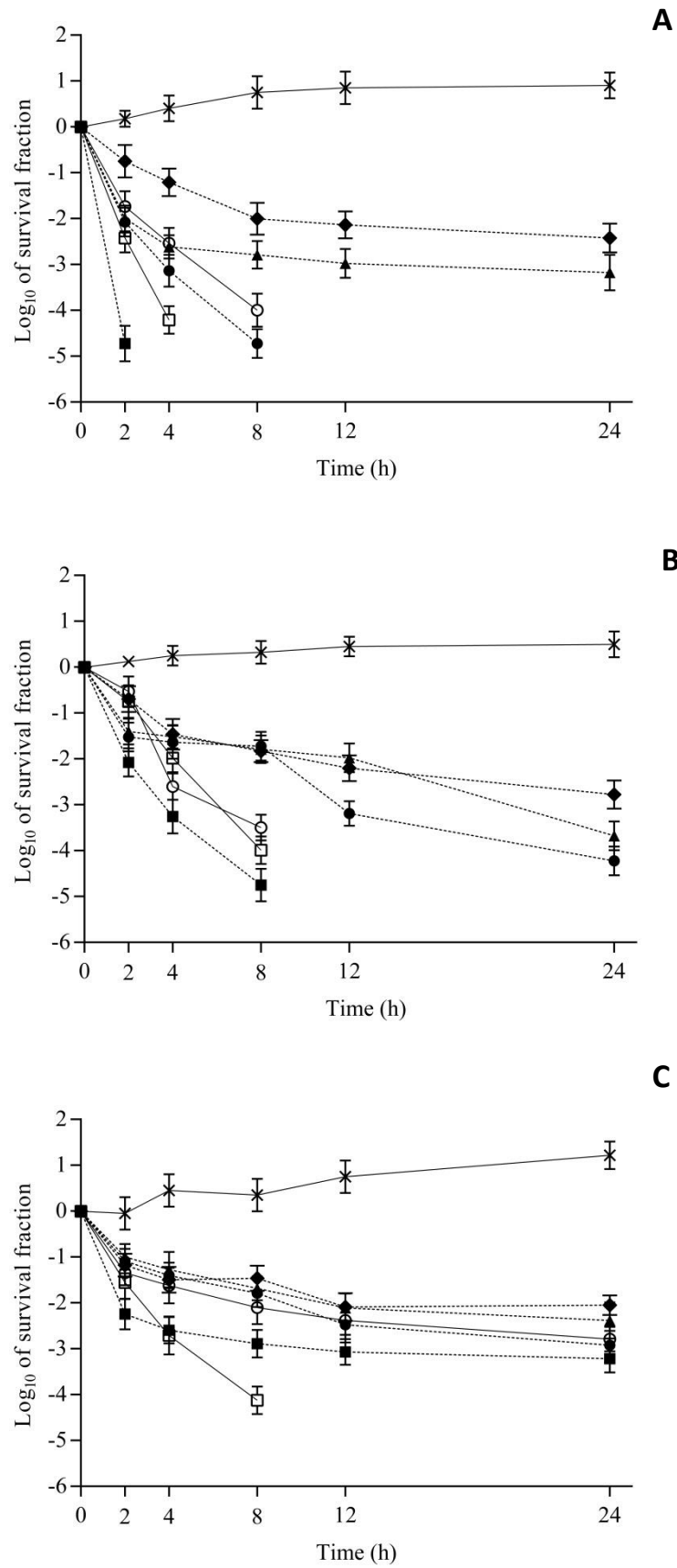


Fig. 2

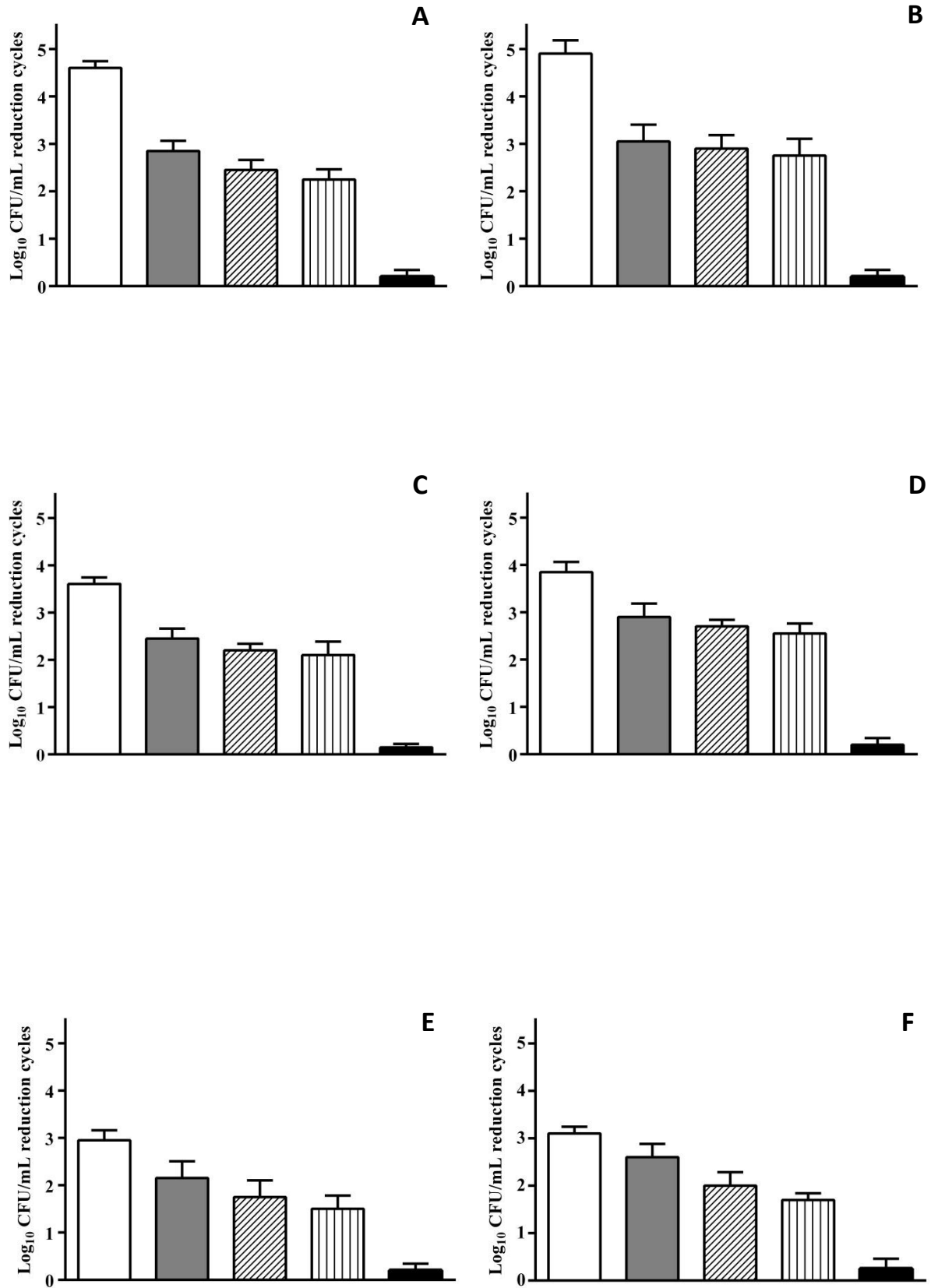


Table 1. GC-MS analysis of the essential oils from *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO)

Constituents*	Percent of essential oil total mass	
	OVEO	
thymol	69.3	
p-cymene	13.1	
γ -terpinene	6.01	
myrcene	1.1	
linalool	2.71	
α -pinene	1.6	
	ROEO	
eucalyptol	35.75	
camphor	28.7	
limonene	24.88	
α -pinene	1.97	
p-cymene	1.67	
γ -terpinene	1.29	

* constituents detected in amounts > 1 %

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oils from *O. vulgare* L. (OVEO) and *R. officinalis* L. (ROEO) against *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Enteritidis* in single and mixed inoculum.

Strains	MIC values ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	
	OVEO	ROEO
Single inoculum		
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	0.6	5
<i>E. coli</i> UFEPEDA 224	0.6	5
<i>S. Enteritidis</i> UFEPEDA 414	0.6	10
Mixed inoculum		
	0.6	10