



CARLOS EDUARDO VASCONCELOS DE OLIVEIRA

INFLUÊNCIA DE TIMOL E CARVACROL SOBRE O
CRESCIMENTO, CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS E
POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE CEPAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADAS DE ALIMENTOS

RECIFE - PE

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



CARLOS EDUARDO VASCONCELOS DE OLIVEIRA

INFLUÊNCIA DE TIMOL E CARVACROL SOBRE O
CRESCIMENTO, CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS E
POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE CEPAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADAS DE ALIMENTOS

Dissertação apresentada como exigência
às atividades concernentes ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição, com área de
concentração em Ciências dos Alimentos
da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Tânia Lúcia Montenegro Stamford

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

RECIFE - PE

2010

Oliveira, Carlos Eduardo Vasconcelos de
Influência de Timol e Carvacrol sobre o crescimento,
características metabólicas e potencial enterotoxigênico
de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de
alimentos / Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira. –
Recife : O Autor, 2010.
116 folhas : il., fig., tab. e quadros.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2010.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Alimentos. 2. Compostos fenólicos. 3. Sinergismo
antimicrobiano. 4. Modelo alimentar. 5. Supressão
fisiológica. I. Título.

612.392.8
641.3

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2010-085

CARLOS EDUARDO VASCONCELOS DE OLIVEIRA

INFLUÊNCIA DE TIMOL E CARVACROL SOBRE O CRESCIMENTO,
CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS E POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE
CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE ALIMENTOS

Dissertação aprovada em: 23 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Erilane de Castro Lima - UFPE

Coordenador da Banca Examinadora



Prof^ª. Dr^ª. Celiane Gomes Maia da Silva - UFRPE

Examinador Externo



Prof^ª. Dr^ª. Roberta Albuquerque Bento - UFPE

Examinador Externo

**RECIFE
2010**

O Deus senhor de todas as coisas

Helenira e Genival meus pais

Aos Professores, Tânia e Evandro, meus orientadores

Elieidy e Ingrid minhas amigas e companheiras de todos os momentos

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar e ter me sustentado nos momentos difíceis e por me dar o dom da persistência.

A meus pais, Genival Estevão de Oliveira e Helenira Vasconcelos de Oliveira, pelo seu amor, sua dedicação e apoio em todos os momentos desta minha trajetória terrena, sejam eles de alegria ou de dificuldade, sempre me incentivando a não desistir de minhas conquistas;

Ao meu irmão Paulo Henrique, por todo o incentivo dispensado e compreensão na minha ausência;

À minha orientadora Profa. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford, pelo tempo dispensado para meu aprendizado nesta área, a acolhida, a confiança depositada durante todo o curso, pelos conselhos a amizade e o carinho;

Ao Prof. Dr. Evandro Leite de Souza, pela grande oportunidade concedida, sendo mais que um orientador, um amigo e mestre, me dando apoio e orientação todo tempo, os quais foram imprescindíveis para a realização deste trabalho e minha formação, pelo apoio dado desde a graduação e o grande incentivo para que pudesse seguir em frente;

A Profa. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, por ter me mostrado o caminho da pesquisa, por ter me acolhido na graduação, graças a ela e toda equipe do Laboratório de Bromatologia que cada vez mais fui me apaixonando pela área, pelos ensinamentos e esclarecimentos prestados durante toda minha vida acadêmica e de pós-graduação;

A Profa. Dra. Maria Lúcia da Conceição, o início de tudo, que me acolheu no laboratório desde o primeiro período da graduação, me apelidou carinhosamente de “fujão”, mas voltei e hoje estou com ela para o que der e vier, é uma grande mãe, amiga, companheira para todos os momentos, e que foi fator indispensável para a conclusão desta dissertação e de outros trabalhos que porventura apareceram neste caminhada;

As professoras da banca de leitura Prof^ª. Dr^ª. Celiane Gomes Maia da Silva e Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, por aceitarem avaliar este trabalho, enriquecendo-o com conhecimento e experiência;

As professoras da banca examinadora e grupo de pesquisa ao qual participo Prof^ª. Dr^ª. Thayza Christina Montenegro Stamford, Prof^ª. Dr^ª. Roberta Albuquerque Bento e Prof^ª. Dr^ª. Erilane de Castro Lima por terem aceitado o convite, compartilhando comigo este sonho, além da grande contribuição deixada na leitura deste trabalho;

Ao meu grande amigo Nelson Justino, aluno de iniciação científica e agora mestrando, pessoa “indelével”, “inexorável”, que foi de suma importância para a conclusão deste trabalho, verdadeiro símbolo de dinamismo, responsabilidade e eficiência, com sua ajuda conseguimos terminar todos os experimentos em menos de um ano, agradeço profundamente esta pessoa que adora pronunciar palavras prolixas. Sou muito grato, meus efusivos amplexos;

A Maria Elieidy Gomes de Oliveira, aluna do doutorado, colega de trabalho e de grupo de pesquisa, família e principalmente companheira inseparável para todas as horas, por tudo que

tem feito por mim desde que lhe conheci, todas as ajudas na dissertação e na vida, realmente não tenho palavras para lhe agradecer por tudo que tem feito por mim até hoje, meu muito obrigado;

A minha grande mãe paraibana, Dona Eliete, e a Eurialys, pelos momentos de alegria, incentivo e acolhida;

A Ruth Guilherme, amiguíssima, companheira, e como ela mesma diz meu 50% da turma do mestrado, “eu e tu, tu e eu”. Obrigado por toda a força, por todos os trabalhos prestados, aperreios e momentos de felicidade, por estar sempre ao meu lado quando precisei que confiou em mim desde o primeiro dia do curso, você está guardada no coração para sempre;

A meus grandes amigos Aderaldo, Ingrid Conceição, Heloisa Geronimo e Marilene, companheiros para todas as horas, muito obrigado pelas palavras de apoio e incentivo, pela amizade, carinho, atenção, preocupação, ajudas e por estarem presentes sempre em minha vida;

A meu grande amigo Floro Neto, pela acolhida, por ter me recebido de braços abertos em sua morada na cidade do Recife, companheiro para todas as horas, sempre disposto a ajudar. Obrigado por tudo que fez por mim. A sua namorada Érika pelo incentivo e pelos momentos de alegria;

À Otaviana, Mayra, José Gomes, Kilma e Kelvo que mesmo de longe sempre me apoiaram e me incentivaram. Por tudo que já vivemos juntos, meu muito obrigado;

Ao pessoal do grupo de pesquisa da Universidade Federal da Paraíba, Jéferson Barros, Ana Caroline, Isabella, Larissa, Ted, Rilávia, Carla, Vitória, Marcela, Janeide, Laenia, Taiz, Queninha, os quais fazem parte do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, e ao pessoal da Bromatologia, Yasmin, Tamires, Suéllen, Ilsa, Gaby, Estefânia, Tayanna, Bárbara, Juliana Késsia e Ertha por estarem presentes sempre em minha vida e me agüentar em todos os momentos de brincadeiras e aperreios;

Ao Grupo de pesquisa do Curso de Nutrição da UFPE, Teresa Mitchell, Daniele Cordeiro, Adriana Carla, Amanda, Anamelia, Emmanuela, Geiza, Karina. Por ter me acolhido em seu grupo e pelas oportunidades de estudo e trabalhos realizados;

Ao grupo de pesquisa do NPCIamb da Universidade Católica, Adamares, Alicia, Aline, Anabelle, Antonio, Fabiola, Hélvia, Humberto, Juliana, Martinha, Petrusky, Raquel e a professora Galba por todo tempo que convivi com vocês, pela paciência e por todo conhecimento adquirido neste período;

Aos meus amigos da UNIPB, pela oportunidade concedida no ensino superior, Erika Marques, Érika Martins, Carla, Bárbara, Gercina, Mayara, a todos os funcionários, diretores, alunos e colegas de trabalho, meu muito obrigado pela confiança;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Nutrição pelos saberes repassados na condução das disciplinas do mestrado;

À Sra. Necí pela paciência, cordialidade, acolhida sempre mostrada quando da necessidade de seus trabalhos da Secretaria do Programa de Pós-graduação em Nutrição;

Ao funcionário Gilvandro pela atenção, gentileza, prestação de seus valiosos conhecimentos e apoio às análises realizadas no Centro de Tecnologia da UFPB;

Ao funcionário Rafael Padilha do Laboratório Imunopatologia Keizo Asami, pela disponibilidade em ajudar nos ensaios de microscopia eletrônica;

Aos funcionários e ex-funcionários do Leaal, Laércio, Moises, Vivaldo, Viviane, Camilo, Arthur e Alexandre pela grande ajuda quando necessitei concluir os experimentos;

A todos que passaram em minha vida, desde o início do curso que contribuíram de forma direta e indireta, alguns hoje presentes e outro não, Felipe, Juliana Maria, Fátima Lúcia, Emídio, Liliane, Pedro Patrício, Patrícia, Kellynha, Nini, Dona Lurdes e toda família Dantas.

A Pós-graduação em Nutrição/UFPE, pela oportunidade e incentivo na busca pela obtenção do mestrado;

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsa de mestrado e financiamento do projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

RESUMO

A indústria alimentícia visa a produção de alimentos que apresentem vida-de-prateleira longa e inocuidade com relação à presença de microrganismos patogênicos e suas toxinas. A nova tendência do consumidor e da legislação de alimentos têm tornado essa busca cada vez mais premente e necessária. A maioria das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) de origem microbiana possui sua etiologia bem estabelecida, de modo que a bactéria *S. aureus* é reconhecida como um dos agentes patogênicos mais comuns, sendo responsável por surtos associados à ingestão de alimentos *in natura* e processados em todo o mundo, justifica-se a execução de um estudo com ênfase na avaliação dos compostos fenólicos timol e carvacrol, os quais são reconhecidos como componentes majoritários do óleo essencial de *O. vulgare*. Desta forma, este estudo avaliou a inibição dos possíveis mecanismos de ação e a interferência de timol e carvacrol sobre o crescimento, potencial enterotoxigênico e alguns parâmetros metabólicos de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos. Aplicou-se de forma combinada o timol e carvacrol com ácido láctico e acético contra *Staphylococcus aureus* com a determinação da Concentração Inibitória fracionária (FIC) e índice de tempo de morte em ensaio com caldo de carne e um modelo alimentar (carne). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do carvacrol e timol foram 1,25 e 0,6 µL/mL, respectivamente. Índices de FIC da aplicação combinada dos constituintes fenólicos e ácidos orgânicos foram 0,5, sugerindo uma interação sinérgica. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) encontrada entre as contagens bacterianas para o caldo de carne acrescentado dos fenóis isoladamente ou em combinação com o ácido láctico em concentrações sub-inibitórias. Contrariamente, a contagem bacteriana encontrada para o caldo de carne acrescentado dos fenóis somente foram significativamente menores ($p > 0,05$) às contagens obtidas para o caldo acrescentado da combinação de compostos fenólicos e ácido acético. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as contagens bacterianas para o modelo de carne adicionado de fitoquímicos isolados e em combinação com os ácidos orgânicos. Os antimicrobianos testados isoladamente ou em mistura proporcionaram menores efeitos a influência dos compostos fenólicos carvacrol e timol sobre algumas características fisiológicas e modulação da secreção de fatores de virulência estafilocócicas, coagulase e enterotoxina. Foram também estudados possíveis mecanismos para o estabelecimento de atividade anti-estafilocócica por estes compostos. Concentrações subnibitórias (0,3 e 0,15 µL/mL) do carvacrol e timol inibiram fortemente a atividade das enzimas coagulase e lipase, além de causar uma perda significativa de tolerância à salinidade. A supressão da produção de enterotoxinas ocorreu totalmente com ambos compostos fenólicos em concentrações subnibitórias. A perda de material absorvente 260-nm e íons potássio ocorreu imediatamente após a adição de carvacrol e timol nas concentrações de 0,6 e 1,2 µL/mL. A microscopia eletrônica de células tratadas com o carvacrol e timol revelou a formação de defeitos na superfície das células e perda de material citoplasmático. Esses resultados sugerem uma abordagem interessante para a melhoria da preservação de alimentos que utilizam procedimentos mais naturais, considerando a demanda atual de consumo e qualidade sensorial de alimentos.

Palavras chave: Compostos fenólicos, Sinergismo antimicrobiano, Modelo alimentar, Supressão fisiológica.

ABSTRACT

The food industry aims to produce foods that have life-long shelf and safety with respect to the presence of pathogenic microorganisms and their toxins. The new trends of consumer and food legislation have made this search even more pressing and necessary. Most of the Foodborne Diseases (foodborne) of microbial etiology has well established, so that the bacterium *Staphylococcus aureus* is recognized as one of the most common pathogens, being responsible for outbreaks associated with eating fresh food and processed in around the world, justified the execution of a study with emphasis on evaluation of phenolic compounds thymol and carvacrol, which are recognized as major components of essential oil of *O. vulgare*. This study evaluated the inhibition of the possible mechanisms of action and the interference of thymol and carvacrol on the growth potential enterotoxic and some metabolic parameters of strains of *S. aureus* in foods. Was applied in combination combined thymol and carvacrol with lactic acid and acetic acid against *Staphylococcus aureus*. Using the determination of Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index and kill-time assay in meat broth and in a food model (meat). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of carvacrol and thymol were 1.25 and 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively. FIC indices of the combined application of the phenolic constituents and organic acids were 0.5 suggesting a synergic interaction. No difference ($p>0.05$) was found among the bacterial counts for the meat broth added of the phenolics alone or in combination with lactic acid at sub-inhibitory concentrations. Contrarily, the bacterial counts found for the meat broth added of the phenolics alone were significantly lower ($p>0.05$) than the counts obtained for the broth added of the combination of phenolics and acetic acid. No difference ($p>0.05$) was found among the bacterial counts for the meat model added of phytochemicals alone and in combination with the organic acids. The tested antimicrobials alone or in mixture provided smaller antistaphylococcal effect in meat broth than in meat model. Subinhibitory concentrations (0.3 and 0.15 $\mu\text{L mL}^{-1}$) of carvacrol and thymol strongly inhibited the activity of the enzymes coagulase and lipase, in addition to cause a significant loss of salt tolerance. The suppression of enterotoxins production occurred totally in the both tested phenolics subinhibitory concentrations. Loss of 260-nm-absorbing material and potassium ions occurred immediately after addition of carvacrol and thymol at 0.6 and 1.2 mL^{-1} . Electron microscopy of carvacrol- and thymol-treated cells revealed the formation of roles in the cell surfaces and loss of cytoplasm material. These results could arise as an interesting approach for the improvement of food preservation using more natural procedures, considering the current demand of consumer and sensory quality of foods.

Keywords: Phenolic compounds, Antimicrobial synergy, Food model, Physiological suppression

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial	Página
<p>Figura 1. Estrutura molecular de alguns constituintes presentes em óleos essenciais de especiarias.....</p>	31
<p>Figura 2. Representação esquemática de uma molécula de Timol.....</p>	35
<p>Figura 3. Representação esquemática de uma molécula de Carvacrol.....</p>	36
<p>Figura 4. Esquema demonstrando o mecanismo de ação na membrana citoplasmática de células de <i>Staphylococcus aureus</i>.....</p>	38
<p>Figura 5. Estrutura química clássica e tridimensional do ácido láctico (A) e acético (B).....</p>	43
<p>Figura 6. Carvacrol e Timol Sigma- Aldrich Brasil Ltda.....</p>	56
Artigo 1.	Página
<p>Fig. 1. Survivors curves for <i>S. aureus</i> QCE in meat broth at 37 °C as a function of antimicrobial concentration: A — (■): control (0 µL/mL); (□): carvacrol (MIC: 1.25 µL/mL); (▲): lactic acid (MIC: 2.5 µL/mL; (○): carvacrol (¼ MIC: 0.03 µL/mL)+lactic acid (¼ MIC: 0.62 µL/mL); B — (■): control (0 µL/mL); (□): carvacrol (MIC: 1.25 µL/mL); (Δ): acetic acid (MIC: 0.6 µL/mL); (●): carvacrol (¼ MIC: 0.03 µL/mL)+acetic acid (¼ MIC: 0.15 µL/mL); C — (■): control (0 µL/mL); () : thymol (MIC: 0.6 µL/mL); (▲): lactic acid (MIC: 2.5 µL/mL; (◇): thymol (¼ MIC: 0.15 µL/mL)+lactic acid (¼ MIC: 0.62 µL/mL); D— (■): control (0 µL/mL); () : thymol (MIC: 0.6 µL/mL); (Δ): acetic acid (MIC: 0.6 µL/mL; (◆): thymol (¼ MIC: 0.15 µL/mL)+acetic acid (¼ MIC: 0.15 µL/mL).....</p>	88
<p>Fig. 2. Survivors curves for <i>S. aureus</i> QCE in meat at 7 °C as a function of antimicrobial concentration: A — (■): control (0 µL/mL); (□): carvacrol (MIC: 1.25 µL/mL); (▲): lactic acid (MIC: 2.5 µL/mL; (○): carvacrol (¼MIC: 0.03 µL/mL)+lactic acid (¼MIC: 0.62 µL/mL); B — (■): control (0 µL/mL); (□): carvacrol (MIC: 1.25 µL/mL); (Δ): acetic acid (MIC: 0.6 µL/mL); (●): carvacrol (¼ MIC: 0.03 µL/mL)+acetic acid (¼ MIC: 0.15 µL/mL); C — (■): control (0 µL/mL); () : thymol (MIC: 0.6 µL/mL); (▲): lactic acid (MIC: 2.5 µL/mL; (◇): thymol (¼ MIC: 0.15 µL/mL)+lactic acid (¼MIC: 0.62 µL/mL); D—(■): control (0 µL/mL); () : thymol (MIC: 0.6 µL/mL); (▲): acetic acid (MIC: 0.6 µL/mL; (◆): thymol (¼ MIC: 0.15 µL/mL)+acetic acid (¼ MIC: 0.15 µL/mL).....</p>	89

- Figure 1.** Leakage of potassium ions from *S. aureus* QCF induced by exposure to carvacrol and thymol along 120 min at 37 °C (□: control, 0 $\mu\text{L mL}^{-1}$; +: thymol, 0.6 $\mu\text{L mL}^{-1}$; ▲: thymol, 0.12 $\mu\text{L mL}^{-1}$; ○: carvacrol, 0.6 $\mu\text{L mL}^{-1}$; ■: 0.12 $\mu\text{L mL}^{-1}$)..... 103
- Figure 2.** Scanning electron microphotography of *S. aureus* QCF after treatment with carvacrol and thymol. (a) carvacrol: 1.2 $\mu\text{L mL}^{-1}$; (b) thymol 1.2 $\mu\text{L mL}^{-1}$; (c) control: 0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ 104

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Referencial	Página
Quadro 1. Aspectos gerais de uso de alguns ácidos orgânicos (acidulantes e lipofílicos) com ação antimicrobiana utilizados como conservadores alimentares.....	40
Quadro 2. Fatores de virulência relacionados aos constituintes da parede celular do <i>S. aureus</i>	48
Quadro 3. Fatores de virulência relacionados a enzimas e toxinas produzidas por <i>S. aureus</i>	49
Artigo 1.	Página
Table 1. FIC indexes of the combined action of carvacrol and thymol with acetic and lactic acid to <i>S. aureus</i> strains.....	87
Artigo 2.	Página
Table 1. Proportion of <i>S. aureus</i> cells presenting lipase negative activity colonies onto Salty Tween agar (STA) and Salty Tween agar added of carvacrol or thymol at sub-inhibitory concentrations.....	101
Table 2. Effect of sub-inhibitory concentrations of carvacrol and thymol on coagulase activity in <i>S. aureus</i> strains.....	101
Table 3. Proportion of <i>S. aureus</i> cells able to form colonies on NA supplemented with 75 g NaCl L ⁻¹ (NA-NaCl) after exposure to carvacrol or thymol at sub-inhibitory concentrations.....	102
Table 4. Effect of carvacrol and thymol at subinhibitory concentrations on the enterotoxin production by <i>S. aureus</i> QCF.....	102
Table 5. Rate of 260nm absorbing material release from <i>S. aureus</i> QCF treated by carvacrol or thymol.....	103

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 HIPÓTESE.....	19
4 JUSTIFICATIVA PARA REALIZAÇÃO DO PROJETO E PERSPECTIVAS.....	20
5 O ESTADO DA ARTE.....	21
5.1 Tendências inovadoras na produção de alimentos.....	21
5.2 Alimentos como substratos para o crescimento microbiano.....	24
5.3 Potencialidade antimicrobiana de especiarias.....	26
5.4 Propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de especiarias.....	29
5.5 Fitocompostos Carvacrol e Timol.....	34
5.6 Uso de ácidos orgânicos como conservantes de alimentos.....	39
5.7 <i>Staphylococcus aureus</i>	43
5.8 Estrutura da célula bacteriana.....	52
5.9 Mecanismo de ação de agentes antimicrobianos na célula bacteriana.....	53
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
6.1 Obtenção das Cepas de <i>S. aureus</i>	56
6.2 Obtenção dos fitoconstituintes.....	56
6.3 Inóculo microbiano.....	57
6.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos fitoconstituintes.....	57
6.5 Interferência dos fitoconstituintes sobre a viabilidade de crescimento bacteriano.....	57
6.6 Interferência dos fitoconstituintes sobre as características metabólicas de <i>S. aureus</i>	58
6.7 Interferência dos fitoconstituintes sobre o potencial enterotoxigênico de cepas de <i>S. aureus</i>	58
6.8 Agentes antimicrobianos.....	58
6.9 Preparação do caldo carne.....	59
6.10 Avaliação do efeito sinérgico em caldo.....	59
6.11 Aplicação combinada de antimicrobianos em alimento.....	60
6.12 Ensaios de atividade enzimática e tolerância ao sal.....	60
6.13 Produção de enterotoxinas.....	61
6.14 Ensaio de efluxo de íons potássio.....	61
6.15 Lançamento de material genético.....	62
6.16 Morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura.....	62
6.17 Análises estatísticas.....	62
7 REFERENCIAS.....	64
Artigos Originais	
APÊNDICE A	
Inhibition of <i>Staphylococcus aureus</i> in broth and meat model using synergies of phenolic compounds and organic acids.....	80
APÊNDICE B	
Influence of carvacrol and thymol on physiological characteristics and enterotoxins production by <i>S. aureus</i> strains isolated from foods.....	95
8 Considerações Finais.....	111

9 Anexos	
Anexo A – Aceite para publicação (Food Microbiology)	113
Anexo B – Submissão (Food science and technology).....	115

1 INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia visa à produção de alimentos que apresentem vida-de-prateleira longa e inocuidade com relação à presença de microrganismos patógenos e suas toxinas. Porém, a nova tendência do consumidor e da legislação de alimentos têm tornado essa busca cada vez mais premente e necessária. Os consumidores procuram alimentos de boa qualidade (frescos, com pouca quantidade de sal, açúcar, gordura e ácidos, entre outros), livres de preservativos e minimamente processados, porém com vida-útil longa (GOULD, 1995). Ainda, a legislação de alimentos tem progressivamente restringido e/ou limitado o uso de alguns conservantes químicos utilizados atualmente em diferentes alimentos (LEUSCHNER; ZAMPARINI, 2002).

De uma forma geral, os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes microbianos, que podem levar a ocorrência de doenças manifestadas por ação de microrganismos patogênicos ou de toxinas microbianas. Durante os últimos cinquenta anos, a proteção de alimentos contra microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos tem despertado grande interesse, de modo que neste período a produção de alimentos microbiologicamente estáveis vem sendo alcançada através do uso de vários procedimentos de natureza física ou química (BENKEBLIA, 2004).

O controle do crescimento microbiano em alimentos objetiva uma eliminação total ou parcial de microrganismos que venham a alterar suas características organolépticas e/ou que atuem como causadores de doenças. A maioria das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) de origem microbiana possui sua etiologia bem estabelecida, de modo que a bactéria *Staphylococcus aureus* é reconhecida com um dos agentes patogênicos mais comuns, sendo responsável por surtos associados à ingestão de alimentos *in natura* e processados em todo o mundo (BRAGA et al., 2005). A intoxicação alimentar causada por *S. aureus* é considerada como uma das mais freqüentes doenças transmitidas por alimentos em diversos países, tendo relatos que a cita como estando entre as três maiores causas de DTAs de origem microbiana em todo o mundo (NOSTRO et al., 2002).

As especiarias e seus derivados assumiram relevante importância por serem usados como potenciais agentes inibitórios de microrganismos. Esses elementos que se destacavam, principalmente, como agentes para conferir aromas e gostos característicos aos alimentos revelaram nova perspectiva para seu emprego na indústria de alimentos (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2007)

Com a difusão das modernas técnicas de preservação houve interesse acentuado e renovado sobre algumas especiarias, utilizadas principalmente como condimentos alimentares. Além de participarem como ingredientes de inúmeros alimentos, tornando-os mais saborosos e digestivos, apresentam ação indireta e complementar como agentes antimicrobianos devido à presença de óleos essenciais. Esses são constituídos por princípios ativos voláteis que podem ser obtidos mediante métodos de extração (WIEST, 1999).

Nos Estados Unidos e em países da Europa vários componentes de óleos essenciais são registrados para uso como flavorizantes em produtos alimentícios. Estes flavorizantes são considerados como não tendo nenhum risco para a saúde dos consumidores, e inclui carvacrol, carvona, cinamaldeído, citral, eugenol, mentol, timol, p-cimeno, limoneno, entre outros (STECHINI; SARAI; GIAVEDONI, 1993; SKANDAMIS; TSIGARIDA; NYCHAS, 2002). Diferentemente, metil eugenol e estragol são considerados tóxicos, e tem sua inclusão em alimentos proibida (BURT, 2004).

Torna-se fascinante para a ciência de alimentos a possibilidade da descoberta de antimicrobianos naturais e sua possível aplicação prática na conservação de alimentos, de modo que muitos pesquisadores têm se aprofundado nesta possibilidade tomando como base promissores resultados observados em experimentos *in vitro* (PRASAD; SEENAYYA, 2000; JUGLAL; GOVINDEN; ODHAV, 2002; LEMAY et al., 2002).

Frente ao reconhecido potencial antimicrobiano dos óleos essenciais, bem como considerando a pressão dos órgãos legisladores e do consumidor sobre a indústria de alimentos exigindo a adoção de alternativas mais naturais para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, com conseqüente eliminação parcial ou total da adição de conservantes químicos em seus produtos, justifica-se a execução de um estudo com ênfase na avaliação dos compostos fenólicos timol e carvacrol, os quais são reconhecidos como componentes majoritários do óleo essencial de *O. vulgare*. Desta forma, este estudo avaliou a inibição dos possíveis mecanismos de ação e a interferência de timol e carvacrol sobre o crescimento, potencial enterotoxigênico e alguns parâmetros metabólicos de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os possíveis mecanismos de ação e a influência dos fitoconstituíntes timol e carvacrol sobre o crescimento, características metabólicas e potencial enterotoxigênico de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do timol e carvacrol sobre cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos;
- Avaliar o efeito do timol e carvacrol sobre a viabilidade das cepas ensaiadas;
- Verificar o efeito de concentrações subinibitórias do timol e carvacrol sobre algumas características metabólicas de *S. aureus*;
- Observar a influência do carvacrol e timol sobre o potencial enterotoxigênico de cepas de *S. aureus*;
- Verificar a existência de um possível efeito anti-estafilocócico sinérgico entre os fitoconstituíntes timol e carvacrol quando aplicado em associação com ácidos orgânicos utilizados na conservação de alimentos.

3 HIPÓTESE

O vegetal *Origanum vulgare* por produzir um óleo essencial rico em compostos fenólicos, em destaque timol e carvacrol, os quais são acreditados por possuírem propriedade antimicrobiana, em decorrência de causar perturbação da membrana citoplasmática, ruptura do fluxo de elétrons, perturbação do transporte ativo, inibição de atividade de enzimas e coagulação do conteúdo citoplasmático, tem se destacado como possível antimicrobiano natural. Assim, se pressupõem que os fitoconstituintes timol e carvacrol podem apresentar propriedade anti-estafilocócica, vindo desta forma a tornarem-se emergentes alternativas para o controle de *Staphylococcus aureus* em alimentos.

4 JUSTIFICATIVA PARA REALIZAÇÃO DO PROJETO E PERSPECTIVAS

A indústria alimentícia procura atender regras gerais que se baseiam em prolongar o período de armazenamento dos alimentos, fazendo com que estes permaneçam adequados para o consumo, aumentando a variedade da dieta, fornecendo os nutrientes necessários para a manutenção da saúde e gerando lucros para os fabricantes. As mudanças no processamento e a crescente exigência do consumidor por alimentos mais naturais, com uma vida útil prolongada, mantendo a qualidade nutritiva e sensorial, impulsionam a realização de pesquisas para obtenção de novos agentes conservantes, que possam atender a novas perspectivas do mercado, citando-se os óleos essenciais como uma opção a esta emergente necessidade do consumidor.

Entre os diversos óleos essenciais que apresentam potencialidade antimicrobiana, o óleo essencial obtido da espécie vegetal *O. vulgare* tem mostrado destacáveis resultados na inibição de diferentes microrganismos, embora estes resultados tenham sido variados de acordo com os microrganismos ensaiados, origem do óleo essencial e técnica utilizada no ensaio antimicrobiano. Carvacrol e timol, citados como componentes majoritários do óleo essencial de *O. vulgare*, tem recebido uma ênfase na pesquisa de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, de modo que a presença destes componentes, de forma isolada ou em combinação, é reconhecida como marcador de potencial antimicrobiano.

Assim, estes aspectos suscitam a necessidade de realização de pesquisas científicas voltadas para o estudo da interferência de diferentes fitoconstituintes de óleos essenciais sobre parâmetros que possam vir a refletir a capacidade metabólica e de crescimento/sobrevivência de diferentes microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes de interesse em alimentos. O alcance dos objetivos supracitados promoveu informações relevantes sobre a potencialidade de uso dos fitoconstituintes, timol e carvacrol no controle do crescimento e sobrevivência de *S. aureus* em alimentos. Os resultados obtidos subsidiarão futuros estudos com ênfase na avaliação da propriedade antimicrobiana de outros produtos naturais ou sintéticos sobre diferentes microrganismos de interesse em alimentos, bem como poderão ser racionalmente extrapolados para aplicação em outras áreas da microbiologia, a citar a microbiologia clínica humana, microbiologia clínica veterinária e fitopatologia. Por fim, a condução deste plano de trabalho também subsidiou a disponibilidade de informações científicas ainda escassas na área de estudo da potencialidade antimicrobiana de produtos naturais de possível uso em alimentos, o que culminou com as publicações científicas em periódicos de impacto nacional e internacional.

5 O ESTADO DA ARTE

5.1 Tendências inovadoras na produção de alimentos.

No sistema de produção de alimentos, torna-se fundamental que medidas sejam tomadas para que seja assegurada a inocuidade e estabilidade dos seus produtos finais durante toda a sua vida de prateleira. Na indústria de alimentos, sabe-se que a conservação química limita a condição de “alimento natural”, embora, seja reconhecida como um dos elementos fundamentais na questão da segurança alimentar (BEDIN; GUTKOSKI; WIEST, 1999). Apesar da segurança microbiológica de alimentos por muitos anos ter sido obtida pelo uso de vários processos químicos e/ou físicos, alguns conservantes químicos são suspeitos ou são tóxicos aos consumidores, bem como, por sua vez, o uso de processos físicos (resfriamento, congelamento e uso de altas temperaturas) podem ocasionar perdas nutricionais e/ou reações indesejáveis (e.x., reação de Maillard, oxidação lipídica) que alteram as características organolépticas dos alimentos. Esta realidade tem causado um aumento da pressão sobre a indústria alimentícia para adoção de alternativas mais naturais para obtenção dos seus propósitos (MARINO; BERSANI; COMI, 2001; TASSOU; DROSINOS; NYCHAS, 1995; SOUZA. et al., 2005).

Nas últimas décadas o processo de conservação de alimentos vem assumindo grande complexidade diante da perspectiva dos consumidores exigirem alimentos mais naturais, mais saudáveis, frescos, livres de aditivos sintéticos, com menor teor de sal e ácidos, tendo sido submetidos ao menor processamento possível, entretanto, tendo que apresentar a conveniência de possuir larga vida útil e mostrarem-se inócuos ao consumidor (SAGDIÇ, 2003). Ainda, a legislação de alimentos progressivamente vem restringindo e/ou limitando o uso de alguns conservantes químicos utilizados atualmente em diferentes alimentos. Tal restrição tem criado problemas para a indústria de alimentos, pois a susceptibilidade de alguns microrganismos frente a antimicrobianos sintéticos clássicos tem gradualmente diminuído (SOUZA et al., 2007).

Neste cenário, surge uma nova discussão sobre opções inovadoras e emergentes para o alcance da segurança microbiológica dos alimentos, a citar o uso de embalagens ativas, bacteriocinas, culturas protetoras e compostos naturais (extratos, óleos essenciais, quitosana) (ROLLER; COVIL, 1999; DIAZ et al., 2002; DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004). Forsythe (2002) confirma que os métodos tradicionais de conservação vêm sendo

substituídos por novas técnicas como, por exemplo, a adição de agentes antimicrobianos naturais causando, dessa forma, uma resposta microbiana ao estresse.

Existe uma tendência de combinação de vários tratamentos subletais, utilizando-se de novos agentes antimicrobianos em uma aplicação conjunta com agentes já empregados, porém com um uso mais amenizado, proporcionando a segurança microbiológica exigida pelos consumidores e pela legislação de alimentos (LANCIOTTI et al., 2004).

Fellows (2006) apresenta a tecnologia de barreiras, onde existe a combinação de fatores para garantir a segurança microbiológica e a estabilidade permitindo, assim, a sua conservação. O conceito de combinar diversos fatores para conservar o alimento foi desenvolvido por Leistner (1995). Nessa tecnologia de barreiras, o entendimento das interações complexas entre temperatura, atividade de água, pH e conservantes químicos, é utilizado para criar uma série de barreiras que garantam a segurança microbiológica do alimento processado.

Existe também a perspectiva de substituir os aditivos sintéticos por conservantes naturais presentes nos condimentos (BARA, 1992). A substituição de aditivos sintéticos por naturais dependerá fundamentalmente da determinação de uma concentração ideal e, segundo Shelef (1983), as concentrações normalmente empregadas para realçar o aroma e sabor que variam de 0,5% a 1%, provavelmente, não inibem o desenvolvimento microbiano que depende de concentrações superiores a 1%.

Particularmente, a resistência microbiana mostra-se como um importante aspecto impulsionador da busca de novos compostos antimicrobianos potenciais de uso em alimentos. Mudanças no alvo do antimicrobiano, inativação do antimicrobiano por enzimas, mudanças na permeabilidade celular, efluxo ativo do antimicrobiano e superprodução de enzimas-alvo são exemplos de mecanismos de resistência antimicrobiana (McKEEGAN; BORGES-WALMSLEY; WALMSLEY, 2002). Resistência antimicrobiana é reconhecidamente uma consequência inevitável da pressão do amplo uso de antimicrobianos em todos os campos do controle do crescimento de microrganismos, portanto, apresenta-se previsível e inevitável. Entretanto, este fenômeno poderia ser possivelmente administrado ou, pelo menos, suavizado através do uso racional de antimicrobianos (BANERJEE; SAKAR, 2004).

Brull e Coote (1999) relatam resistência de microrganismos deteriorantes e patogênicos frente a alguns antimicrobianos usados para a conservação de alimentos como ácidos orgânicos fracos, peróxido de hidrogênio e agentes quelantes. Ainda, tem sido verificado o isolamento de cepas de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Shigella* de origem alimentar com padrão de resistência a diferentes

antibióticos de uso clínico como ampicilina, bacitracina, cefalotina, cloranfenicol, ciproflaxin, eritromicina e metronidazol (BANERJEE; SAKAR, 2004). Estes antibióticos são utilizados em alimentos de origem animal com propostas de controle e tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana, bem como para promoção de crescimento (WHITE et al., 2002).

Assim, torna-se fascinante para a ciência de alimentos a possibilidade da descoberta de antimicrobianos naturais e sua possível aplicação prática na conservação de alimentos, de modo que muitos pesquisadores têm se aprofundado nesta possibilidade tomando como base promissores resultados observados em experimentos *in vitro* (PRASAD; SEENAYYA, 2000; JUGLAL; GOVINDEN; ODHAV, 2002; LEMAY et al., 2002). Entretanto, sabe-se que os componentes das matrizes alimentares podem, possivelmente, interagir com os princípios ativos destes potenciais compostos antimicrobianos resultando em moderada a não significativa efetividade antimicrobiana (MENON; GARG, 2001).

Um obstáculo a ser superado na aplicação de novos compostos como conservantes de alimentos consiste na sua aprovação pelos órgãos legisladores da produção de alimentos. Inicialmente, seis princípios gerais devem ser avaliados para o uso de qualquer substância como aditivo alimentar: i) o aditivo proposto deve ser toxicologicamente testado e avaliado em todos os aspectos pertinentes, incluindo efeito acumulativo, sinérgico e potencial; ii) somente aquela substância considerada segura no nível pretendido de inserção deve ser liberada para o uso; iii) todo aditivo alimentar deve ser novamente avaliado quando do surgimento de novas informações acerca de seu uso e segurança; iv) o aditivo deve sempre ser mantido em conformidade com as especificações aprovadas pela Comissão do Codex Alimentarius; v) a justificativa do uso do aditivo deve ser baseada nos requisitos da segurança das diferentes características de consumidores, bem como deve apresentar-se como alternativa viável do ponto de vista técnico e econômico; vi) a aprovação temporária ou permanente do uso do aditivo deve considerar a limitação para alimentos específicos, sua proposta, condições de uso, diminuição dos níveis necessários para alcance dos efeitos desejáveis, ingestão diária para humanos, bem como a provável ingestão de consumidores especiais (CONCON, 1980).

Nos Estados Unidos e em países da Europa vários componentes de óleos essenciais são registrados para uso como flavorizantes em produtos alimentícios. Estes flavorizantes são considerados como não tendo nenhum risco para a saúde dos consumidores, e inclui carvacrol, carvona, cinamaldeído, citral, eugenol, mentol, timol, p-cimeno, limoneno, entre outros (STECHINI; SARAI; GIAVEDONI, 1993; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000).

Diferentemente, metil eugenol e estragol são considerados tóxicos, e tem sua inclusão em alimentos proibida (BURT, 2004).

Qualquer país que pretenda adicionar um destes componentes em alimentos com qualquer outra proposta que não seja a de flavorizante, deve o considerar como um novo aditivo alimentar. A aprovação do uso destes compostos envolveria, provavelmente, onerosos estudos metabólicos e de segurança, o que poderia causar uma limitação de seu uso. Do ponto de vista legislativo, o uso das especiarias ou de seus óleos essenciais poderia surgir como alternativas economicamente mais viáveis naqueles países que pretendem fazer uso das propriedades antimicrobianas de tais compostos na conservação de alimentos (SMID; GORRIS, 1999).

5.2 Alimentos como substratos para o crescimento microbiano.

Os alimentos são substâncias compostas de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais, de modo que os microrganismos agem utilizando este arsenal de constituintes para manutenção de suas funções metabólicas, crescimento e reprodução neste substrato (JAY, 2005). De forma geral, a habilidade de um microrganismo sobreviver e multiplicar-se em um alimento é determinada pelas características do alimento que o alberga, bem como pelas características do ambiente no qual o alimento está inserido (FRAZIER; WESTHOFF, 1996).

Para que a multiplicação microbiana em alimentos seja possível, os seguintes elementos devem estar disponíveis: água, fonte de energia (açúcares, alcoóis, aminoácidos), fonte de nitrogênio (proteínas, aminoácidos, nucleotídeos, peptídeos), vitaminas e sais minerais, além da interveniência de fatores físico-químicos como pH e potencial de óxido-redução (TRABULSI et al., 2002).

O papel dos microrganismos em alimentos pode ser desejável, a exemplo de seu uso como probióticos, no bioprocessamento e bioconservação de alimentos, bem como poder ser indesejável, nos casos da sua ação como agentes deteriorantes ou como causadores de doenças.

O crescimento de microrganismos em alimentos pode vir a causar uma gama de alterações nos seus caracteres organolépticos conduzindo a um estado de impropriedade para o consumo humano. A deterioração microbiana de alimentos pode ocorrer como consequência do crescimento de microrganismos, ou ainda da liberação de enzimas extra ou intracelulares no substrato após lise da célula microbiana (RAY, 1996). Os microrganismos quando

presentes no alimento crescem através da utilização de seus constituintes químicos, seja através de via oxidativa ou fermentativa, com a finalidade de obtenção de energia necessária para manutenção da viabilidade da célula microbiana e síntese de componentes celulares (RIEDEL, 2005). A condução das reações químicas envolvidas na utilização dos nutrientes presentes no alimento promove a formação de vários produtos intermediários e finais, os quais são responsáveis por variadas alterações organolépticas (GRAHAN, 1982).

Desde muito tempo, reconhece-se que não se pode ignorar a magnitude das implicações do problema da deterioração microbiana em relação ao suprimento e segurança mundial de alimentos. As perdas de alimentos decorrentes da deterioração microbiana em base mundial chegam a milhões de dólares por ano, e torna-se ainda mais preocupante, a saber, que este fenômeno figura certamente como um maior problema para as populações subdesenvolvidas do que para as populações já desenvolvidas (GRAHAN, 1982).

Outra relevante consequência do crescimento microbiano em alimentos consiste na probabilidade da ocorrência das chamadas Doenças Transmitidas por Alimentos - DTAs. DTAs podem ser amplamente divididas em três grupos: aquelas causadas pelo consumo de alimentos contendo microrganismos patogênicos viáveis e/ou suas toxinas pré-formadas; aquelas decorrentes da ingestão de alimentos contendo algas patogênicas, parasitas e/ou suas toxinas pré-formadas; e aquelas decorrentes de razões outras não relacionadas com a ingestão de patógenos ou de suas toxinas (e.x., ingestão de toxinas naturalmente presentes em alimentos, toxinas formadas em alimentos, agentes químicos tóxicos, alergias alimentares) (RIEDEL, 2005).

Desde muito tempo, reconhece-se a magnitude das implicações das Doenças Transmitidas por Alimentos de origem microbiana sobre a condição de saúde das pessoas em todo o mundo. Nas últimas décadas, as doenças de origem microbiana relacionadas com o consumo de alimentos vêm tornando-se uma das principais preocupações de segurança alimentar entre consumidores e agências reguladoras em todo o mundo (WHITE et al., 2002). Estima-se, que aproximadamente 30% dos habitantes de países industrializados sofrem de algum tipo de doença de origem microbiana transmitida por alimentos por ano, e que no século 21 pelo menos 2 milhões de pessoas morreram como consequência de doenças diarréicas em todo o mundo (WHITE et al., 2002; BURT, 2004).

Os sintomas clínicos das DTAs podem variar de moderados quando se observam náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarréia limitada, bem como podem ser severos quando se observam distúrbios do sistema nervoso central e diarréia profusa conduzindo a grande perda de líquido e eletrólitos (WHITE et al., 2002).

As bactérias são os agentes mais importantes na etiologia das DTAs de origem microbiana, sendo responsáveis pelo maior número de surtos e de mortes, seja pela ação como causadores de infecção, intoxicação ou toxinfecção (SOUSA, 2003). A maioria das DTAs possui sua etiologia conhecida, sendo que *S. aureus* é reconhecido como um dos agentes etiológicos mais comuns, e como sendo responsável por surtos associados à ingestão de alimentos *in natura* e processados em todo o mundo (BRAGA et al., 2005).

Vários fatores ambientais, sociais e econômicos como produção de alimentos em larga escala, intenso comércio de alimentos, urbanização, mudanças no comportamento humano, aumentada mobilidade e aumento no número de indivíduos imunodeprimidos, têm contribuído para o surgimento, e em alguns casos para o agravamento da realidade acerca da emergência de microrganismos patogênicos (WOOLHOUSE, 2002).

Frente às conseqüências do crescimento microbiano em alimentos, seja na consideração dos danos decorrente de sua ação deteriorante ou de sua ação como causador de doenças, torna-se essencial à tomada de ações com ênfase na aplicação de processos que conduzam a uma redução do número de microrganismos e/ou diminuição da velocidade de seu crescimento em alimentos (SOUZA et al., 2006).

5.3 Potencialidade antimicrobiana de especiarias.

As especiarias têm sido usadas pelo homem desde os tempos pré-históricos, de forma que determinadas especiarias foram empregadas para embalsamar no antigo Egito. Existe o mito de que as especiarias eram originariamente usadas para disfarçar o sabor rançoso ou menos fresco da carne deteriorada (BEDIN; GUTKOSKI; WIEST, 1999). Na verdade, as especiarias são utilizadas desde que o homem começou a preparar a sua comida, e há tanto tempo quanto a existência da medicina ervaária (WEBB; CRAZE, 2001).

Por um longo período, o homem não teve de preocupar-se com rapidez e praticidade na preparação de suas refeições. Com desprendimento de tempo para confecção de seus pratos culinários, fez-se uso da experimentação de vários sabores, o que conseqüentemente levou a um incremento na utilização das especiarias. À medida que os antigos exploradores do comércio regressavam de suas longínquas viagens e traziam novas especiarias, das quais nunca se tinha ouvido falar, estas se espalhavam rapidamente difundindo seus sabores no paladar das pessoas que as experimentavam (ODY, 2001).

Atualmente, a sociedade tem crescido acostumada às especiarias secas, que podem ser compradas em qualquer supermercado. Possivelmente, graças à introdução da rede

frigorífica em quase todas as casas do Ocidente, já não se faz necessário o uso das especiarias para disfarçar os sabores da comida menos apetitosa. As especiarias merecem muito mais do que servirem de disfarce, elas providenciam uma variedade de sabores e experiências (WEBB; CRAZE, 2001).

Especiarias são conceituadas como vegetais possuidores de substâncias aromáticas ou picantes de origem tropical, usadas para dar sabores e odores aos alimentos, incluindo folhas, caules, flores e germinações, bulbos, rizomas, e outras partes das plantas (BEDIN; GUTKOSKI; WIEST, 1999). Os componentes provedores de sabores existentes nas especiarias consistem de compostos como alcoóis, ésteres, aldeídos, terpenos, fenóis, ácidos orgânicos e muitos outros elementos, que não têm sido totalmente identificados (SAGDIÇ, 2003).

As especiarias por muito tempo têm sido usadas como agentes provedores de caracteres organolépticos característicos aos alimentos aos quais são adicionadas. Porém, nos recentes anos tem surgido um interesse voltado para o emprego destes agentes como promissores compostos antimicrobianos em sistemas de conservação de alimentos, sendo tal fato evidenciado frente à crescente disponibilidade de trabalhos científicos com ênfase em tal assunto (EL-SHAMI et al., 1985; AKGUL; KIVANÇ, 1988; COSENTINO et al., 1999; DORMAN; DEANS, 2000; RISTORI, PEREIRA; GELLI, 2002; RADHAKRISHANAN-SRIDHAR; VELUSAMY-RAJAOPAL, 2003).

As especiarias são reconhecidas como possuidoras de variadas propriedades terapêuticas, entre elas destacam-se as propriedades antibacteriana, anti-espasmódica, diurética, expectorante, laxante, antiasmática, carminativa, estimulante digestivo, anti-flatulento, diurético, emenagogo, expectorante, antipirético, anti-inflamatório, analgésico, laxante, entre outras. Com base nos seu uso na medicina tradicional, várias pesquisas têm observado os seus efeitos fisiológicos benéficos na proteção da integridade de eritrócitos (SALIMATH; SUNDERESH; SRINIVAS, 1986), prevenção da agregação plaquetária (SUBRAMONIYAM; STAYANARAYANA, 1989), ação anti-litogênica (HUSSAIN; CHANDRASEKHARA, 1993), ação hipolipêmica (SRINIVASAN, 2005), além de suas propriedades anti-diabetogênica (WILLAGAMUWA et al., 1998), estimulante da digestão (PLATEL; SRINIVASAN, 2004), antioxidante (MELO; MANCINI FILHO; GUERRA, 2005) e antiinflamatória (REDDY; LOKESH, 1994).

Embora as especiarias sejam bem reconhecidas por suas propriedades medicinais, preservativas e antioxidantes, elas têm sido usadas primariamente com proposta de melhorar o *flavor* de alimentos, mais que de estender sua vida útil (RISTORI; PEREIRA; GELLI, 2002).

Entre as muitas especiarias utilizadas primariamente para flavorizar os alimentos, e que ao mesmo tempo têm reconhecido potencial como antimicrobianos inclui-se alho, cebola, noz-moscada, curry, mostarda, pimenta-preta, tomilho, sálvia, alecrim, menta, pimenta jamaicana, anis, manjeriço, páprica, açafrão, cássia, aipo, endro, orégano, gengibre, coentro, manjerona, cravo, canela e cominho (SAGDIÇ et al., 2002; SAGDIÇ, 2003; VELLUTI et al., 2003).

Billing e Sherman (1998) revisaram o uso de especiarias em vários países, e verificaram que os países que possuem uma maior média de temperatura ambiental, que indica uma maior facilidade de deterioração de alimentos, apresentam uma maior proporção de receitas culinárias contendo especiarias, um maior número total e um maior número de especiarias por preparações culinárias, bem como utilizam um maior número de especiarias com reconhecidas propriedades antimicrobianas. Os autores consideraram diferentes hipóteses para explicar estes dados. Além do uso das especiarias com fim de melhoria da palatabilidade dos alimentos, relata-se que tais produtos poderiam fornecer macronutrientes, mascarar o sabor e o odor dos alimentos deteriorados e aumentariam a transpiração e conseqüente evaporação refrescante. Entretanto, considerou-se que a razão mais provável seria a sua ação na defesa dos alimentos contra microrganismos patógenos e/ou deteriorantes, contribuindo dessa forma para a saúde de pessoas que as apreciam.

Entretanto, a atividade antimicrobiana de especiarias somente poderá ser prontamente reconhecida como fator suficiente para subsidiar sua inclusão em sistemas de conservação de alimentos quando medidas pertinentes forem tomadas para assegurar a sua qualidade sanitária. Estas medidas devem incluir ações para controle de umidade, de promoção de satisfatórias condições sanitárias no processamento, treinamento dos manipuladores, monitoramento da qualidade microbiológica, ou seja, ações de marca sanitária aplicadas desde a colheita até a sua inserção nos alimentos (SOUZA et al., 2006).

Os compostos antimicrobianos existentes naturalmente em temperos são geralmente hidrofóbicos e possuem características de desorganizar ou mesmo romper a membrana microbiana. Em todos os temperos ou condimentos, essa atividade se deve a um componente químico específico ou óleo essencial. Entretanto, para que ocorra a morte celular, as concentrações desses compostos devem ser muito altas e, na prática, a maioria dos compostos antimicrobianos é utilizado em concentrações que podem apenas diminuir a velocidade do crescimento microbiano (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005). Os óleos essenciais (também chamados óleos voláteis) são líquidos aromáticos extraídos de materiais vegetais como flores, folhas, caules, raízes e frutas (MOUREY; CANILLAC, 2002). Constituem-se em complexas

misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas (SIMÕES; SPITZER, 1999), cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres e ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações, nos quais, um composto farmacologicamente ativo é majoritário (FARMACOPEA ITALIANA, 1998).

Ao observar o relato na literatura científica abordando o estudo do potencial antimicrobiano de especiarias nota-se que o orégano (*Origanum vulgare* L., família Lamiaceae) tem sempre apresentado resultados de destaque como agente hábil de inibição de bactérias e fungos contaminantes de alimentos. O gênero *Origanum* é uma erva perene na forma de arbusto e nativa das regiões Euro-Siberiana e Irano-Siberiana, sendo atualmente reconhecida 38 espécies deste gênero no mundo (ALIGIANIS et al., 2001). Espécies pertencentes ao gênero *Origanum* crescem abundantemente em áreas pedregosas e em montanhas rochosas em uma ampla faixa de altitude (0-400m) (GUNER et al., 2000).

Devido sua ampla variedade de características químicas e de aroma, diferentes espécies e biótipos de *Origanum* são amplamente utilizados como insumo na indústria farmacêutica e cosmética, como erva culinária, como flavorizante de alimentos, em bebidas alcoólicas e em perfumaria na obtenção e fragrâncias picantes (SIVROPOULOU et al., 1996; NOVACK et al., 2000; ALIGIANIS et al., 2001). Estudos têm mostrado que espécies de *Origanum* possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, e enfatizam que as suas propriedades biológicas podem variar de acordo com a técnica de cultivo, origem, estágio vegetativo e a estação de coleta do material vegetal (MILOS; MASTELIC; LERKIVIC, 2000). As folhas secas e o óleo essencial de *Origanum vulgare* têm sido usados medicinalmente por vários séculos em diferentes partes do mundo, e seu efeito positivo sobre a saúde humana tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes na erva e conseqüentemente em seus produtos derivados (CERVATO et al., 2000).

5.4 Propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de especiarias.

Os óleos essenciais, entre os variados compostos estudados com vistas a um potencial uso na conservação de alimentos, têm mostrado resultados destacáveis na inibição do crescimento e sobrevivência de diferentes espécies de microrganismos de importância nas variadas áreas da microbiologia (VELLUTI et al., 2003; LANCIOTTI et al., 2004). São originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides (GONÇALVES et al., 2003; SILVA

et al., 2003). Constituem-se em elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e, estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000). Ainda, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 1992).

Furlan (1998) alega que o valor condimentar de uma planta está quase sempre associado ao teor de óleos essenciais, que são compostos químicos gerados durante o desenvolvimento do vegetal. Óleos essenciais de plantas apresentam uma atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias incluindo espécies resistentes a antibióticos sintéticos clássicos (CARSON et al., 1995). Os óleos essenciais podem apresentar ação tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas e ainda frente a leveduras e fungos filamentosos (PRASHAR et al., 2003).

Estudos mostram que uma maior ou menor efetividade antimicrobiana das especiarias apresenta-se dependente do tipo de especiaria, da sua concentração, do tipo e concentração do microrganismo alvo e da composição do substrato (MARINO; BERSANI; COMI, 2001; OZCAN; ERKMEN, 2001). Muitos relatos científicos descrevem o efeito inibitório de especiarias sobre diferentes microrganismos, embora, consideráveis variações de resistência de diferentes microrganismos para uma dada especiaria e de um mesmo microrganismo para diferentes especiarias tenham sido observadas (AKGUL; KIVANÇ, 1988; PROCTOR; DAVIS, 2000).

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropanos são as classes de compostos mais comumente encontradas. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos, bem como os diterpenos, constituintes minoritários dos óleos essenciais (CASTRO et al., 2004).

A obtenção de óleos pode se dar por remoção física (separação, extração ou concentração). Essa obtenção em plantas geralmente se faz através de hidrodestilação por arraste com vapor d'água. A extração por solvente também é muito usada para obtenção de aromatizantes e óleos essenciais, de modo que os principais tipos de solventes aplicados são água, solventes orgânicos ou dióxido de carbono supercrítico (FELLOWS, 2006).

Os óleos essenciais apresentam duas principais características como agentes antimicrobianos: i) sua origem natural, o que significa mais segurança para os consumidores e para o meio ambiente; e ii) são considerados como possuidores de baixo risco de

desenvolvimento de resistência microbiana. A segunda característica citada toma como base o fato de que os óleos essenciais são compostos por uma grande variedade de constituintes, os quais, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, tornando, desta forma, mais difícil uma possível adaptação dos microrganismos frente a sua ação (DAFERERA et al., 2003). Na Figura 1 são mostrados as estrutura moleculares de alguns constituintes presentes em óleos essenciais de especiarias.

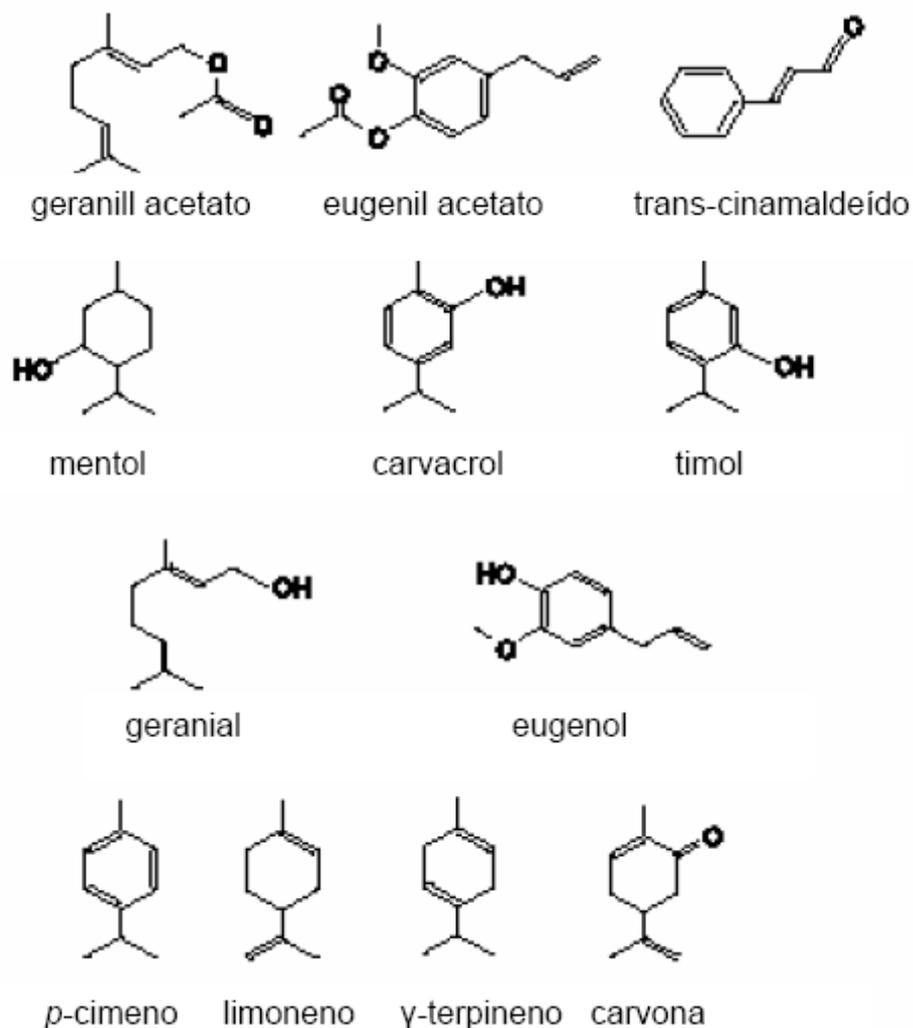


Figura 1 - Estrutura molecular de alguns constituintes presentes em óleos essenciais de especiarias.

Avalia-se a produção brasileira de óleos essenciais em 45 milhões de dólares, o que corresponde a 13,1% da produção mundial (RADÜNZ et al., 2001). O maior problema ao desenvolvimento de agroindústria produtora de óleos essenciais é a concorrência com

similares sintéticos. Atualmente, a indústria alimentícia a qual mais necessita deste tipo de produto, tem substituído os produtos sintéticos por naturais, em função das exigências atuais dos mercados (VARLET, 1993).

Entre os diversos óleos essenciais que apresentam potencialidade antimicrobiana, o óleo essencial obtido da espécie vegetal *O. vulgare* tem mostrado destacáveis resultados na inibição de diferentes microrganismos (DUARTE et al., 2005; SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2007). Devido sua ampla variedade de características químicas e de aroma, *O. vulgare* tem sido amplamente utilizado como insumo na indústria farmacêutica e cosmética, como erva culinária, como flavorizante de alimentos, em bebidas alcoólicas e em perfumaria na obtenção de fragrâncias picantes (NOVAK et al., 2000).

O óleo essencial de orégano apresenta uma riqueza em compostos fenólicos, os quais são acreditados para serem responsáveis por sua intensa atividade antimicrobiana (BAYDAR et al., 2004; CHUN et al., 2005). Carvacrol e timol, citados como componentes majoritários do óleo essencial de *O. vulgare*, tem recebido uma ênfase na pesquisa de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, de modo que a presença destes componentes, de forma isolada ou em combinação, é reconhecida como marcador de potencial antimicrobiano (FARIAS–ALVES; SICCHIROL-LAVRADOS; PEREIRA-DE-MARTINIS, 2003). Carvacrol, um composto fenólico, apresenta-se como o componente majoritário do óleo essencial de orégano (VALERO; SALMENRÓN, 2003) e, possivelmente, pode ser o principal responsável pela destacável atividade antimicrobiana de tal produto. Estes componentes apresentam capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática microbiana causando uma considerável perda de ATP citoplasmático. Este aumento de permeabilidade pode está relacionado à sua capacidade de interagir com a membrana citoplasmática, onde pode se dissolver na bicamada lipídica alinhando-se entre as cadeias de ácidos graxos. Tal distorção da estrutura física poderia causar a expansão e desestabilização da membrana citoplasmática, aumentando sua fluidez e resultando no incremento de sua permeabilidade passiva (ULTEE; SMID, 2001). Acredita-se, que o potencial antimicrobiano de compostos fenólicos, como carvacrol e timol, se apresente intimamente relacionado à presença de um grupo hidroxil (OH) no anel fenólico, particularidade que lhes confere um alto poder reativo (DORMAN; DEANS, 2000).

Outtara et al. (1997) analisaram a atividade antibacteriana de ácidos graxos selecionados e de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias deteriorantes de carnes, sendo que nenhum ácido graxo apresentou considerável atividade antibacteriana. Por outro lado, *Brochothrix thermosphacta* e *Serratia liquefaciens* tiveram seu crescimento inibido pelo

óleo essencial de canela, cravo, alho e alecrim (1/100 v/v); *Carnobacterium piscicola* foi inibido pelo óleo essencial de canela, cravo e alecrim (1/100 v/v); *Lactobacillus sake* foi inibido pelo óleo essencial de canela, cravo, pimenta preta e alecrim (1/100 v/v); *L. curvatus* foi inibido pelo óleo essencial de pimenta preta (1/100 v/v).

Em estudo feito por Hoffmann et al. (1999), onde se determinou a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de canela, cravo, gengibre e menta em diferentes concentrações (10,0; 1,0 e 0,1%), sobre 21 microrganismos (7 leveduras e 14 bactérias), foi verificado uma maior atividade antimicrobiana com canela e menta, nas concentrações de 10,0 e 1,0%. O óleo essencial de cravo, na concentração de 10,0%, também inibiu completamente o crescimento de todos os microrganismos testados.

Basílico e Basílico (1999) verificaram a eficiência antifúngica do óleo essencial de orégano (100 ppm) em inibir o crescimento micelial de *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina A por tal fungo.

Menon e Garg (2001) avaliaram o efeito inibitório do óleo essencial de cravo na concentração de 0,5 e 1,0% (v/p) sobre *L. monocytogenes* em carne e queijo armazenados a 7 e 30°C, e observaram que ambas as concentrações foram capazes de provocar significativo efeito redutor da população de *L. monocytogenes* nos substratos ensaiados. Hao; Bracket e Doyle (1998) relataram efeito inibitório de eugenol, princípio ativo do óleo essencial de cravo, sobre *L. monocytogenes* em carne bovina e de ave cozidas e armazenadas a 5 e 15 °C.

Elgayyar et al. (2001) analisando o poder antimicrobiano de óleos essenciais de algumas plantas, verificaram que o óleo essencial de anis apresentou alta capacidade inibitória sobre *A. niger*, *Geotrichum* e *Rhodotorula*, embora não tenha sido ativo sobre bactérias.

Juglal et al. (2002) estudaram a efetividade de nove óleos essenciais para controlar o crescimento de fungos produtores de micotoxinas e notaram que cravo, canela e orégano foram capazes de prevenir o crescimento de *A. parasiticus* e *F. moniliforme*, enquanto que o cravo (moído e óleo essencial) marcadamente reduziu a síntese de micotoxinas em grão infectados. Velluti et al. (2003) observaram significativo efeito inibitório do óleo essencial de canela, orégano e cravo sobre o crescimento de *Fusarium proliferatum* e *F. verticillioides*, bem como sobre a produção de fumonisina B₁ por tais cepas em grãos de milho armazenados em diferentes atividades de água e temperaturas.

Estudo realizado por Benkeblia (2004) observou atividade inibitória do óleo essencial de cebola (amarela e vermelha) nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 500 µL/mL sobre *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* e *Penicillium cyclopium*.

Souza; Silva e Souza (2004) avaliaram óleos essenciais de condimentos (alho, canela, cravo da Índia, tomilho) sobre o desenvolvimento micelial de fungos (*Rhizopus* spp.; *Penicillium* spp.; *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*) associados a produtos de panificação e verificaram que o óleo essencial da canela inibiu completamente o desenvolvimento dos fungos, já os de tomilho e alho tiveram o mesmo efeito em concentrações mais elevadas. O cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp. e *Eurotium repens* com a concentração de 600 mg/mL e do fungo *Penicillium* spp. com a de 800 mg/mL.

Viegas et al. (2005) em seu estudo “Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*”, avaliou oito óleos essenciais vegetais e verificou que a maior inibição do desenvolvimento micelial de *A. flavus* foi obtida com o emprego dos óleos essenciais de casca de canela e de bulbilho de alho.

Recentemente, Pereira et al. (2006) estudou a inibição do desenvolvimento dos fungos: *Fusarium* sp.; *Aspergillus* (*A. ochraceus*; *A. flavus* e *A. niger*) através da utilização de óleos essenciais de alguns condimentos, dentre esses o orégano, onde se observou que a partir de 500 mg/ml todos os fungos estudados tiveram o desenvolvimento significativamente inibido, com exceção do fungo *Aspergillus niger*.

Em adição ao estudo da atividade antimicrobiana de especiarias e seus extratos e óleos essenciais, a efetividade de seus constituintes químicos na inibição de vários microrganismos tem também merecido investigação com vistas a um melhor entendimento acerca dos alvos celulares das moléculas encontradas nas especiarias (KARATZAS et al., 2000). Helander et al. (1998) relataram que carvacrol e timol diminuíram o conteúdo de ATP intracelular em células de *E. coli*, enquanto simultaneamente o conteúdo de ATP extracelular foi aumentado. Este fenômeno foi considerado como indicador da ação de ruptura de membrana citoplasmática destes componentes.

5.5 Fitocompostos Carvacrol e Timol

Tem se constatado que a atividade antimicrobiana apresentada pelos óleos essenciais em especial *O. vulgare* se deve especialmente à presença de grupos fenólicos (BEN ARFA et al., 2006; MOREIRA, 2005). Segundo Sivropoulou (1996), o conteúdo fenólico existente neste óleo essencial compreende desde traços até 95 % da sua composição, podendo variar entre amostras de uma mesma espécie. Dentre os componentes fenólicos, o carvacrol e o

timol são os que desempenham maior efeito antimicrobiano, os quais exercem adicionalmente funções antioxidantes (HOLLEY; PATEL, 2005; ŞAHIN et al., 2004).

Carvacrol e timol, citados como componentes majoritários do óleo essencial de *O. vulgare*, tem recebido uma ênfase na pesquisa de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, de modo que a presença destes fitoconstituintes, de forma isolada ou em combinação, é reconhecida como marcador de potencial antimicrobiano (FARIAS–ALVES; SICCHIROL-LAVRADOS; PEREIRA-DE-MARTINIS, 2003).

O Timol também é conhecido como 2-isopropil-5-metilfenol, é um derivado do fenol monoterpreno cimeno, $C_{10}H_{14}O$, isomérico com carvacrol, encontrado no óleo de orégano e tomilho, é extraído como uma substância cristalina branca de um odor agradável e aromática com fortes propriedades anti-sépticas. Timol é apenas ligeiramente solúvel em água com pH neutro, mas é extremamente solúvel em alcoóis e outros solventes orgânicos. É também fortemente alcalino solúvel em soluções aquosas devido à desprotonação do fenol. Também chamado de "Isopropil-m-cresol" e "cimeno hidroxil" (THE BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009)

Foi descoberto por Caspar Neumann em 1719 e sintetizada em forma pura, no ano 1842 por Von M. Lallemand caracterizados através de análise química elementar. Usando isto, ele foi capaz de descobrir a proporção correta de carbono, hidrogênio e oxigênio que compõem moléculas de timol. Friedrich Ferdinand Runge também estudou a química da substância. Alain Perrin M. Thozet e publicado pela primeira vez a análise da estrutura de cristal com a determinação exata dos átomos estruturais (PRIESTLEY e al., 2003) (Figura 2)



Figura 2. Representação esquemática de uma molécula de Timol.

Timol foi utilizado com sucesso para controle de ácaros e evitando a fermentação e o crescimento de fungos em colônias de abelhas. A utilização em menor escala está na encadernação: livros com os danos do molde podem ser selados em sacos com cristais de

timol para matar os esporos de fungos. Timol foi utilizado em soluções de álcool e em pó para o tratamento de infecções por *Tinea pedis* (micose). Timol foi utilizado para tratar infecções por ancilostomídeos (FERREL, 2005).

Recentes pesquisas médicas sobre a ratos conclui que "o extrato de Tomilho teve efeitos relaxantes sobre órgãos que possuem receptores β_2 (útero e traquéia)" (WIENKÖTTER et al., 2007). Em um relatório de 1994 divulgado pelo cigarro cinco empresas de topo, o timol foi listado como um dos 599 aditivos aos cigarros. Diz-se a ser adicionado para melhorar o sabor dos cigarros, mas, como mencionado acima, ele relaxa a traquéia (WIENKÖTTER et al., 2007). Segundo Priestley et al. (2003), o timol tem atividade GABAergic, através de um mecanismo de ação semelhante ao anestésico propofol (2,6-diisopropilfenol).

Timol é perigoso para o ambiente e tóxico para os organismos aquáticos e pode causar efeitos negativos a longo prazo no ambiente aquático. Ele também está sendo investigado como um agente mutagênico. A teoria do efeito mutagênico é ainda apoiada pelo desempenho do fenol relacionado (GOODNER et al., 2006).

Carvacrol, ou cymophenol, $C_6H_3CH_3$ (OH) (C_3H_7), é um fenol da classe dos monoterpenóides. Ele tem uma característica picante, cheiro morno de orégano (ULTEE, 2000) (Figura 3). O carvacrol está presente no óleo essencial de *Origanum vulgare*, óleo de tomilho, e no óleo obtido da bergamota selvagem. O óleo essencial de Tomilho contém entre 5% e 75% de carvacrol, enquanto. A espécie *Origanum majorana* e *Dittany de Creta* são ricos em carvacrol, 50% e 60-80% respectivamente. (DE VINCENZI, 2004)



Figura 3. Representação esquemática de uma molécula de Carvacrol.

O Carvacrol inibiu o crescimento de várias cepas de bactérias, por exemplo, *Escherichia coli* (DU et al., 2008) e *Bacillus cereus*. Sua baixa toxicidade, juntamente com o seu sabor e cheiro agradáveis sugere seu uso como aditivo alimentar para evitar a

contaminação bacteriana (ULTEE; SMID, 2001). Em *Pseudomonas aeruginosa*, ele provocou danos à membrana celular dessas bactérias e, ao contrário de outros terpenos, inibe a proliferação deste germe (COX; MARKHAM, 2007). A causa das propriedades antimicrobianas, que se acredita ser a ruptura da membrana das bactérias (DI PASQUA et al., 2007; CRISTANI et al., 2007) É um potente ativador dos canais de íon humanos receptor transiente V3 potencial (TRPV3) e A1 (TRPA1). Aplicação do carvacrol sobre a língua humana, bem como a ativação de TRPV3, provoca uma sensação de calor. Em carvacrol disso também ativa, mas rapidamente o dessensibiliza TRPA1 receptor dor explicando a sua pungência (XU et al., 2006)

Em ratos o carvacrol é rapidamente metabolizado e excretado. A principal via metabólica é a esterificação do grupo fenólico com ácido sulfúrico e ácido glucurônico. A via de menor importância é a oxidação do grupo metil terminal para alcoóis primários. Após 24 horas apenas quantidades muito pequenas de carvacrol ou seus metabólitos podem ser encontrados na urina, indicando uma excreção praticamente concluída no prazo de um dia (AUSTGULEN et al., 2004)

O Carvacrol pode ser sinteticamente elaborado pela fusão do ácido sulfônico cimol com potassa cáustica; pela ação do ácido nitroso em 1-metil-2-amino-4-propil benzeno; e pelo aquecimento prolongado de cinco partes de cânfora com uma parte do iodo; ou por aquecimento com ácido fosfórico carvol glacial ou realizando uma desidrogenação de carvona por um catalisador Pd C /. É extraído do óleo de Origanum por meio de uma solução de cloreto de potássio 50%. É um óleo grosso que fixa em 20 °C a uma massa de cristais de ponto de fusão 0 °C, e ponto de ebulição 236-237 °C. Oxidação com cloreto férrico converte em dicarvacrol, Pentacloreto de fósforo, enquanto transforma em chlorcymol (ULTEE et al., 2000).

Estes componentes apresentam capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática microbiana causando uma considerável perda de ATP citoplasmático. Este aumento de permeabilidade pode está relacionado à sua capacidade de interagir com a membrana citoplasmática, onde pode se dissolver na bicamada lipídica alinhando-se entre as cadeias de ácidos graxos. Tal distorção da estrutura física poderia causar a expansão e desestabilização da membrana citoplasmática, aumentando sua fluidez e resultando no incremento de sua permeabilidade passiva (ULTEE; SMID, 2001) (Figura 4).

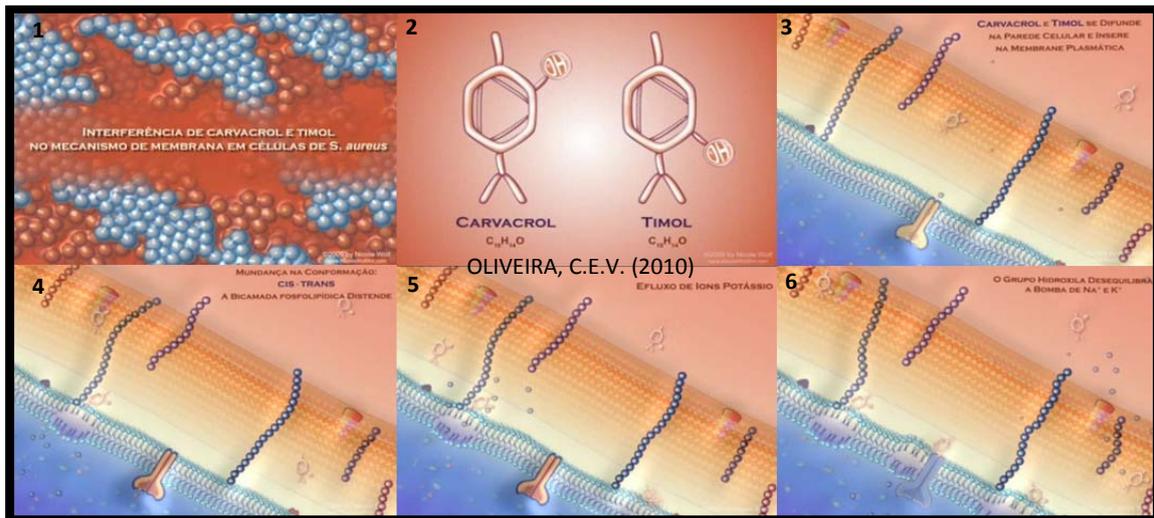


Figura 4. Esquema demonstrando o mecanismo de ação na membrana citoplasmática de células de *Staphylococcus aureus*.

Acredita-se, que o potencial antimicrobiano de compostos fenólicos, como carvacrol e timol, se apresente intimamente relacionado à presença de um grupo hidroxila (OH) no anel fenólico, particularidade que lhes confere um alto poder reativo (ULTEE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002). Em cepas de *S. aureus*, estes compostos inibem a atividade da ATPase ligada à membrana citoplasmática (CEYLAN; FUNG, 2004)

Os compostos fenólicos são capazes de dissolverem-se na membrana microbiana, e, desta forma, penetrarem dentro da célula onde podem interagir com mecanismos essenciais para o metabolismo microbiano (MARINO; BERSANI; COMI, 2001). Perturbação da membrana citoplasmática, ruptura do fluxo de elétrons, perturbação do transporte ativo, inibição de atividade de enzimas, inativação da bomba de sódio e potássio e coagulação do conteúdo citoplasmático são alguns mecanismos envolvidos na promoção do efeito antimicrobiano do carvacrol e do timol. Acredita-se, que nem todos estes mecanismos ocorram de forma separada, de modo que alguns deles, possivelmente, possam ser ativados como consequência de outros mecanismos previamente desencadeados (COX et al., 2001).

Além da inibição do crescimento das células bacterianas vegetativas, torna-se interessante a supressão da produção de toxinas microbianas, já que elas são capazes de desencadear grandes surtos alimentares. É sabido que a produção e excreção de toxinas é um processo ativo e a presença do carvacrol nas células bacterianas pode provocar insuficiência de ATP para secretá-las, devido ao fato das células utilizarem todas as energias disponíveis para sustentar sua viabilidade (ULTEE; SMID, 2001).

Embora algumas pesquisas tenham demonstrado uma interessante atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* (DUARTE et al., 2005; SOUZA et al., 2006;

SOUZA et al., 2007; BARROS, 2009), há uma escassez de estudos de seus fitoconstituintes majoritários (carvacrol e timol), que enfatizam a atividade antimicrobiana e a interferência nos parâmetros fisiológico-bioquímicos de cepas microbianas patogênicas e/ou deteriorantes (NOSTRO et al., 2002; D'ANTUONO; GALLETI; BOCHINNI, 2000; BURT, 2004).

5.6 Uso de ácidos orgânicos como conservantes de alimentos

Conceitualmente, conservador químico é toda substância naturalmente presente ou adicionada intencionalmente a um alimento com o objetivo principal de prevenir ou retardar as alterações provocadas pela ação de microrganismos deteriorantes, e de agir controlando a presença de patógenos, estando excluídos os sais comuns, açúcares, vinagres, condimentos ou seus óleos essenciais e as substâncias originadas da defumação (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Ao longo da história, os ácidos orgânicos têm sido empregados como aditivos e preservativos alimentares, prevenindo a deterioração alimentar e prolongando a vida de prateleira de produtos perecíveis (RICKE, 2003). Nos últimos anos, o interesse da indústria alimentícia pelo uso destes compostos antimicrobianos reside do fato de estarem naturalmente presentes como constituintes de alimentos ou poderem ser adicionados aos produtos através de formulações alimentares (NAZER et al., 2005).

Lin; Labble e Shetty (2005) referem que os mecanismos utilizados para acidificação de alimentos, seja pelo emprego de ácidos orgânicos de cadeia curta, processos fermentativos ou adição deliberada destes ácidos, constituem um bem difundido e importante meio para o controle de patógenos alimentares aplicáveis a um grande número de produtos alimentícios.

Os ácidos orgânicos fracos, a exemplo do ácido acético, láctico, cítrico, benzóico e sórbico, fazem parte do grupo de aditivos químicos geralmente reconhecidos como seguros – GRAS (JAY, 2005). Alguns destes ácidos têm ocorrência natural em alimentos e são comumente utilizados como preservativos em sistemas de conservação para inibir o crescimento de bactérias e fungos (FORSYTHE, 2002).

Alguns dos principais ácidos orgânicos de uso em alimentos, suas faixas de concentração para inibição microbiana e conservação alimentar, ingestão diária aceitável (IDA) e tipos de alimento onde são empregados estão descritos no Quadro 1.

A eficiência de um conservante químico leva em consideração alguns aspectos que incluem, de acordo com Franco; Landgraf (2005):

- (a) tempo e temperatura de armazenamento do alimento;
- (b) tipo de microrganismo contaminante;
- (c) características intrínsecas do substrato alimentar (valor de pH, a_w , composição química, dentre outros) e, principalmente;
- (d) tipo e concentração do conservante utilizado no alimento, o qual pode exercer um efeito bactericida a uma dada concentração, bacteriostático em baixas concentrações ou inoperante quando muito diluído (FRAZIER; WESTHOFF, 1996).

Russell (1991) acrescenta que outros aspectos podem também determinar o grau de resposta de um determinado agente conservador. Estes incluem o pH do ambiente, a temperatura da solução e a presença de matéria orgânica. Desta forma, a potencialidade dos efeitos de um agente antimicrobiano de natureza química é diretamente influenciada pelo pH do meio, grau de dissociação e ação específica do ácido empregado (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Considerando tais fatores, a ação antimicrobiana primária e esperada dos ácidos orgânicos sobre as células dos microrganismos fundamenta-se na relação dose-efeito com conseqüente ocorrência de fenômenos que agem sobre o DNA, síntese protéica, atividade enzimática, membrana celular, parede celular e mecanismos de transporte de nutrientes (LÜCK; JAGER, 2000; RICKE, 2003).

Quadro 1. Aspectos gerais de uso de alguns ácidos orgânicos (acidulantes e lipofílicos) com ação antimicrobiana utilizados como conservadores alimentares.

Ácidos	Concentração em alimentos (% ou g)	Ingestão Diária Aceitável - IDA (mg/kg) **	Alimentos empregados	Referências
Acético	0,25% - 9,0%	Ilimitada	Maioneses, temperos, cremes para salada, bebidas, produtos à base de carnes e vegetais	Forsythe (2002); Frazier; Westhoff (1996); Lück; Jager (2000)
Láctico	> 0,5%	Ilimitada	Maioneses, temperos, cremes para salada, bebidas, produtos à base de carnes e vegetais	Forsythe (2002); Lück; Jager (2000)
Benzóico	0,1% ou	0 - 5	Margarina, extrato de tomate, temperos em conserva,	Franco; Landgraf (2005);

	*0,005 – 0,3g / 100g ou mL		refrigerantes, molhos	Jay (2005); Lück; Jager (2000)
Sórbico	0,2% ou *0,01 – 0,20g / 100g ou mL	0 - 25	Queijos duros, molhos para salada, geléias, bolos	
Propiônico	0,32% ou *0,20 – 0,40g / 100g ou mL	Ilimitada	Produtos de panificação (pão, bolo), pickles, queijos, chocolates	

*Valores máximos permitidos pela legislação brasileira

**Quantidade de um aditivo medido em mg / Kg de peso corpóreo, que pode ser ingerido diariamente sem trazer complicações ao longo de toda a vida.

Os efeitos da inibição microbiana são mais efetivos em baixos níveis de pH (< 4,5), característica esta comum à maioria dos conservantes alimentares. Nestas condições, as moléculas do ácido em seu estado não-dissociado são livremente permeáveis à membrana plasmática e capazes de penetrar no citoplasma, onde se dissociam liberando prótons (íons de hidrogênio) e ânions que se acumulam e difundem-se no interior da célula forçando-a a desviar energia (ATP) para expulsar os prótons acumulados e manter a homeostase do pH intracelular (FORSYTHE, 2002).

Como conseqüência, diversos efeitos ocorrem sobre a célula microbiana causando restrição do seu crescimento. Estes incluem: toxicidade pelo acúmulo de ânions, interferência no transporte de nutrientes (especialmente aminoácidos), danos à membrana citoplasmática resultando em extrusão e ruptura da permeabilidade da membrana externa, influência na síntese de macromoléculas por inibição de reações metabólicas essenciais e estresse sobre a homeostase do pH intracelular (RICKE, 2003).

Ricke (2003) relata que nos últimos trinta anos alguns ácidos orgânicos, isoladamente ou em combinação, têm sido investigados pelo seu potencial de atividade bactericida em alimentos e ingredientes contaminados com patógenos alimentares. Dentre este grupo de ácidos, o ácido láctico (AL) e o ácido acético (AA) estão entre os mais utilizados como conservantes alimentares (JAY, 2005).

Na indústria de alimentos estes ácidos são empregados como acidulantes para inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RUSSELL, 1991) ou são adicionados à água de lavagem em concentrações de 2 a 5% (JAY, 2005), e aplicados como sprays às superfícies de carnes e carcaças de animais durante o seu processamento e abate para sanitização destes produtos (RICKE, 2003).

Vasconcelos et al. (2002) ressaltam que os resultados práticos esperados do uso de ácidos orgânicos fracos, como o láctico e acético, na conservação de alimentos, em especial de produtos cárneos, estão relacionados ao aumento da vida de prateleira, menores riscos de DTA (pela redução da quantidade de patógenos nestes substratos alimentares) e manutenção da qualidade sensorial.

Enquanto agente conservador de natureza química, o AL se caracteriza como um composto orgânico de fórmula molecular $C_3H_6O_3$ e estrutural $CH_3 - CH(OH) - COOH$ (Figura 3), apresentando aspecto líquido e coloração variando entre incolor a ligeiramente amarelado com solubilidade ilimitada em água, sendo reconhecido como um dos mais antigos conservantes em uso (LÜCK; JAGER, 2000).

Pode também ocorrer naturalmente em alguns alimentos como produto do metabolismo fermentativo das bactérias ácido-lácticas presentes nestes substratos, os quais passam a exercer efeitos de inibição do crescimento sobre vários microrganismos. Segundo Lück e Jager (2000), sua atividade antimicrobiana é relativamente suave, só apresentando efeitos de conservação em concentrações superiores a 0,5%, principalmente contra bactérias anaeróbias, como consequência da redução do pH do meio quando em concentrações adequadas.

Alves et al. (2003) corroboram reportando que em produtos com acidez entre 0,5 e 0,7%, expressa em ácido láctico, verifica-se um efeito inibitório sobre crescimento de *S. aureus*, bem como uma redução de suas contagens.

Considerando que cepas de *S. aureus* são reconhecidas como potenciais patógenos contaminantes de diferentes tipos de alimentos, o emprego deste tipo de ácido com conseqüente alteração do pH do meio cria um ambiente desfavorável ao crescimento deste microrganismo. Desta forma, pelos seus efeitos e por ser um agente antimicrobiano reconhecido como seguro (GRAS), tem sido usado para descontaminação de carnes e produtos cárneos (NAVEENA et al., 2006) e recomendado nos últimos anos como conservante destes produtos, incluindo embutidos (SHELEF, 1994 apud LÜCK; JAGER, 2000).

Quanto ao ácido acético (AA), outro ácido orgânico amplamente utilizado como agente de conservação em alimentos, tem sido reconhecido e utilizado há milênios como aromatizante natural e acidulante. Procedimentos como a imersão de carnes, pescados e vegetais em soluções contendo vinagre, uma das formas de sua utilização, estão entre os métodos de conservação mais antigos já praticados (LÜCK; JAGER, 2000).

Quimicamente, é um composto de fórmula molecular $C_2H_4O_2$ e estrutural CH_3COOH (Figura 5), sendo líquido transparente e incolor na sua forma pura, e de alta solubilidade em água, podendo ser obtido por processo biológico fermentativo ou por meios sintéticos como a oxidação do acetaldeído. Lück e Jager (2000) referem que seu emprego como conservante alimentar pode ocorrer na forma de vinagre (5 a 10%) ou solução aquosa sintética de 25 a 80%, tendo seu espectro de ação contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Semelhante ao AL, para que o AA exerça sua atividade de conservação, são requeridas concentrações adequadas para promover uma redução do pH no alimento. Simão (1985) refere que em concentrações que resultam numa redução do pH no alimento de 5,0 e 4,9, verifica-se respectivamente uma ação antimicrobiana inibitória e letal sobre os *S. aureus*. Lück e Jager (2000) corroboram afirmando que somente em concentrações acima de 0,5% verifica-se uma ação antimicrobiana do AL pela penetração na parede celular e desnaturação das proteínas intracelulares da célula microbiana.

Por apresentarem forte ação antimicrobiana somente em altas concentrações, alguns autores têm sugerido sua combinação com outros métodos de conservação como a pasteurização, ou o sal comum e/ou conservantes mais fortes como os ácidos sórbico e benzóico (LÜCK; JAGER, 2000), com o objetivo de reduzir sua concentração, potencializar uma possível ação sinérgica entre os componentes e minimizar os efeitos sobre as características sensoriais dos alimentos a serem conservados.



Figura 5 – Estrutura química clássica e tridimensional do ácido láctico (A) e acético (B).

5.7 *Staphylococcus aureus*

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, que podem levar ao desenvolvimento de doenças, afetando a saúde humana, desencadeada por microrganismos patogênicos ou suas toxinas (PASSOS; KUAYE, 1996a). Ressalta-se que todos os alimentos devem ser objetos de exames microscópicos e microbiológicos. Estes

exames refletem as condições higiênicas que envolvem a produção, armazenamento, transporte e manuseio para elucidar a ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos. Os problemas encontrados podem ser minimizados através de sistemático controle de qualidade e programas de educação sanitária (LIVERA et al., 1996; TAVARES; LOBANCO; SAKUMA, 1996).

Certamente, um dos microorganismos mais amplamente estudados seja *Staphylococcus aureus*. Isso se deve ao fato que essa bactéria faz parte da microbiota e, portanto, sempre esteve envolvida em diversos processos infecciosos, atingindo homens e animais desde suas origens. Como patógeno humano, sempre foi responsável por grande morbidade e mortalidade. Outro aspecto que desperta interesse na comunidade científica é a capacidade deste microorganismo de desenvolver resistência aos antimicrobianos. Estes microorganismos são ubiqüitários e podem ser comumente encontrados na pele, glândulas da pele e membranas mucosas de aves e mamíferos, em geral relacionando-se simbioticamente com seus hospedeiros (BRAOIOS, 2005).

O gênero *Staphylococcus*, pertencente à família *Micrococcaceae*, é formado por cerca de 37 espécies, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Apresenta forma esférica (cocos) Gram-positivas, medindo cerca de 0,5 – 1,5 µm de diâmetro, as quais podem se apresentar isoladas, aos pares, em cadeias curtas, ou grupos em forma de cachos de irregulares. Os membros dessa espécie são imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos, porém se desenvolvem melhor em atmosfera aeróbia. Suas colônias, em meio sólido, são usualmente lisas e algumas convexas com a borda contínua. Algumas colônias podem apresentar pigmentação amarela, ou amarelo alaranjado, que se torna mais pronunciado após incubação à temperatura ambiente, enquanto outras colônias podem ser esbranquiçadas ou acinzentadas. São produtores de enzimas catalases, tolerantes a altas concentrações de NaCl e ao ressecamento e não são capazes de produzir esporos (PRADO-PALOS, 2006; BRAOIOS, 2005).

Tradicionalmente os estafilococos são divididos em dois grupos de acordo com a capacidade de produção da enzima coagulase: os estafilococos coagulase-positivo e estafilococos coagulase-negativo. Pertence ao primeiro grupo o *S. aureus*, que é considerado um dos principais patógenos humanos. Essa bactéria é responsável por processos infecciosos que incluem desde infecções cutâneas relativamente benignas e doenças toxinogênicas até infecções sistêmicas potencialmente fatais. Como exemplo de suas enfermidades pode-se citar: infecções de pele e tecidos moles (foliculites, piodermites, impetigo, furúnculos e abscessos), doenças toxinogênicas (síndrome estafilocócica da pele escaldada ou doença de

Ritter, síndrome estafilocócica do choque tóxico, intoxicações alimentares), pneumonias, bacteremias, osteomielites, endocardites, artrites e meningites de reconhecida morbimortalidade (KLOOS; BANNERMAN, 1994; LOWY, 2003).

Os estafilococos possuem diversos fatores de virulência que, supostamente, contribuem para sua capacidade de colonizar e, posteriormente, invadir tecidos. Alguns isolados de *S. aureus* produzem um exopolissacarídeo conhecido como cápsula, que pode impedir a fagocitose pelos leucócitos polimorfonucleares, auxiliando sua perpetuação em espécimes clínicos (PAUL-SATYASEELA et al., 2004). A proteína A, proteína peculiar da parede celular, tem a capacidade de unir-se à região Fc da molécula da imunoglobulina G (IgG), interferindo na opsonização pelos leucócitos polimorfonucleares, ativando o sistema complemento e estimulando reações de hipersensibilidade. Glicopeptídeos e ácidos teicóicos, componentes da parede celular estafilocócica, auxiliam na aderência às superfícies mucosas do hospedeiro, ativam o sistema complemento, inibem a quimiotaxia de leucócitos e estimulam a produção de anticorpos (COHEN, 1986; SALGADO; PIGNATARI; BELLINATI-PIRES, 2004).

Fermentação do manitol, endonuclease termoestável e teste de desoxirribonuclease são provas confirmatórias adicionais utilizadas para a caracterização do patógeno. Comparativamente, são microrganismos que se multiplicam sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade, o que explica, parcialmente, sua sobrevivência nas secreções nasais e na pele (KLOOS; BANNERMAN, 1995).

S. aureus apresenta-se largamente distribuído na natureza, sendo transmitido aos alimentos pelos manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos. De uma forma geral, pode-se esperar a presença de *S. aureus*, mesmo em pequenas quantidades, em quase todos os alimentos de origem animal ou naqueles diretamente manipulados, a não ser que tais alimentos tenham sido submetidos a prévios tratamentos térmicos. No homem, as espécies de *Staphylococcus* podem estar presentes no conduto nasal, nos olhos, na garganta, no trato gastrointestinal e na superfície da pele, onde é mais freqüente nas mãos, braços, rosto e feridas. A partir dessas localizações, o microrganismo pode contaminar o alimento direta ou indiretamente (JAY, 2005).

A intoxicação alimentar estafilocócica faz parte do grupo de doenças de risco III, no qual inclui as enfermidades “*de perigo moderado, usualmente de curta duração e sem ameaça de morte ou seqüelas, com sintomas autolimitados, mas que causam severo desconforto*”, conforme dispõe a classificação da *International Commission on Microbiological Specification for Food* - ICMSF (SILVA et al., 2007).

A intoxicação alimentar provocada por este microrganismo é devido à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento e representando um risco para saúde pública. A enterotoxina estafilocócica é termoestável e está presente no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar. Sendo o agente responsável por, aproximadamente, 45% das toxinfecções no mundo, vários trabalhos referem os manipuladores como os maiores responsáveis pela sua transmissão (ALCARÃZ et al., 1997; BRASIL, 1992; FRANCO; LANDGRAF, 1996; MIMS et al., 1995; PASSOS; KUAYE, 1996a).

A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada por náuseas, vômito, dores abdominais e diarreia, e por um curto período de incubação, de 1 a 6 horas após a ingestão do alimento responsável (MEEHAN et al., 1992; PASSOS; KUAYE, 1996b). O período de incubação e a severidade dos sintomas dependem da quantidade de enterotoxina ingerida e da susceptibilidade do indivíduo. Níveis dessas toxinas variando de 0,01 a 0,4 µg por grama do alimento são suficientes para provocar a intoxicação, afetando indivíduos mais sensíveis (ORDEN et al. 1992).

Sandel e McKillip (2004) acrescentam que a contaminação alimentar pós-processamento por *S. aureus* representa um risco significativo para a saúde, visto que nos alimentos industrializados os microrganismos que normalmente competem com este patógeno são eliminados pelos métodos térmicos de controle empregados, criando um ambiente favorável ao seu crescimento nestes produtos. Adicionalmente, a existência de algumas cepas produtoras de enterotoxinas termoestáveis pode explicar a possibilidade de ocorrência da intoxicação alimentar estafilocócica quando do consumo de alimentos processados (PEREIRA, 2006; STAMFORD et al., 2006).

Neste sentido, diversos alimentos são implicados epidemiologicamente em casos de contaminação por estafilococos e em surtos ocasionados por suas toxinas. Dentre estes, destacam-se por se constituírem excelentes substratos alimentícios e bons meios para o crescimento deste microrganismo, o leite e seus derivados (principalmente queijos), carnes e seus derivados (especialmente salsichas e presuntos), aves, ovos, saladas mistas, macarrão, patês, molhos, tortas, sanduíches com recheio e bombas de chocolate (FRAZIER; WESTHOFF, 1996; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; SILVA et al., 2007).

Em aproximadamente 24% de todos os casos de intoxicação estafilocócica estão envolvidos alimentos e/ou preparações salgadas (NORMANNO et al., 2005), pela habilidade que este patógeno apresenta de crescer nestes substratos.

Hemolisinas, nuclease, coagulase, lipase, termonuclease e enterotoxinas estafilocócicas estão entre as toxinas e enzimas extracelulares produzidas por cepas de *S. aureus* e que podem estar relacionadas ao arsenal patogênico deste microrganismo (Quadro 2). Cepas de *S. aureus* secretam três tipos de toxinas com atividade super-antigênica, a citar enterotoxinas estafilocócicas (ES), toxinas da síndrome do choque tóxico (TSCT-1) e toxinas esfoliativas (A e B) (CARSON; MEE; RILEY, 2002; NOSTRO et al., 2004).

A literatura reconhece, até o momento, 14 tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SE): SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ (CARMO; DIAS; LINARDI, 2002), SEK (ORWIN et al., 2001), SEL e SEM (JARRAUD et al., 2001), podendo algumas dessas ser produzidas no alimento em contagens mínimas de 10⁵ a 10⁶ UFC/ml (SU; WONG, 1997) e até de 10³ UFC/g (CARMO et al., 2002). Os estafilococos são facilmente destruídos por tratamentos térmicos, como a pasteurização, mas suas SE, termoestáveis, permanecem ativas nos alimentos tornando-se um risco em potencial para a saúde do consumidor e um problema para a saúde pública (CARMO; DIAS; LINARDI, 2002).

As SE são responsáveis por quadros de intoxicação alimentar estafilocócica no homem, caracterizados por náusea, vômito, diarreia, dor de cabeça, cólica abdominal, cãibra muscular, queda de pressão sangüínea e prostração. Em casos graves, o indivíduo pode necessitar de cuidados médicos; crianças e idosos podem chegar ao óbito (CARMO, 1997).

A espécie *S. aureus* possui um arsenal de defesa e adaptação que garante o seu potencial de patogenicidade frente às demais bactérias do seu gênero. Este potencial decorre dos diversos fatores de virulência ou indicadores de patogenicidade, que exercem importante papel na determinação da capacidade enterotoxigênica deste patógeno, notadamente nos processos de investigação epidemiológica das intoxicações estafilocócicas (PEREIRA, 2006).

Os fatores de virulência de *S. aureus* estão relacionados à estrutura de sua parede celular (Quadro 2) e a componentes químicos de natureza protéica (Quadro 3) sintetizados durante o seu processo adaptativo, de crescimento ou de injúria celular. Para Hurtado; De La Parte e Brito (2002), este arsenal de elementos justifica seu potencial de patogenicidade e de sobrevivência frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos processos antimicrobianos utilizados para o seu controle.

Quadro 2. Fatores de virulência relacionados aos constituintes da parede celular do *S. aureus*

Componente	Constituinte	Efeitos biológicos	Referências
Estrutura da parede celular	Ácido teicóico	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Regula a concentração de cátions na membrana celular e medeia a adesão bacteriana pela ligação à fibronectina resultando em agregação plaquetária; ✓ Age ativando a via alternativa do complemento e estimula a produção de citosinas 	Murray; Rosenthal; Pfaller, (2006); Santos et al., (2007)
	Peptídioglicano	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Atua como agente quimiotático para leucócitos; ✓ Garante estabilidade osmótica; ✓ Induz a produção de IL-1, atuando como elo entre a resposta inflamatória e imune, e a opsonina bacteriana, tornando-a facilmente fagocitada 	
	Proteína A	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Inibe a eliminação mediada por anticorpos, ligando-se a receptores Fc das IgG, com efeitos anticomplementares, quimiotáticos, antifagocitários; ✓ Favorecem a liberação de histamina, reações de hipersensibilidade e lesão plaquetária 	
	Fator de adesão (Adesinas)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Promovem a adesão da bactéria, ligando-se aos receptores químicos da superfície das células epiteliais do hospedeiro 	
	Polissacarídeos capsulares	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Protege a bactéria da fagocitose; ✓ Inibe a quimiotaxia; ✓ Aumenta a virulência e a capacidade de invasão dos tecidos e da corrente sanguínea por facilitar a aderência a corpos estranhos 	

Além destas, algumas linhagens de *Staphylococcus* produzem a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (SANTOS, 2003) cujos sintomas são agudos, potencialmente fatais e caracterizados por febre alta, descamação da pele e hipotensão (CHESNEY, 1989, *apud* LAMAITA, 2003). Esta síndrome, diferentemente da gastroenterite causada pelas SE, ainda não foi associada ao consumo de alimentos. No entanto, sua presença no alimento pode indicar uma possível fonte de veiculação dessa enfermidade para o homem (SANTOS, 2003), além de se constituir em fator de virulência da linhagem.

O estabelecimento do quadro patológico relacionado à intoxicação alimentar estafilocócica ocorre em aproximadamente 4-8 horas após a ingestão da enterotoxina previamente sintetizada no alimento. A patologia usualmente inicia-se com um quadro de emese afebril aguda, seguida de diarreia e náuseas. Em muitos casos, os indivíduos acometidos tornam-se ortostáticos e cronicamente hipotensivos, desenvolvendo febre e sintomas similares a um choque tóxico (TODD, 1997).

Quadro 3. Fatores de virulência relacionados a enzimas e toxinas produzidas por *S. aureus*.

Componente	Constituintes	Efeitos biológicos	Referências
Enzimas	Coagulase	Coagula o plasma por ativação da protrombina, resultando na conversão do fibrinogênio em fibrina, a qual envolve a célula bacteriana protegendo-a na opsonização e fagocitose	Bustos-Martínez; Hamdan-Partida; Gutiérrez-Cárdenas (2006); Sandel; McKillip (2004)
	Catalase	Inativa radicais livres e peróxido de hidrogênio tóxicos formados pelo sistema mieloperoxidase no interior das células fagocitárias do hospedeiro, convertendo em O ₂ e H ₂	Sandel; McKillip (2004); Santos et al. (2007)
	Hialuronidase	Degrada a matriz intercelular de mucopolissacarídeos do tecido conjuntivo do hospedeiro por hidrólise do ácido hialurônico, promovendo disseminação dos estafilococos nas áreas adjacentes	
	Fibrinolisinase	Dissolve coágulos de fibrina	Murray; Rosental; Pfaller (2006); Sandel; McKillip (2004)
	Lipases	Hidrolisa componentes estruturais lipídicos dos tecidos pela atividade da fosfolipase C fosfatidilinositol-específica	

	Termonucleases (TNase)	Endo e exonuclease termo-estável capaz de hidrolisar DNA e RNA das células do hospedeiro	Sandel; McKillip (2004);
Toxinas	Citotoxinas (α , β , δ , γ , leucocidina)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Efeito lítico em hemácias (α-hemolisina); ✓ Atua sobre o complexo lipocarboidrato- esfingomielina, provocando lesão e lise celular (β-hemolisina); ✓ Efeito lítico sobre hemácias, células brancas e plaquetas* (δ^* e γ-hemolisina); ✓ Lesão de membrana e lise em macrófagos e leucócitos (leucocidina) 	Bustos-Martínez; Hamdan-Partida; Gutiérrez-Cárdenas (2006); Sandel; McKillip (2004); Santos et al. (2007)
	Toxina Esfoliativa	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cliva o extrato granuloso da epiderme por ação de serinas proteases, causando síndromes cutâneas 	Santos et al. (2007); Murray; Rosenthal; Pfaller (2006)
	Toxina-1 da Síndrome do choque tóxico (TSST-1)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Suprime a quimiotaxia de neutrófilos, induz a função supressora dos linfócitos T e bloqueia o sistema reticuloendotelial; ✓ Atua como superantígeno, estimulando a liberação de várias citocinas, prostaglandinas e leucotrienos, ✓ Produz poros na membrana ou destruição das células endoteliais 	Bustos-Martínez; Hamdan-Partida; Gutiérrez-Cárdenas (2006); Murray; Rosenthal; Pfaller (2006)
	Enterotoxinas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Exercem atividade pirogênica e superantigênica (\uparrow células T e liberação de citocinas); ✓ Provocam intoxicação alimentar, com efeitos na peristalse intestinal (\uparrow perda de fluidos \rightarrow diarreia) e sobre o SNC, provocando náuseas e vômitos 	Bustos-Martínez; Hamdan-Partida; Gutiérrez-Cárdenas (2006); Murray; Rosenthal; Pfaller (2006); Balaban; Rasooly (2000)

Clinicamente, a IAE apresenta sintomatologia caracterizada por um começo súbito e intenso dos sintomas, normalmente entre 1 a 8 horas após a ingestão do alimento

contaminado, que incluem náusea, vômito, desidratação, prostração, diarreia ocasional, dor abdominal, baixa da temperatura corporal (nunca febre) e hipotensão (BALABAN et al., 2000; KÉROUANTON et al., 2007; LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al., 2007; NORMANNO et al., 2005; SANDEL; McKILLIP, 2004; SILVA et al., 2007). Geralmente, os sintomas cessam entre um a dois dias, mas a doença pode persistir por 7 a 10 dias (NEMA et al., 2007).

Complicações ou mortes são raras, entretanto, quando estas ocorrem envolvem, na maior parte dos casos, crianças, idosos ou pessoas debilitadas (LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al., 2007; NORMANNO et al., 2005). Estudos têm demonstrado que a quantidade de enterotoxina requerida para produzir a IAE depende da suscetibilidade individual à toxina, do peso e do estado geral de saúde da pessoa afetada (SORIANO et al., 2002). Entretanto, não existe consenso na literatura sobre a dose infectante de EE capaz de produzir os sintomas da intoxicação alimentar em seres humanos. No geral, estimam-se valores de enterotoxina entre 0,015 a 0,375 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de massa corpórea (FRANCO; LANDGRAF, 2005; MENDONÇA, 2004; SILVA; GANDRA, 2004). Por outro lado, outros estudos apontam para valores em torno de 0,1 μg , variando de acordo com a sensibilidade individual (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

De acordo com Franco e Landgraf (2005), a quantidade de enterotoxina pré-formada em produtos alimentares pode variar de 0,5 a 10 $\mu\text{g.100g}^{-1}$ de alimento, sendo diretamente influenciada pela densidade populacional de *S. aureus* presentes nestes substratos (PEREIRA, 2006). Tem sido reportadas variações de densidade populacional de *S. aureus* capazes de produzir quantidades de enterotoxinas detectáveis em alimentos (ALARCÓN, 2007). Alguns autores colocam que para obtenção de quantidades de EE < 1,0 μg , são necessárias contagens de *S. aureus* maiores que 10^6 UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹ de alimento (RODRIGUES et al., 2004; SILVA et al., 2007). Outros trabalhos referem que contagens de 10^5 UFC.g⁻¹ de *S. aureus* são capazes de produzir uma dose de toxina $\leq 1,0 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (300-500 ng) em alimentos contaminados, suficiente para induzir os sintomas da intoxicação em humanos (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; FORSYTHE, 2002). Para Jay (2005), a quantidade mínima necessária de enterotoxinas para causar a doença seria de aproximadamente 20 ng.

Cunha Neto; Silva e Stamford (2002), afirmam que níveis de 0,01 a 0,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de alimentos são suficientes para provocar intoxicação em indivíduos mais sensíveis. Entretanto, tem-se demonstrado variações nas quantidades mínimas necessárias para desencadear os sintomas da doença dentre os diferentes tipos de EE presentes em alimentos. Considerando a

enterotoxina estafilocócica tipo A (EEA), por ser relatada como a mais prevalente em surtos por intoxicação alimentar, um estudo demonstrou que a dose mínima requerida para causar doenças em crianças em idade escolar foi de 144 ± 50 ng (SORIANO et al., 2002). No entanto, Normanno et al. (2005) referem que uma dose mínima de aproximadamente 100 ng desta enterotoxina já seria suficiente para causar sintomas da doença em humanos

Frente à magnitude da ocorrência da intoxicação estafilocócica em todo o mundo, bem como considerando o impacto de tal patologia sobre a saúde e bem estar dos consumidores, torna-se essencial à busca por mecanismos ou procedimentos que conduzam a uma redução do seu número em alimentos, diminuição da velocidade de seu crescimento, e/ou síntese de sua enterotoxinas. Entretanto, o uso dos procedimentos convencionais de controle do crescimento microbiano em alimentos tem se tornado um tanto complexo, realidade esta relacionada ao contínuo surgimento de novos alimentos no mercado requerendo longa e estável vida de prateleira, em soma à necessidade de um alto grau de proteção contra microrganismos patogênicos (MARINO et al., 2001; LANCIOTTI et al., 2004).

5.8 Estrutura da célula bacteriana

As principais estruturas da célula bacteriana, que são relevantes para esta revisão são a parede, a membrana citoplasmática e citoplasma revestido por essa membrana. A pressão osmótica interna deste citoplasma é bastante elevada, em bactérias Gram positivas no caso do *S. aureus* ela pode ser tão elevada chegando a 30 atmosferas, excedendo um típico pneu de automóvel de 4 atmosferas (SALTON; FBEER, 1965).

A membrana citoplasmática tem uma baixa resistência mecânica, possui propriedade especial de permeabilidade e regula a passagem de metabólitos dentro da célula; Contém também certas enzimas essenciais. O citoplasma, que é um material viscoso, contém todos os demais componentes necessários para a vida da célula, incluindo enzimas não presentes na membrana, as reservas de alimentos materiais, estruturas envolvidas na síntese de proteínas e o material genético responsável pelas herdáveis características da célula (SALTON; FBEER, 1965).

É de se esperar que a parede da célula deva ser de grande resistência mecânica a fim de proteger a membrana citoplasmática de ruptura sob a influência da pressão osmótica. As paredes celulares de bactérias contêm uma rígida rede macromolecular que inclui um polímero de N-acetylglucosamine e um peptídeo ácido, o N-acetylmuramico, também chamado de chamado mureína. Esta estrutura é o principal componente das paredes celulares

de bactérias Gram positivas e podem ocorrer nestes organismos como uma macromolécula concêntrica de três reservatórios (SALTON, 1963).

Esta noção é totalmente compatível com o conhecido da maior resistência dos microrganismos Gram positivos para uma ruptura mecânica e para o fato de que o seu citoplasma é mantido uma considerável pressão osmótica em relação às células gram negativas. Membranas bacterianas são caracterizadas por um elevado teor lipídico. Estudos detalhados utilizando técnicas especiais de coloração e do exame das seções delgadas de bactérias no microscópio eletrônico têm sugerido que a parede é um complexo de multicamadas, estrutura constituída de até três camadas. Outros componentes incluem membrana carboidratos e proteínas (SALTON, 1963).

Além de atuar como uma barreira osmótica e controlar a passagem de metabólitos para dentro e para fora da célula, muitas enzimas demonstraram ser localizadas na membrana. Assim, o citocromo, pigmento respiratório, é quase sempre encontrado na superfície da membrana. Outras enzimas incluem o ácido Succínico desidrogenase. (SALTON; FBEER, 1965).

5.9 Mecanismo de ação de agentes antimicrobianos na célula bacteriana.

5.9.1 Interação de anti-sépticos com a célula bacteriana

Pode facilmente ser considerada como ocorrendo em duas fases:

- (a) A primeira, reação com a célula;
- (b) Após um dano à estrutura ou estruturas na célula.

Tradicionalmente tem sido utilizadas técnicas físico-químicas para estudar os fenômenos, tais como adsorção e mobilidade eletroforética, as quais foram de suma importância nas descobertas sobre a relação inicial entre drogas e células vivas.

(I) Adsorção

Durante a primeira década deste século Herzog e Betzel (1911) perceberam a importância da adsorção em processos de desinfecção em seus estudos com painhos e leveduras, e, desde então, muitos outros estudos têm medido o nível de utilização das drogas em células. Estes estudos consistem principalmente da adição de uma suspensão de células a uma solução da droga e no momento adequado remoção de uma amostra, centrifuga para

remover as células e determinar a quantidade de resíduos de droga na célula livre e na solução sobrenadante.

Claramente, se as células estão removendo droga a partir de solução, a concentração da droga no fluido diminuirá. A partir destes dados isotermas de adsorção podem ser plotados e informações sobre a taxa de absorção e o montante total da captação podem ser computados. Além disso, por um exame de adsorção da isoterma obtida alguma noção do mecanismo pode ser inferida. Este aspecto do trabalho foi revisto por Giles et al. (1960).

Informações no sitio de adsorção podem ser obtidas através do estudo do processo em diferentes valores de pH, mas deve-se ter em mente que tanto a ionização do desinfetante, bem como locais receptores da superfície celular podem ser afetados por alterações no pH (SALTON, 1967; HUGO; LONGWORTH, 1964).

5.9.2 Modificação da permeabilidade celular e extravasamento dos constituintes celulares

Os fenômenos de hemólise são bem conhecidos e tem sido amplamente estudados. Estes podem ser induzidos por agentes de superfície (SCHULMAN; RIDEAL, 1937) e em 1940, Kuhn e Bielig fez a sugestão de que componentes fenólicos podiam prejudicar sua capacidade de dissociar as proteínas conjugadas, podendo agir sobre a membrana da célula bacteriana, um conjugado de lipoproteínas, e de forma análoga aos danos de hemólise na medida em que a morte da célula segue. Quatro anos depois, Hotchkiss (1944) demonstrando que o nitrogênio e o fósforo continha compostos de extravasamento de estafilococos, quando tratados com clorexidina e antibiótico, um composto de amônio quaternário (QAC). Gale e Taylor (1947) concluíram que a ação lítica dos compostos antibacterianos que estudaram, que incluía fenol, foi suficiente para explicar a sua ação desinfetante.

Mais tarde, Salton (1950, 1951), confirmaram essas observações e demonstraram que a atividade bactericida para um efeito morte de 99,99% estava relacionada à quantidade de purina ou pirimidina (como medido por material de absorção na região ultravioleta do espectro de 260 nm) que escapa das células em 5 min. Observações semelhantes foram feitas por Beckett; Patki e Robinson (1958) estes pesquisadores descobriram que com o aumento da concentração da quantidade de material absorvente a 250 nm aumentou de forma constante e atingiu um valor máximo que foi curto do conjunto total de tal material, ou seja, do material libertado por rompimento mecânico da célula.

Hugo e Longworth (1964) estudaram a capacidade da clorexidina de promover a fuga de material intracelular e encontraram uma concentração de fuga interessante difásica padrão. Os autores deduzidos da prova de garantia de que enquanto a primeira parte da curva foi devido ao aumento normal de fuga, com concentração, com maiores concentrações do conteúdo protoplásmico ou membrana citoplasmática, esta se tornou gradualmente coagulada para que a fuga fosse progressivamente menor. Certamente a microscopia eletrônica de seções finas de bactérias tomadas depois de tratamentos na dose adequada, em apoio provaria esta tese (HUGO; LONGWORTH, 1964).

Muitos solventes, incluindo butanol (PETHICA, 1958), etanol (SALTON, 1967) e tolueno (JACKSON; DE MOSS, 1966), causou a liberação de constituintes intracelulares, enquanto manutenção de células em que a temperatura da água é fervente por 10 minutos liberou muito mais desse tipo de material fazendo este tipo de tratamento anti-séptico. É provável que os solventes e agentes antibacterianos promovam a fuga de ácidos nucleicos e seus componentes purinas, pirimidinas, pentoses e fósforo inorgânico, e na detecção de fato de todas estas substâncias são, certamente, usadas para determinar o dano à membrana, mas é improvável que este seja um processo rapidamente fatal, e realmente não há evidência que este tipo de dano pode às vezes ser reparável (PULLMAN; REYNOLDS, 1965).

No entanto, o tratamento térmico, provavelmente, liberando material ribossomal. Jackson e de Moss (1966) produziram evidências de que o tratamento com tolueno em *E. coli* pode levar a liberação de ribossomos.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) Campus I, no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (Leaal) do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

6.1 Obtenção das Cepas de *S. aureus*

As cepas de *S. aureus* utilizadas como microrganismos testes foram obtidas da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, CCS, UFPB. Estas cepas foram previamente isoladas de amostras de queijo tipo coalho de acordo com a metodologia descrita por Vanderzant; Splittstoesser (1992).

6.2 Obtenção dos fitoconstituintes

Os fitoconstituintes timol e carvacrol foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (Figura 6). As soluções dos fitoconstituintes foram preparadas em caldo nutriente com ágar bacteriológico (0,15% p/ v) como agente estabilizador (BENNIS et al., 2004).



Figura 6. Carvacrol e Timol Sigma- Aldrich Brasil Ltda

6.3 Inóculo microbiano

Os inóculos das cepas de *S. aureus* utilizados nos ensaios antimicrobianos foram obtidos através da preparação de suspensões de tais cepas em solução salina (NaCl a 0,85% p/v) estéril a partir de culturas *overnight* cultivadas em ágar nutriente inclinado a 37°C. Tais suspensões tiveram sua turbidez padronizadas de acordo com a turbidez do tubo 0.5 da escala McFarland correspondendo à concentração de aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL).

6.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos fitoconstituintes

A Concentração Inibitória Mínima – CIM dos fitoconstituintes para cada cepa de *S. aureus* isolada foi determinada através da técnica de macrodiluição em caldo, onde foram preparados tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo nutriente acrescidos de 0,15% de ágar bacteriológico, suplementados com concentrações crescentes dos fitoconstituintes, sendo posteriormente adicionado 1 mL do inóculo das cepas teste. O sistema foi incubado a 35-37 °C por 24 horas. Ao término do período de incubação, a mais baixa concentração (mais alta diluição) do fitoconstituente que não apresentou crescimento microbiano visível (turvação) foi considerada como a Concentração Inibitória Mínima. Após esta observação, alíquotas de 100 µL dos tubos que não apresentaram crescimento microbiano visível, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo ágar Nutriente inclinado, por durante 24-48 horas a 37 °C. A Concentração Bactericida Mínima - CBM foi considerada como a menor concentração do fitoconstituente, capaz de inibir o crescimento das cepas teste em ágar nutriente após incubação de 37 °C por 24-48 horas.

6.5 Interferência dos fitoconstituintes sobre a viabilidade de crescimento bacteriano

Os ensaios de interferência dos fitoconstituintes sobre a cinética de crescimento microbiano foram realizados através do método de contagem de células viáveis. Nestes ensaios foi observada a viabilidade das cepas teste quando expostas a diferentes concentrações (CIM/2, CIM, CIM x 2) de cada fitoconstituente por diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos) a 37 °C. Nos intervalos estabelecidos uma alíquota do sistema foi incubada em placas de Petri contendo ágar nutriente por 24 horas a 37 °C. Os

resultados foram expressos em percentual de redução de UFC/mL do inóculo microbiano inicial ao longo dos tempos analisados, bem como em percentual de redução em relação aos valores obtidos no experimento controle onde os fitoconstituintes foram substituídos por água destilada estéril (SAGDIÇ, 2003).

6.6 Interferência dos fitoconstituintes sobre as características metabólicas de *S. aureus*

Inicialmente, foi realizada uma análise comprobatória da capacidade das cepas testes de crescer em diferentes concentrações de NaCl, bem como de sua positividade da ação das enzimas coagulase e lipase através de metodologia padrão (VANDERZANT; SPLITSTOESSER, 1992; NOSTRO et al., 2002). Após esta observação, as suspensões das cepas bacterianas foram tratadas com soluções possuindo diferentes concentrações subinibitórias de cada fitoconstituente preparadas com caldo nutriente 0,1% (p/v) por 24 horas a 37 °C. Ao final de cada intervalo de exposição, foi observada a capacidade em cada cepa de manter sua capacidade metabólica/enzimática de acordo com metodologia descrita por Nostro et al. (2002) e Carson et al. (2002).

6.7 Interferência dos fitoconstituintes sobre o potencial enterotoxigênico de cepas de *S. aureus*

Foram incluídas neste ensaio as cepas testes de *S. aureus* que apresentarem positividade para produção de enterotoxinas através da utilização do kit SET-RPLA (Oxoid). Inicialmente, as suspensões das cepas de *S. aureus* foram expostas a soluções contendo diferentes concentrações subinibitórias dos fitoconstituintes e, em seguida foram submetidas ao teste de produção de enterotoxinas utilizando o kit SET-RPLA de acordo com a metodologia descrita por Nostro et al. (2002).

6.8 Agentes antimicrobianos

O Ácido láctico P.A. (85%-90%) e ácido acético P.A. (99,7%) foram obtidos a partir Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, Brazil). Soluções dos ácidos junto com o timol e carvacrol foram analisados em concentrações que vão de 80 a 0,015 μ L.mL⁻¹.

6.9 Preparação do caldo carne

Pedaços de carne bovina (coxão mole), foram cortados em tamanhos uniformes (3 cm³) livres de gordura aparente. Em seguida foram cozidos durante 20 minutos a 80 °C com 600 mL de H₂O_p. Cerca de 500 ml de caldo de carne foi obtido através de filtragem a vácuo utilizando papel de filtro Whartman n ° 1. O filtrado foi esterilizado, utilizando autoclave por 15 min (121 atm). Depois disso, o caldo foi armazenado em -20 ° C em alíquotas de 50 ml. Quando necessária uma alíquota, foram descongelados (5 ° C, ± 2 ° C) e utilizados para a análise experimental.

6.10 Avaliação do efeito sinérgico em caldo

O estudo da influência do efeito sinérgico do timol e carvacrol com ácido láctico e ácido acético foi inicialmente realizada através da determinação da Concentração Inibitória Fracional (FIC). Para isso, foi utilizado o procedimento de macrodiluição em caldo nutriente como descrito anteriormente no item 6.4. O valor de CIF foi calculado como segue: CIF: CIM do fitoconstituente em combinação com ácido orgânico / CIM do fitoconstituente isolado. Efeito sinérgico foi definido como $FIC \leq 0,5$; indiferença como: $FIC > 0,5$ a 4; e antagonismo como $FIC: > 4$ (MACKAY; MILNE; GOULD, 2000)

Em seguida para análise da ocorrência de efeito sinérgico entre os antimicrobianos, através da observada curva de morte microbiana (96 horas), foi considerada ocorrência de efeito sinérgico quando observado um aumento da taxa de morte microbiana ≥ 2 ciclos logarítmicos decorrente da aplicação combinada dos antimicrobianos em comparação à redução causada pelo fitoconstituente, ao fim do período de exposição (GOULD et al., 1991). Para isso, 5 ml de caldo carne foi inoculado com 1 ml da suspensão bacteriana (ca 10^8 cfu.mL⁻¹). Depois disso, 4 mL da solução desejada do antimicrobiano (fitoconstituente, ácido, fitoconstituente + ácido) foi adicionada ao sistema e agitada suavemente por 30s. O sistema foi incubado a 37 °C. Em diferentes intervalos de tempo (0, 24, 48, 72 e 96 h), 1 ml da suspensão do sistema foi seriadamente diluído (10^{-1} – 10^{-5}) em água peptonada estéril (0,1% w / v) e inoculado em placas de Petri estéreis contendo Agar nutriente, sendo em seguida incubados a 37 °C por 24 horas (VILJOEN et al., 2003). Como ensaios controle foram utilizados sistemas sem adição de antimicrobianos. Após o período de incubação, o número médio de colônias foi contado, sendo os resultados expressos em log de UFC/mL.

6.11 Aplicação combinada de antimicrobianos em alimento

Pedaços de carne bovina livre de gordura aparente foram cortados (3 cm^3) e acondicionados em frascos Erlenmeyer com tampas, e em seguida submetidos à autoclavagem (121°C por 15 minutos, 121 atm). Depois disso, os pedaços de carne foram inoculados com uma suspensão microbiana de acordo com o seguinte procedimento: os pedaços de carne foram individualmente imersos em 50 mL do inóculo bacteriano (10^8 UFC/mL preparado em solução salina estéril 85%), agitados com bastão de vidro estéril por 1 minuto com a finalidade de garantir uma inoculação homogênea. Posteriormente, os pedaços de carne foram aleatoriamente divididos em quatro grupos e imersos durante 30 segundos (1:4 p / v) em diferentes soluções: (1) controle - mergulhados em água destilada estéril; (2) mergulhados em solução contendo a CIM do fitoconstituente; (3) mergulhados em solução contendo a CIM do ácido orgânico; e (4) mergulhados em solução contendo a CIM x $\frac{1}{4}$ do fitoconstituente + CIM x $\frac{1}{4}$ do ácido orgânico. Os pedaços de carne foram colocados em recipiente de polipropileno estéreis selados e armazenados sob refrigeração (7°C , $\pm 1^\circ \text{C}$). Após 0, 24, 48, 72 e 96 h de armazenamento da carne, as amostras foram submetidas a contagem de *S. aureus* de acordo com o procedimento descrito por Vanderzant e Spplittstoesser (1992). Os resultados foram expressos como log do número de unidades formadoras de colônias por grama de carne (log UFC / g de carne).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados são expressos como média dos três ensaios paralelos.

6.12 Ensaios de atividade enzimática e tolerância ao sal.

A atividade da lipase foi estimada em Agar Sal Tween - AST, contendo: peptona 10 g/L, 75,0 NaCl g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,10 g/L e 10 g/L de Tween 80, pH 7.2. 100 μL da cultura bacteriana em *overnight* (37°C) e diluído (01/10 - 04/10) em água peptonada estéril (0,1 g /100mL) foram semeados sobre a AST e AST acrescentado da concentração subinibitória de carvacrol (AST-C) e timol (AST-T), seguido de incubação a 37°C por 24 h. Após o período de incubação, o número de colônias (ufc/mL) que apresenta atividade da lipase positivo em cada placa AST foram contados e comparados com os de AST-C e as placas AST-T, e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição.

Para testar a atividade de coagulase, uma alíquota de 100 μL do inóculo foi transferida para Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) (Sigma, França), adicionado de concentrações

subinibitórias de timol ou carvacrol e incubadas a 37 ° C por 24 h. Após o período de incubação, a atividade de coagulase foi estimada pelo procedimento padrão, e os resultados foram expressos em nível (-, + para +++) do teste de coagulase em relação ao tamanho do coágulo formado de plasma.

Experimentos preliminares foram realizados para avaliar a tolerância à salinidade das cepas. Para isso, as culturas não tratadas foram distribuídos em Agar nutriente e NaCl contendo de 5 a 100 g/L (AN-NaCl), a fim de encontrar a concentração de NaCl que inibice a capacidade formadora de colônia de suspensões tratadas. As suspensões de bactérias foram tratadas em *overnight* com concentrações sub-inibitórias de carvacrol e timol (37 ° C). Depois disso, 100 µL das culturas foram diluídas (01/10 - 04/10) em água peptonada estéril (0,1 g/100mL) e banhadas em AN-NaCl a 37 ° C por 24 h. Balões Controle sem os compostos fenólicos foram testados da mesma forma. Após o período de incubação, o número de ufc /mL de cada placa AN-NaCl foram comparados com aqueles encontrados para o ensaio de controle, e os resultados foram expressos em porcentagem de células capazes de formar colônias.

6.13 Produção de enterotoxinas.

A produção de enterotoxinas estafilocócicas foi estimada por ensaio imunológico processado no VIDAS Staph Enterotoxin II (SET2) Kit (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e em aparelho Mini VIDAS - AOAC RI N ° 070404. Para isso, uma alça cheia de uma cultura *overnight* cultivadas em AN a 37 ° C foi suspensa em caldo cérebro-coração adicionado de concentrações subinibitória dos compostos fenólicos e incubados por 18 h, em condições estáticas, a 37 ° C. Após o período de incubação, os meios de cultura foram centrifugados (3 000 rpm por 15 min), e uma alíquota do sobrenadante foi levado e submetido a teste de detecção de enterotoxinas de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante. Os resultados foram expressos em positivo ≥ 13 (+) e < 13 (-) A produção de enterotoxina negativo. Tubos sem os compostos fenólicos foram testados da mesma forma como o ensaio de controle positivo.

6.14 Ensaio de efluxo de íons potássio

A concentração de íons de potássio da suspensão bacteriana foi medida após a exposição ao carvacrol e timol em água peptonada estéril (0,1 g/100mL) nos tempos de 0, 30,

60 e 120 min. Em cada intervalo pré-estabelecido, a concentração de potássio extracelular foi medida por procedimento fotométrico usando o kit de potássio (Human GmbH, Wiesbaden, Alemanha). O experimento controle sem adição dos antimicrobianos foram testados da mesma maneira. Os resultados foram expressos em quantidade de potássio livre extracelular (mmol/L) no meio de crescimento em cada intervalo de incubação.

6.15 Lançamento de material genético

A liberação do material genético de absorção a 260 nm a partir de células de *S. aureus* foi realizada em alíquotas de 2 mL do inóculo bacteriano contendo aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL em água peptonada estéril (0,1 g/100mL) adicionados de carvacrol e timol a 37 ° C. Nos tempos de 0, 30, 60 e 120 min de tratamento, as células foram centrifugadas a 3500 rpm, e a absorbância do sobrenadante obtido a 260 nm foi determinada em um espectrofotômetro Biochrom S32/S32 Libra. Balões Controle sem carvacrol e timol foram testados da mesma forma. Os resultados foram expressos em porcentagem de material absorvente a 260 nm em cada intervalo em relação à última vez.

Todos os ensaios antimicrobianos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média dos ensaios paralelos.

6.16 Morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura

Após um tratamento *overnight* com timol ou carvacrol em caldo BHI a 37 ° C, as células bacterianas foram pré-fixadas em glutaraldeído 2% por 2 horas a 4 ° C. Fixação foi realizada usando uma solução de tetróxido de ósmio a 2% durante 30 min a 30 ° C. Após cada fixação das células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (PBS). As células foram então secas em um ponto crítico em CO₂ líquido sob pressão de 95 bar e depois recobertas em ouro por pulverização catódica (Fine íon revestimento por pulverização catódica JFC-1100, JEOL Ltd., Tóquio, Japão). Finalmente as células foram examinadas com um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5600LV, PAIS) como descrito anteriormente.

6.17 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (teste t de Student e teste de Tukey) para determinação

de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados. Para o tratamento estatístico utilizou-se o software Sigma Stat. 3.1.

7 REFERENCIAS

- ALVES, V.S.; COSTA, P.S.; ROBBS, P.G.; FAVARIN, V. Avaliação do potencial de Gluconato-Delta-Lactona (GDL) no controle de *Staphylococcus aureus* em leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 78-80, 2003.
- AKGUL, A., KIVANÇ, M. Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 263-268, 1988.
- ALARCÓN, M. M.V. **Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota**. 2007.56f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- ALCARÁZ, L. E.; SATORRES, S. E.; SEPÚLVEDA, L.; CENTORBI, O. N. P. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. **La Alimentación Latinoamericana**, v. 219, p. 44-47, 1997.
- ALIGIANS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.9, p.4168-4170, 2001.
- ARAGON-ALEGRO, L. C.; KONTA, E. M.; SUZUKI, K.; SILVA, M. G.; JÚNIOR, A. F.; RALL, R.; RALL, V. L. M. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and strains isolated. **Food Control**, v. 18, n. 6, p. 630-634, 2007.
- AUSTGULEN, L. T; SOLHEIM, E. SCHELIN, R. R. "Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol". **Pharmacology and Toxicology**, v. 61, n. 2, p. 98–102, 1987.
- BALABAN, M. S.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2000.
- BANERJEE, M.; SARKAR, P.K. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic microorganisms from spices. **Food Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 335-342, 2004.
- BARA, M. T. F. **Avaliação do efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de *Yersinia enterocolitica***. 1992. 73 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.
- BARROS, J. C.; CONCEIÇÃO, M. L.; GOMES NETO, N. J.; COSTA, A. C. V. SOUZA, E. L. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1139- 1143, 2009.
- BASÍLICO, M. Z.; BASÍLICO, J. C. Inhibitory effects of some spice essential oils on

Aspergillus ochraceus NRRL growth and ochratoxin A production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 238-241, 1999.

BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G.; KARADOGAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2004.

BECKETT, A. H.; PATKI, S. J.; ROBINSON, A. E. Interaction of phenolic compounds with bacteria. **Nature**, v. 181, p. 712. 1958.

BEDIN, C.; GUTKOSKI, S. B.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana das especiarias. **Higiene Alimentar**. v. 13, n. 65, p. 26-29, 1999.

BEN ARFA, A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.

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

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology**, v. 37, n. 2, p. 263-268, 2004.

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

BILLING, J.; SHERMAN, P. W. Antimicrobial functions of spices: why some like it hot? **Quarterly Review of Biology**, v. 1, n. 73, p. 3-49, 1998.

BRAGA, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; JETT, M.; TAKAHASHI, J. A.; CARMO, L. S.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Pomegrate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 335-339, 2005.

BRAOIOS, A. **Estudo de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (mrsa) por técnicas genotípicas e fenotípicas**. 2005. 104p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Coordenação Geral de Laboratório Animal. **Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos** - Revisão 1991/1992.

BRULL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 1-17, 1999.

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

BUSTOS-MARTÍNEZ, J. A.; HAMDAN-PARTIDA, A.; GUTIÉRREZ-CÁRDENAS, M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. **Revista Biomédica**, v. 17, n. 4, p. 287-305, 2006.

CARMO, L. S. **Produção e purificação das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D**. 1997. 177f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9-14, 2002.

CARSON, C. F.; COOKSON, B. D.; FARRELLY, H. D.; RILEY, T. V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 3, p. 421-424, 1995.

CARSON C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004.

CERVATO, C.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CESTARO, B. Antioxidant properties of Oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 453-465, 2000.

CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 12, n. 1, p.1-55, 2004.

CHUN, S. S.; VATTEM, A. V.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.

COHEN, M. L. *Staphylococcus aureus*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **Journal of Pediatrics**, v. 108, p. 796-799. 1986.

CONCON, J. M. **Food Toxicology**. Part B: contaminants and additives. New York: Marcel Dekker, 1980. 672p.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G., PISANO, B., SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 1999.

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

- COX, S. D; MARKHAM, J. L. "Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds". **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 930–6, 2007.
- CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. "Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300–8, 2007.
- CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus enterotoxigênicos* em alimentos *in natura* e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.
- DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.
- D'ANTUONO, L. F.; GALLETTI, G. C.; BOCHINNI, P. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. population from a North Mediterranean area (Liguria Region, Northern Italy). **Annals of Botany**, v. 86, p.471-478, 2000.
- DE VINCENZI, M; STAMMATI, A; DE VINCENZI, A; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7-8, p. 801–4, 2004.
- DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **Internacional Dairy Journal**, v. 14, n. 4, p. 273-285, 2004.
- DÍAZ, T. M. L.; GONZÁLES, B.; MORENO, B.; OTERO, A. Effect of temperature water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium oslonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2002.
- DI PASQUA, R; BETTS, G; HOSKINS, N; EDWARDS, M; ERCOLINI, D; MAURIELLO, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4863–70, 2007.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
- DU, W. X; OLSEN, C. E; AVENA-BUSTILLOS, R. J; MCHUGH, T. H; LEVIN, C. E; FRIEDMAN, M. Storage Stability and Antibacterial Activity against *Escherichia coli* O157:H7 of Carvacrol in Edible Apple Films Made by Two Different Casting Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3082-3088, 2008.
- DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; GARCIA, V. L.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

ELGAYYAR, M.; DRAUGHOM, F. A.; GOLDEN, D. A.; MOUNT, J. R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 2, p. 1019-1024, 2001.

EL-SHAMI, M. A.; FADIL, F. A.; SIRRY, A. R.; EL-ZAYAT, M. M. Antifungal property of garlic, clove juice compared with fungicidal treatment against *Fusarium* with watermelon. **Egyptian Journal of Phytopathology**, v. 17, p. 55-62, 1985.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 193-206 jul./dez. 2007.

FARIAS-ALVES, V.; SICCHIROL-LAVRADOS, M. A.; PEREIRA-DE-MARTINIS, E. C. Bacteriocins exposure and food ingredients influence on growth and virulence of *Listeria monocytogenes* in a model meat gravy system. **Journal of Food Safety**, v. 23, n. 3, p. 201-217, 2003.

FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA. X Edizione. Roma: Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, v. 1, p. 206-210. 1998.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FERREL, F.A. **The Rural School and Hookworm Disease**, 2005

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

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. Ed. Atheneu, São Paulo. 1996.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Food Microbiology**. New York: McGraw Hill, 1996. 182p.

FURLAN, M. R. **Ervas e temperos: cultivo e comercialização**. Cuiabá: SEBRAE/MT, v. 15, 1998. 128 p.

GALE, E. F.; TAYLOR, E. S. The action of tyrocidin and some detergent substances in releasing amino acids from the internal environment of *Streptococcus faecalis*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 77. 1947.

GILES, C. H.; MCEWAN, T. H.; NAKHAWA, S.N.; SMITH, D. Studies in adsorption: part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanism and in measurement of specific surface areas of solids. **Journal of the Chemical Society**, v. 111, p. 3973-3993, 1960.

GONÇALVES, L. A.; BARBOSA, L. C. A.; AZEVEDO, A. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 8-14. 2003.

GOODNER, K. L.; MAHATTANATAWEE, K.; PLOTTO, A.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. J. "Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils by GC-MS/GC-O". **Industrial Crops and Products**, v. 24, n. 3, p. 264-268. 2006.

GOULD, G. W. Industry perspective on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 82-85, 1995.

GOULD, I. M., WILSON, D., MILNE, K., PETERSON, A., GOLDR, D., RUSSEL, D., Interaction of iminepen with erythromycin and tetracycline assessed by microdilution checkboard techniques. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 2407-2409. 1991.

GRAHAN, H.D. **The safety of foods**. Connecticut: AVI Publishing Company. 1982. 733p.

GUNER, A.; OZHATAY, N.; EKIM, T.; BASER, K. H. C. **Flora of Turkey and the East Aegean Island**. vol. 11, Suplemento II. Edinburgh: Edinburgh University Press, 2000.

HAO, Y. Y.; BRACKET, R. E.; DOYLE, M. P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 307-312, 1998.

HELANDER, L. M.; ALAKONI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDOHOLM, T.; POL, L.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

HERZOG, R. O.; BETZEL, R. Zur Theorie der Desinfektion. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 67, n. 4-5, p. 309-313. 1911

HOFFMANN, F. L.; SOUZA, S. J. F.; CRUZ, C. H. G.; DUTRA, A. L. Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **Boletim do CEPPA**, v. 17, n. 1 p. 11-20, 1999.

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

HOTCHKIS, R. S. D. Gramicidin, tyrocidine and tyrothricin. **Adv. Enzymol.** v. 4, p. 163. 1944.

HUGO, W. B. LONOWORTAH, A. R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 16, p. 655-62. 1964.

HURTATO, M. P.; DE LA PARTE, M. A.; BRITO, A. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 22, n. 2, p. 112-118, 2002.

- HUSSAIN, M. S.; CHANDRASEKHARA, N. Influence of curcumin and capsaicin on cholesterol gallstone induction in hamsters and mice. **Nutrition Research**, v. 13, n. 4, p. 349-357, 1993.
- JACKSON, R. W.; DE MOSS, J. A. Effects of toluene on *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 90, n. 5, p. 1420-1425, 1966.
- JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. A highly prevalence operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 669-677, 2001.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
- JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spices oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 4, p. 638-687, 2002.
- KARATZAS, A. K. BENNETT, M. H. J.; SMID, E. J.; KETS, E. P. W. Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scout A. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 4, p. 516-522, 2000.
- KÉROUANTON, A.; HENNEKINNE, J.A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; De BUYSER, M.L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 369-375, 2007.
- KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 117-40. 1994.
- KLOOS, W. E., BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., et al. (ed.) **Manual of clinical microbiology**. 6. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p.282-298. 1995.
- KUHN, R.; BIELIG, H. J. Über invertseifen. I; die Einwirkung von Invertseifen auf Eiweissstoffe. **Ber. dt. chem. Ges.** v.73, p. 1080. 1940.
- LAMAITA, H. C. **Frequência de espécies de Staphylococcus, de TSST-1 e de enterotoxinas estafilocócicas em leite cru refrigerado em propriedades de Minas Gerais**. 2003. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte
- LANCIOTTI, R.; GIANOTTI, A.; PATRIGNANI, N.; BELLETI, N.; GUERZONI, M. E.; GARDINI, F. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life of minimally processed fruits. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, n.3-4, p.201-208, 2004.
- LAWRYNOWICZ-PACIOREK, M.; KOCHMAN, M.; PIEKARSKA, K.; GROCHOWSKA, A.; WINDYGA, B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 319-323, 2007.

- LEISTINER, L. Principle and applications of Hurdle Technology. In: g. w. Gould (ed.) **New Methodos of Food Preservation**, Blackie Academic and Professional, London, p. 1-21, 1995.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- LEMAY, W. J.; CHOQUETTE, J.; DELAQUIS, P. J.; GARIÉPY, C.; RODRIGUE, N.; SAUCIER, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooled and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 217-226, 2002.
- LEUSCHNER, R. G. K.; ZAMPARINI, J. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar *enteridis* in broth model systems and mayonnaise. **Food Control**, v. 13, n. 6-7, p. 399-404, 2002.
- LIVERA, A. V. S.; SANTOS, A. C. O.; MELO, E. A.; REGO, J. C.; GUERRA, N. B. Condições higiênico-sanitárias de segmentos da cadeia alimentar de Pernambuco. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 42, p. 51-56, 1996.
- LIN, Y. T.; LABBE, R. G.; SHETTY, K. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, n. 4, p. 453-458, 2005.
- LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273. 2003.
- LÜCK, E.; JAGER, M. **Conservación química de los alimentos**: características, uso, efectos. 2. ed., Zaragoza: Acribia, 2000
- MACKAY, M. L., MILNE, K.; GOULD, I. M. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. **International Journal Antimicrobial and Agents**, v. 15, n. 2, p. 125-129. 2000.
- MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **Internacional Journal Food Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 187-195, 2001.
- McKEEGAN, K.S.; BORGES-WALMSLEY, I.; WALMSLEY, A. Microbial and viral drug resistance mechanisms. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 8-13, 2002.
- MEEHAN, P. J.; ATKESON, T.; KEPNER, D. E.; MELTON, M. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving two different pathogens. **American Journal of Epidemiology**, v. 136, n. 5, p. 611-616, 1992.
- MELO, E. A.; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N. B. Characterization of antioxidants compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 38, n. 1, p. 15-19, 2005.

MENDONÇA, A.T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota**. 2004. 72f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

MENON, K. V.; GARG, S. R. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. **Food Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 647-650, 2001.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; LERKIVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, v.71, n.1, p.79-83, 2000.

MIMS, C. A.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROIT, I. M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. Ed. Manole Ltda, São Paulo. 1995.

MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 565-570, 2005.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, v. 13, n. 4-5, p. 289-292, 2002.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NAVEENA, B. M.; MUTHUKUMAR, M.; SEN, A. R.; BABJI, Y.; MURTHY, T. R. K. Improvement of shelf-life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. **Meat Science**, v. 74, n. 2, p. 409–415. 2006.

NAZER, A. I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J. L.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 391-398, 2005.

NEMA, V. N.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D. V.; GOEL, A. K.; SINGH, L. Isolation and characterizations of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 29-35, 2007.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 1, p.73-79, 2005.

NOSTRO, A.; CANNATELLI, M. A.; MUSOLINO, A. D.; PROCOPIO, F.; ALONZO, V. *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 181-184, 2002.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

NOVAK, J.; CHRISTINA, B.; LANGBEHN, B.; PARK, F.; SKOULA, M.; GORSIOU, Y.; FRANZ, C. M. Ratios of cis- and trans- sabinene hydrate in *Origanum marjorana* L. and *Origanum midrophyllum* (Bentham). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 7, n. 28, p. 697-704, 2000.

ODY, P. **O guia das plantas medicinais**. Livros e Livros: Lisboa, 2001. 350p.

ORDEN, J. A.; GOYACHE, J.; HERNANDEZ, J.; DOMENECH, A.; SUAREZ, G.; GOMEZ-LUCIA, E. Applicability of an immunoblot technique combined with a semi – automated eletrophoresis systems for detect of staphylococcal enterotoxins in food extrats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 4083-85, 1992.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. L. et al. Biochemical and biological properties of *Staphylococcal* enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 360-366, 2001.

OUTTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R.A.; PIETTE, G. J. P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat 134 spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, n. 2-3, p. 155-162, 1997.

OZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of essential oils of Turkish plant spices. **European Food Research Technology**, v. 212, n. 6, p.658-660, 2001.

PASSOS, M. H. C. R.; KUAYE, A.Y. Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas- SP no período de 1987 a 1993. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 77-82, 1996a.

PASSOS, M. H. C. R.; KUAYE, A.Y. Relato de surtos de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus* importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 71-76, 1996b.

PAUL-SATYASEELA, M.; VAN BELKUM, A.; SHIVANNAVAR, C. T.; GADDAD, S. M. Carriage of capsulated strains of *Staphylococcus aureus*: a population-based study performed in Gulbarga, South India., **Epidemiology and infection**, v. 132, n. 5, p. 831-8. 2004.

PEREIRA, G.I. **Dinâmica populacional de *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina a inoculado em queijo prato**. 2006. 85f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PETHICA, B. A. Bacterial lysis. Lysis by physical and chemical methods. **Journal of General Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 473-473, 1958.

PLATEL, K.; SRIVASAN, K. Lack of antidiabetic influence of cumin (*Cuminum cyminum*) seeds and bitter ground (*Momordica charantia*) juice in experimental rats. **Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 91-94, 2004.

- PRADO-PALOS, M. A. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA) em profissionais de saúde e as interfaces com as infecções nosocomiais. 2006. 188 f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 569–575, 2003.
- PRASAD, M. M.; SEENAYYA, G. Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt. **Food Research International**, v. 33, n. 9, p. 793-798, 2000.
- PROCTOR, M. E.; DAVIS, J. P. Escherichia coli 0157:H7 infection in Wisconsin, 1992-1999. **Wisconsin Medical Journal**, v. 99, n. 1, p. 32-37, 2000.
- PRIESTLEY, C. M.; WILLIAMSON, E. M.; WAFFORD, K. A.; SATTELLE, D. B. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 140, p. 1363–1372, 2003.
- PULLMAN, J. E.; REYNOLDS, L. Some observations on the mode of action of phenol on *Escherichia coli*. **Australian Journal of Pharmacy**, v. 46, p. 580-584. 1965.
- RADHAKRISHNAN-SRIDHAR, S.; VELUSAMY-RAJAOPAL, R. Antifungal activity of some essential oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p. 7596-7599, 2003.
- RADÜNZ, L.L.; MELO, E.C.; BERBERT, P.A.; GRANDI, A.M.; ROCHA, R.P. Efeito da temperatura de secagem na quantidade e qualidade do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham). **XXX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola – CONBEA**, 2001.
- RAY, B. **Fundamental food microbiology**. Boca Raton: CRC Press, 1996. 515p.
- REDDY, A. C. P.; LOKESH, B. R. Studies on the anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rat. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 38, n. 4, p. 349-358, 1994.
- RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 632-639, 2003.
- RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. Atheneu: Rio de Janeiro, 2005. 455p.
- RISTORI, C. A.; PEREIRA, M. S.; GELLI, D. S. O efeito da pimenta do reino moída frente a contaminação *in vitro* com *Salmonella rubislaw*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 2, p. 131-133, 2002.

RODRIGUES, K. L.; MOREIRA, A. N.; ALMEIDA, A. T. S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M. J.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Intoxicação estafilocóca em restaurante comercial. **Ciência Rural**, v. 34, n.1, p. 297-299, 2004.

ROLLER, S.; COVILL, N. The fungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1-2, p. 67-77, 1999.

RUSSELL, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 191-201, 1991.

SAGDIÇ, O.; KUSÇU, A.; OZCAN, M.; OZÇELIK, S. Effects of Turkish spices extracts at various concentrations on the growth of Escherichia coli O157:H7. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 473-480, 2002.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogens pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrossols. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.36, p.467-473, 2003.

ŞAHİN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v.15, n.7, p.549-557, 2004.

SALGADO, M. M.; PIGNATARI, A. C.; BELLINATI-PIRES, R. Phagocytosis and killing of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by human neutrophils and monocytes. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 80-9. 2004.

SALIMATH, B. P.; SUNDERESH, C. S.; SRINIVAS, L. Dietary components inhibit lipid peroxidation in erythrocyte membrane. **Nutrition Research**, v. 6, n. 12, p. 1171-1178, 1986.

SALTON, M. R. J. The bactericidal properties of certain cationic detergents. **Australian Journal of Soil Research**, v. 3. p. 45. 1950

SALTON, M. R. J. The adsorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellulose constituents and its bactericidal effects. **Journal of General Microbiology**, v. 5, p. 391. 1951

SALTON, M. R. J. The relationship between the nature of the cell wall and the Gram-stain. **Journal of General Microbiology**, v. 30, p. 223-235. 1963.

SALTON, M. R. J.; FBEER, J. H. Composition of the membranes isolated from several Gram-positive species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 107, n. 3, p. 531-538. 1965.

SALTON, M. R. J. The action of lytic agents on the surface structures of the bacterial cell. In Proc. 2nd Int. Congr. **Surfam Activity**, London: Butterworth. 1967.

SANDEL, M. K.; MCKILLIP, J. L. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. **Food Control**, v. 15, n. 1, p. 5-10, 2004.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, D. A. **O papel do manipulador de alimentos em surtos de intoxicação alimentar causados por espécies de Staphylococcus ocorridos em quatro cidades do Estado de Minas Gerais, Brasil**. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SCHULMIJL, N. H.; RIDEAL, E. K. Molecular interaction in monolayera. I. Complexes between large molecules. **Pmc. R. SOCB**. v. 122, p. 29, 1937.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects os spices. **Journal of Food Safety**, Connecticut, v. 6, n. 1, p. 29-44, 1983.

SILVA, A. F.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, E. A. M.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 6, p. 1-7. 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococcus coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 32-40, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, Cap. 18, p. 387-416. 1999.

SIQUI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43. 2000.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAU, E.; NICOLAU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and citotoxic activities of *Origanum vulgare* essential oil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 1202-1205, 1996.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Development and evaluation of a model predicting the survival of *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1646-1653, 2000.

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NICHAS, G. J. E. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2002.

SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M. Natural antimicrobials for food preservation. In: RAHMAN, M.S. **Handbook of food preservation**. New York: Marcel Decker. p. 285-308. 1999.

- SORIANO, J. M.; FONT, G.; MOLTÓ, C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 2, p. 60-67, 2002.
- SOUSA, C. P. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: an evolutionary view. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 26-31, 2003.
- SOUZA, E. L.; SILVA, C. A.; SOUZA, C. P. Qualidade sanitária de equipamentos, superfícies, água, e mãos de manipuladores de alguns estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de João Pessoa, PB. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 116/117, p. 98-102, 2004.
- SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. T.; BARBOSA FILHO, J. M. B. Orégano (*origanum vulgare* L., lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 19, n.132, p. 40-45, 2005.
- SOUZA, E. L.; GUERRA, N. B.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 1, p. 22-25, 2006.
- SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, p. 409-413, 2007.
- SRINIVASAN, K. Spices influence of body metabolism: an overview of three decades of research. **Food Research International**, v. 38, n. 1, p. 77-86, 2005.
- STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; NETO, A. C. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.
- STECHINI; M. L.; SARAIS, L.; GIAVEDONI, P. Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophilla* in a culture media and in cooked pork. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 5, p. 406-409, 1993.
- SU, Y.; WONG, L. A. C. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 195-202, 1997.
- SUBRAMONYAN, A.; SATAYANARAYANA, M. N. Influence of certain dietary plant constituents on platelet aggregation. **Journal of Food Safety**, v. 9, n. 2, p. 201-210, 1989.
- TASSOU, C. C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish filests in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere on air. **Journal Food Protection**, Iowa, v. 59, n. 1, p. 31-34, 1995.
- TAVARES, M.; LOBANCO, C. M.; SAKUMA, H. Produtos de confeitaria salgados: avaliação microbiológica e físico-química. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 14, n. 1, p. 26-32, 1996.

THE BRITISH PHARMACOPOEIA SECRETARIAT (2009). "Index, BP 2009". Disponível em: <http://www.pharmacopoeia.co.uk/pdf/2009_index.pdf>. Acesso em 5 Julho de 2009.

TODD, E. C. D. Foodborne diseases in six countries. A comparison. **Journal of Food Protection**, 60, 715-723, 1997.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.

ULTEE, A.; SLUMP, R. A.; STEGING, G.; SMID, E. J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 5, p. 620-624, 2000.

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

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

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

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1992. 1219p.

VARLET, N. Overview of the essential oils economy. **Acta Horticulturae**. v. 333, p. 65-67, 1993.

VASCONCELOS, E.C.; ZAPATA, J.F.F.; FIGUEIREDO, E.A.; CASTELO BRANCO, M.A.A.; BORGES, A.S. A microbiota da carcaça e da carne ovina tratada com ácido acético, embalada a vácuo e maturada por 48 dias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 272-277, 2002.

VELUTTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 2-3, p. 145-154, 2003.

VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO M. G. F. D. O, ROSSETTO, C. A. V. Evaluation of essential oils from *Allium sativum* and *Cinnamomum zeilanicum* and their toxicity against fungi of the *Aspergillus flavus* group. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 915-919, 2005.

VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S.; ERNST, E.; KLEPSE, M.; DEMIRCI, B.; BASER, H.; VAN WYK, B. E. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) - the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, 137-143, 2003.

WEBB, M.; CRAZE, R. **O guia das plantas & especiarias**. Livros e Livros: Lisboa, 2001.

WHITE, D. G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S, WAGENR, D. D.; McDERMOTT. P. F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infections**, v. 4, n. 4, p. 405-412, 2002.

WIENKÖTTER, N.; F. BEGROW, U. KINZINGER, D. SCHIERSTEDT, E.J. VERSPOHL. "The Effect of Thyme Extract on β_2 -Receptors and Mucociliary Clearance". **Planta Medica**, v. 73, n. 7, p. 629–635, 2007.

WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana das especiarias. **Higiene Alimentar**, v. 12, p. 26-29, 1999.

WILLATGAMUWA, S. A.; PLATEL, K.; SARAXWATHI, G.; SRINIVASAN, K. Antidiabetic influence of dietary cumin seeds in streptozotocin induced diabetic rats. **Nutrition Research**, v. 18, n. 1, p. 131-142, 1998.

WOOLHOUSE, M.E.J. Population biology of emerging and re-emerging pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 3-7, 2002.

XU, H; DELLING, M; JUN, J. C; CLAPHAM, D. E. "Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels". **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 628–35, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A - **Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat model using synergies of phenolic compounds and organic acids**

Inibição de *Staphylococcus aureus* em modelo alimentar caldo carne e carne utilizando sinergias entre compostos fenólicos e ácidos orgânicos

Artigo Publicado na revista:

Food Microbiology (Janeiro 2010)

doi:[10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.019](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.019)

Autores

Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira

Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Nelson Justino Gomes Neto

Evandro Leite de Souza

Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat model using synergies of phenolic compounds and organic acids

C.E.V. de Oliveira ¹, T.L.M. Stamford¹, N.J. Gomes Neto ², E.L. de Souza ²

¹ *Laboratory of Fermentation, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

² *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

ABSTRACT

This study assessed the occurrence of an enhancing inhibitory effect of the combined application of thymol and carvacrol with lactic and acetic acid against *Staphylococcus aureus* using the determination of Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index and kill-time assay in meat broth and in a food model (meat). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of carvacrol and thymol were 1.25 and 0.6 $\mu\text{L/mL}$, respectively. FIC indices of the combined application of the phenolic constituents and organic acids were 0.5 suggesting a synergic interaction. No difference ($p>0.05$) was found among the bacterial counts for the meat broth added of the phenolics alone or in combination with lactic acid at sub-inhibitory concentrations. Contrarily, the bacterial counts found for the meat broth added of the phenolics alone were significantly lower ($p>0.05$) than the counts obtained for the broth added of the combination of phenolics and acetic acid. No difference ($p>0.05$) was found among the bacterial counts for the meat model added of phytochemicals alone and in combination with the organic acids. The tested antimicrobials alone or in mixture provided smaller antistaphylococcal effect in meat broth than in meat model. These results could arise as an interesting approach for the improvement of food preservation using more natural procedures, considering the current demand of consumer and sensory quality of foods.

Key-words: Phenolic compounds, Organic acids, Antimicrobial synergy, Food model

1. Introduction

Staphylococcus aureus is a common pathogen associated with serious community and hospital acquired diseases and has long been considered a major problem of Public Health (Pesavento et al., 2007). *S. aureus* secretes two types of toxin with super-antigen activity, staphylococcal enterotoxins (SEs) and toxic shock syndrome toxin (TSST-1). SEs form a family of major serological types of heat-stable enterotoxins that cause vomiting and diarrhoea when ingested and are responsible for staphylococcal food poisoning (Nostro et al., 2002). Twenty different types of SEs, i.e., SEA-SEE, SEG-SER, and SEU have already been discovered, however SEA-SEE are the most common enterotoxins involved in staphylococcal food poisoning (Jørgensen et al., 2005).

Since staphylococcal foodborne intoxication is established as one of the most common bacterial food-borne diseases causing problems in the food sector in many countries, strategies to control *S. aureus* in foods are of particular interest. Meat and meat products are regarded as one of the leading vehicles for transmission of *S. aureus* (Blaiotta et al., 2004). Et al., 2004). Despite this, a number of outbreaks have been attributed to contaminated meat products (de Boer et al., 2009; Chiang et al., 2008).

The disturbing of staphylococcal intoxication worldwide, coupled with the resultant social and economic implications, suggests a striving to produce safer food and develop new antimicrobial agents. Concern over the negative consumer perception to chemical preservatives has provoked researchers to investigate the antimicrobial efficacy of more natural compounds against food-related pathogenic microorganisms (Nostro et al., 2002; Smith-Palmer et al., 2001; Gutierrez et al., 2009).

The essential oil from oregano (Nostro et al., 2004; Souza et al., 2006) and its main constituents, the phenolics thymol and carvacrol (Juven et al., 1994; Del Nobile et al., 2009) have been found to antagonize some food-related bacteria. When added to synthetic media essential oils and constituents were more effective against bacteria in vitro than when added to food systems. This reduction in efficacy might represent a limitation to the use of these substances as antimicrobial agents in foods, since the addition of high concentrations is likely to impart a certain flavor to foods (Naveena et al., 2006).

Foods generally associated with herbs, spices or seasonings would be the least affected by this phenomenon and information on the flavor impact of oregano essential oil and its major constituents in meat and fish supports this (Burt, 2004). Although previous have proposed that whole essential oils have a greater antibacterial activity than the major

components, the combination of them with other compounds possessing some antimicrobial effect can achieve an enhanced efficacy. The addition of small amounts of other natural preservatives may be a way to provide the balance between sensory acceptability and antimicrobial efficacy (Dimirtiević et al., 2007).

Weak organic acids are either naturally present as constituents of the food, produced in different fermented foods by desirable foodgrade starter cultures, or added to the products through the food formulation. Lactic acid lacks in acute and chronic toxicity, which has led to its widespread employment as a food preservative and decontamination agent (Gonçalves et al., 2005). Acetic acid is usually used as vinegar (4%) or as salts of sodium and calcium at 25% higher levels in pickles, salads, dressings, and sauces (Gonçalves et al., 2005).

Although, some researchers have found antimicrobial activity in thymol and carvacrol, there is a lack of information about their antimicrobial effect when applied in combination with other antimicrobial compounds. This study was undertaken to investigate the occurrence of enhancing anti-staphylococcal effect on the base of FIC index and kill-time assay between the phenolics thymol and carvacrol and organic acids in food-based broth and in a food model. To our knowledge, the effect of the combined application of phenolic compounds and organic acids at sub-inhibitory concentrations against some food-related pathogen has not been reported to date.

2. Material and methods

2.1 Antimicrobial agents

Acetic acid P.A. (85–90%) and lactic acid (85–90%) were obtained from Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, Brazil). Thymol and carvacrol were supplied by Sigma Adrich (Sigma, France). Solutions of the acids were prepared in distilled water. Solutions of thymol and carvacrol were prepared in nutrient broth using bacteriological agar (0.15 g/100 mL) as stabilizing agent (Bennis et al., 2004).

2.2 Bacterial strains

S. aureus QCD, *S. aureus* QCE and *S. aureus* QCF obtained from the Microorganism Collection, Laboratory of Food Microbiology, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil were used as test microorganisms. These strains were isolated from different unripened cheese samples by the standard procedures (Bennett et al., 1986;

AOAC, 1995). Stock cultures were kept on nutrient agar (Sigma, France) slants under refrigeration.

Inocula used in antimicrobial assays were obtained from overnight cultures grown on nutrient agar slants at 37 °C. A loopfull of the culture was diluted in sterile saline solution (0.85 g/100 mL) to have a final concentration of approximately 10^8 colony forming unit per mL (cfu/mL) adjusted according to the turbidity of 0.5 McFarland standard tube.

2.3 Preparation of meat broth

Bovine meat steaks were trimmed for all external fat and cut in pieces of uniform sizes (3×3×3 cm). Meat pieces were boiled at 80 °C for 20 min. About 500 mL of meat broth were obtained and vacuum filtered using Whatman no. 1 filter paper. The filtrate was sterilized using an autoclave for 15 min (121 atm). The broth was cooled at room temperature and used in experimental assays.

2.4 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

In early study lactic and acetic acid showed MIC value of 0.6 and 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively, toward the tested strains (Souza et al., 2009). MIC and MBC values of thymol and carvacrol were determined using the macrodilution in broth procedure. 5 mL of double strength nutrient broth was inoculated with 1 mL of the bacterial inocula. After that, 4 mL of the phytochemical solutions at concentrations ranging of 320 to 0.015 $\mu\text{L}/\text{mL}$ was added and followed by shaking for 30 s. The system was incubated for 24 h at 37 °C without shaking. MIC was defined as the lowest concentration of the phytochemical required to prevent visible bacterial growth. An aliquot (100 μL) of the tubes with no visible bacterial growth was subcultured on sterile nutrient agar Petri dishes at 37 °C for 48 h to determine if the inhibition was reversible or permanent. MBC was defined as the lowest concentration at which no growth was noted on the agar. Control flasks without the phytochemicals were tested in the same way.

2.5 Synergy assays

The assays of synergy of thymol and carvacrol with lactic and acetic acid were carried out by determining Fractional Inhibitory Concentration (FIC) in nutrient broth using the macrodilution method. FIC was calculated as follow: MIC of the phytochemical in combination with organic acid/MIC of the phytochemical alone. Phenolic compounds and organic acids were combined at MIC+ MIC; MIC+ $\frac{1}{2}$ MIC; MIC+ $\frac{1}{4}$ MIC; $\frac{1}{2}$ MIC+ $\frac{1}{2}$ MIC; $\frac{1}{4}$ MIC+ $\frac{1}{4}$ MIC; and $\frac{1}{2}$ MIC+ $\frac{1}{4}$ MIC. Synergy was FIC \leq 0.5; addition was FIC $>$ 0.5 to 4; and antagonism was FIC $>$ 4 (Gutierrez et al., 2008).

2.6 Kill-time assays

The effect of the antimicrobials alone (MIC) and in combination ($\frac{1}{4}$ MIC+ $\frac{1}{4}$ MIC) on the cell viability of *S. aureus* over 96-h was evaluated by the viable cell count procedure. For this, 5 mL of meat broth was inoculated with 1 mL of the bacterial inocula and 5 mL of the antimicrobial solution (final concentration of MIC or $\frac{1}{4}$ MIC) were added to the system and gently shaken for 30 s. The system was incubated at 37 °C. At different time intervals (0, 24, 48, 72 and 96 h), 1 mL of the suspension was serially diluted (10^{-1} – 10^{-5}) in sterile peptone water (0.1 g/100 mL) and inoculated on nutrient agar Petri dishes for 24 h at 37 °C (Viljoen et al., 2003). Control flasks with no phytochemical or organic acid were tested in the same way. The mean number of colonies was counted and compared with that found in the control assay. The results were expressed in log of cfu/mL.

2.7 Meat model

Bovine meat steaks were trimmed for all external fat and cut in pieces of uniform sizes (3×3×3 cm). The meat pieces were put in glass flasks and sterilized using an autoclave (121 °C for 15 min, 121 atm). After that, meat pieces were inoculated with a staphylococcal suspension as follows: the pieces were individually submerged in 50 mL of the bacterial inoculum (*S. aureus* QCE containing approximately 10^7 cfu/mL, prepared in sterile 0.85 g/100 mL saline solution), rotated with sterile glass stick for 1 min to ensure even inoculation, air dried for 30 min in a bio-safety cabinet before washing with the antimicrobials. The pieces were randomly divided into nine groups and immersed for 30 s (1:4 w/v) as follows: (1) control —dipped in sterile distilled water; (2) dipped in thymol MIC solution; (3) dipped in carvacrol MIC solution; (4) dipped in lactic acid MIC solution; (5) dipped in acetic lactic MIC

solution; (6) dipped in thymol solution ($\frac{1}{4}$ MIC)+lactic acid solution ($\frac{1}{4}$ MIC); (7) dipped in thymol solution ($\frac{1}{4}$ MIC)+acetic acid solution ($\frac{1}{4}$ MIC); (8) dipped in carvacrol solution ($\frac{1}{4}$ MIC)+lactic acid solution ($\frac{1}{4}$ MIC); (9) dipped in carvacrol solution ($\frac{1}{4}$ MIC)+acetic acid solution ($\frac{1}{4}$ MIC). The pieces were put in sterile sealed polypropylene cups and stored under refrigeration ($7\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). At 0, 24, 48, 72 and 96 h of storage the meat samples were submitted to count of *S. aureus* according to procedure described by AOAC (1995). The results were described in log of cfu per gram of meat (log cfu/g of meat). All antimicrobial assays were carried out in triplicate and the results are expressed as an average of the three parallel assays.

2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was performed to determine significant differences ($p < 0.05$) by ANOVA followed by Tukey test in the bacteria kill time assays (Barros et al., 2009; Souza et al., 2009). For this Sigma stat 3.1 computer program was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Thymol and carvacrol showed MIC of 0.6 and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively, toward all test strains. MBC were two-fold higher than the corresponding MIC. Findings of this study support the observations of other researchers about the efficacy of thymol and carvacrol in inhibiting the growth of food-related pathogens (Kim et al., 1995; Cosentino et al., 1999). Earlier studies found MIC of carvacrol and thymol against *S. aureus* in a range of 0.17–0.45 and 0.14–0.22 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively (Cosentino et al., 1999; Lambert et al., 2001).

Antimicrobial compounds, used as preservatives in foods, often impart some flavor to products. Therefore, researchers have searched for optimized combinations of substances to reach antimicrobial efficacy at sufficient low concentration so as not to adversely affect the organoleptic acceptability of foods (Gutierrez et al., 2009). FIC indexes for the combined application of carvacrol and thymol with lactic and acetic acid on *S. aureus* strains are shown in Table 1.

Table 1. FIC indexes of the combined action of carvacrol and thymol with acetic and lactic acid to *S. aureus* strains.

Strains	Carvacrol		Thymol	
	Carvacrol + LA	Carvacrol + AA	Thymol + LA	Thymol + AA
<i>S.aureus</i> QCD	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>S. aureus</i> QCE	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>S. aureus</i> QCF	0.5	0.5	0.5	0.5

LA: lactic acid. AA: acetic acid.

FIC indices were 0.5 for all strains suggesting a synergic interaction of the assayed antimicrobials. At theory, synergy is found when the effect of the combined compounds is greater than the sum of the individual effects. Test strains presented capability to grow at sub-inhibitory concentrations ($\frac{1}{2}$ MIC and $\frac{1}{4}$ MIC) of all antimicrobials when applied alone.(data not showed).

[Gutierrez et al. \(2008\)](#) assessed the occurrence of synergy of some essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Pseudomons aeruginosa* in synthetic media by the FIC index assay. The authors found no synergistic effect for the combination of the essential oils, although an additive effect of the combination of thyme and marjoram ($0.5 \leq \text{FIC} \leq 1.0$) has been noted. [Gutierrez et al. \(2009\)](#) found an additive effect of the interaction of oregano and thyme essential oils against *Enterobacter cloacae*, *Listeria innocua* and *Pseudomonas fluorescens* in lettuce leaf model media. These essential oils possess high percentage of carvacrol and thymol.

Previous studies has noted successful applications of essential oil compounds in combination with other classical or emerging preservative methods, in order to reduce or control the presence of food-borne pathogen and spoilage microorganisms in/on foods ([Mahmoud et al., 2006](#); [Ahn et al., 2007](#)). A number of potential synergists have been suggested for use as essential oils and/or their components, as nisin ([Periago and Moezelaar, 2001](#)), sodium nitrite ([Tassou et al., 1995](#)), NaCl ([Wendakoon and Sakaguchi, 1995](#)), mild heat treatment ([Karatzas et al., 2000](#)) and pulsed-electric-field ([Pol and Smid, 1999](#)).

It is reported that the application of natural compounds for controlling food-related microorganisms demands the evaluation of efficacy with food model media and food products since the food components may reduce their antimicrobial effect ([Gutierrez et al., 2008](#)). Authors have purposed that results obtained in food model media (e.g. meat broth, vegetables broth, milk broth) may be more useful prior to further application in/on food matrices, rather

than those obtained in laboratorial media. Gutierrez et al. (2009) state that these food-based liquid models would also reflect the nutrient availability and composition of foods optimizing the final application of these compounds.

Kill-time of *S. aureus* QCE when exposed to phenolic compounds and organic acids alone and in combination in meat broth is given in Fig. 1.

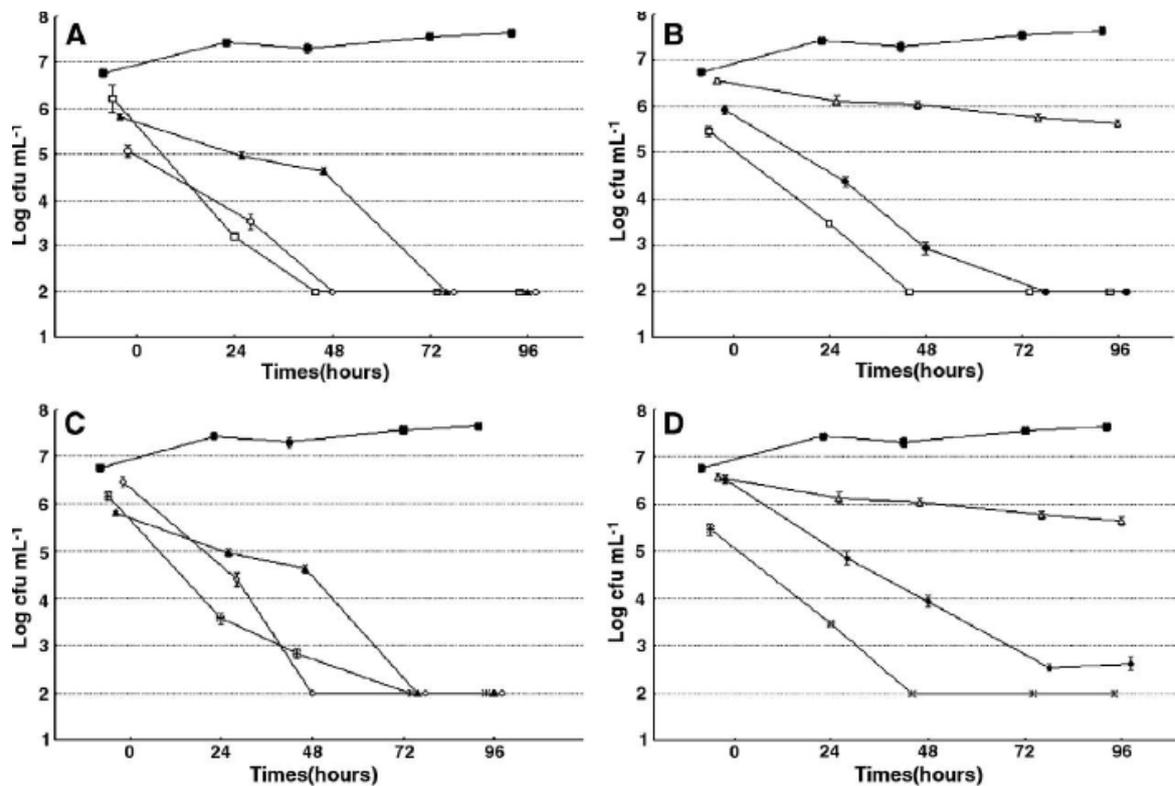


Fig. 1. Survivors curves for *S. aureus* QCE in meat broth at 37 °C as a function of antimicrobial concentration: A — (■): control (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (□): carvacrol (MIC: 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▲): lactic acid (MIC: 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (○): carvacrol ($1/4$ MIC: 0.03 $\mu\text{L}/\text{mL}$)+lactic acid ($1/4$ MIC: 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$); B — (■): control (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (□): carvacrol (MIC: 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (Δ): acetic acid (MIC: 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (●): carvacrol ($1/4$ MIC: 0.03 $\mu\text{L}/\text{mL}$)+acetic acid ($1/4$ MIC: 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$); C — (■): control (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (○): thymol (MIC: 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▲): lactic acid (MIC: 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (◇): thymol ($1/4$ MIC: 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$)+lactic acid ($1/4$ MIC: 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$); D — (■): control (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (○): thymol (MIC: 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (Δ): acetic acid (MIC: 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (◆): thymol ($1/4$ MIC: 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$)+acetic acid ($1/4$ MIC: 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Addition of carvacrol (1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and thymol (0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$) to the broth caused a sharp drop in the bacterial count after 24 h and values under two log cycles were maintained in the remainder evaluated times. MIC of lactic acid (2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) proved more effective against *S. aureus* in meat broth than acetic acid (0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Lactic acid caused a linear decrease of bacterial count until 72 h, and values below two log cycles were maintained after 96 h. Combination of thymol and carvacrol with organic acids at sub-inhibitory

concentrations provided a reduction over two log cycles in initial bacterial inocula after 24 h. No significant difference ($p>0.05$) was found among the bacterial counts for the meat broth added of the phenolics alone or in combination with lactic acid. The bacterial counts found for the meat broth added of the phenolics alone were significantly lower ($p>0.05$) than the counts obtained for the broth added of the mixture of phenolics and acetic acid at sub-inhibitory concentrations.

Results of kill-time of *S. aureus* QCE when exposed to phenolic compounds and organic acids alone and in combination in a meat model are given in Fig. 2.

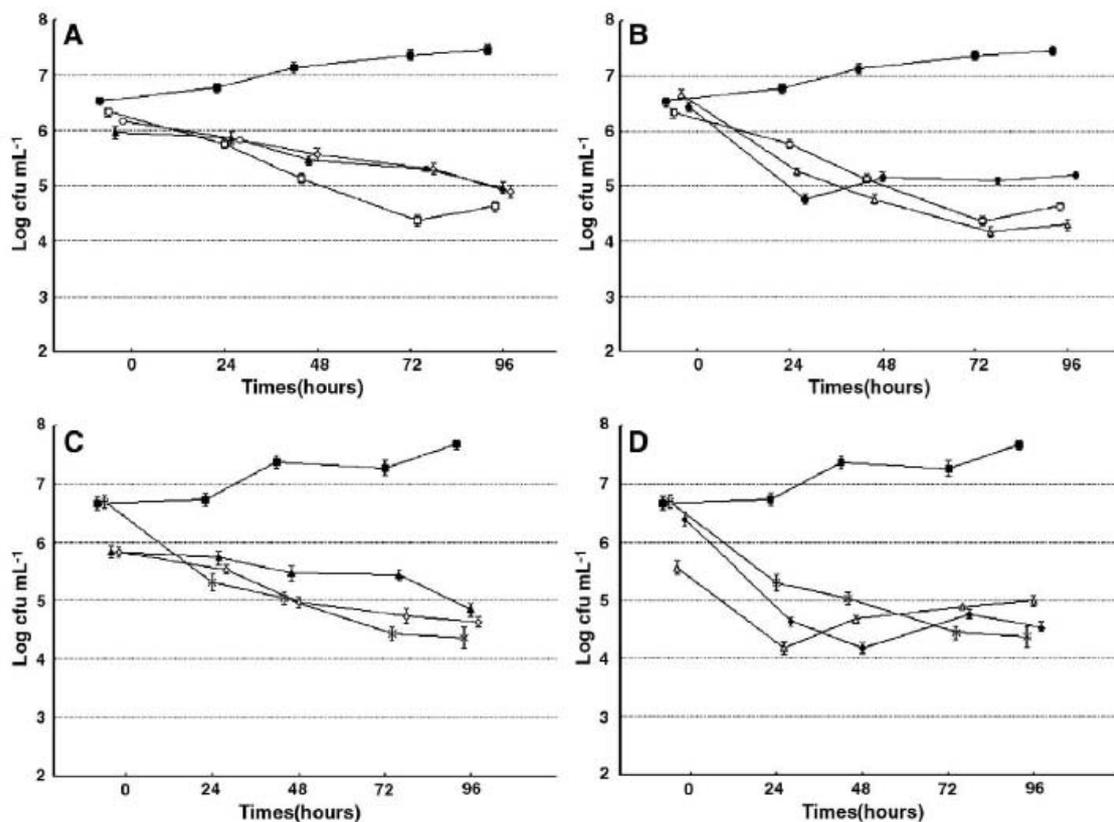


Fig. 2. Survivors curves for *S. aureus* QCE in meat at 7 °C as a function of antimicrobial concentration: A — (■): control (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (□): carvacrol (MIC: 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▲): lactic acid (MIC: 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (○): carvacrol ($1/4$ MIC: 0.03 $\mu\text{L}/\text{mL}$)+lactic acid ($1/4$ MIC: 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$); B — (■): control (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (□): carvacrol (MIC: 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (Δ): acetic acid (MIC: 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (●): carvacrol ($1/4$ MIC: 0.03 $\mu\text{L}/\text{mL}$)+acetic acid ($1/4$ MIC: 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$); C — (■): control (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (○): thymol (MIC: 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▲): lactic acid (MIC: 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (\diamond): thymol ($1/4$ MIC: 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$)+lactic acid ($1/4$ MIC: 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$); D—(■): control (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (○): thymol (MIC: 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▲): acetic acid (MIC: 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (\diamond): thymol ($1/4$ MIC: 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$)+acetic acid ($1/4$ MIC: 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

The combination of thymol and carvacrol with acetic acid reduced the initial inocula to four log cycles after 24 and 48 h, respectively, although a slight recovering in the count

occurred over the remainder times. The application of antimicrobials alone or in mixtures in meat caused significant decrease ($p < 0.05$) in microbial count over the evaluated intervals in comparison to the control assay. Moreover, no difference ($p < 0.05$) was found for the counts found in meat treated with the antimicrobial alone or in mixture.

In general, anti-staphylococcal effect of all treatments was smaller in meat when compared to its addition in meat broth. These results could suggest a difficulty of the antimicrobials to disperse into the food model, since it could impair the contact of antimicrobials with target microorganisms. Solubility problems of apolar antibacterial constituents (e.g. thymol and carvacrol) are supposed to have some important limiting effect on their performance in food systems (Canilac and Mourey, 2001). The lower antimicrobial effect of phenolic compounds when applied in food models, might be explained in terms of solubility and phase distribution parameters. Thymol and carvacrol are much more soluble in the other constituents of foods than in aqueous phase, where the bacterial proliferation takes place (Burt, 2004).

The presence of nitrogenous compounds and fat in meat products could negatively influence the antimicrobial activity of phenolic constituents. Reactions of thymol (and/or carvacrol) and amino acid and proteins might explain its reduced antimicrobial activity in protein rich foods. Complexation takes place by hydrogen bonds between phenolics groups and peptide link, and by hydrophobic interaction (Spencer et al., 1988). However, phenolics–protein complexation depends particularly on the characteristics of the protein, partly on pH and partly on the characteristic of the phenolic molecule, such as the molecular size, conformational flexibility and water solubility (Juven et al., 1994).

It is difficult to understand the exact mechanism for the establishment of the enhancing antimicrobial effect caused by the combined application of carvacrol and thymol with organic acids. Research studies on the antibacterial mechanism of phenolic compounds have found damage to cellular membrane changing their structure and function (Dimirtiević et al., 2007). Lin et al. (2004) suggest that the damage to the cell membrane might explain the synergic effects, since phenolics as carvacrol and thymol could cause sublethal injury to the bacterial cell membrane causing it to become more susceptible to acid environments. Moreover, at low pH the molecules of thymol and carvacrol are mostly dissociated, more hydrophobic, and bind better to hydrophobic regions of the membrane

proteins resulting in better partition into the lipid phase of the bacterial membrane (Juven et al., 1994).

The results presented in this study showed a synergic effect of phenolic compounds and organic acids on the base of FIC index. The combination of the assayed antimicrobials at sub-inhibitory concentrations caused an interesting decrease of *S. aureus* counts in meat broth and in the meat model. Still, these results could arise as an interesting approach for the improvement of food preservation using more natural procedures, considering the current demand of consumers and the sensory quality of foods.

Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Brazil) for financial support.

References

- Ahn, J., Grun, I.U., Mustapha, A., 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiology** 24, 7–14.
- AOAC International, 1995. Official Methods of Analysis 16th ed. AOAC **International**, Arlington, VA. sec. 975.55.
- Barros, J.C., da Conceição, M.L., Gomes Neto, N.J., da Costa, A.C.V., Siqueira Júnior, J.P., Basílio Júnior, I.D., Souza, E.L., 2009. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT-Food Science and Technology** 42, 1139–1143.
- Bennett, R.W., Yeterian, M., Smith, W., Coles, C.M., Sassaman, M., McClure, F.D., 1986. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. **Journal of Food Science** 51, 1337–1339.
- Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., Remma, A., 2004. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Letters in Applied Microbiology** 38, 454–458.
- Blaiotta, G., Ercolini, D., Pennacchia, C., Fusco, V., Casaburi, A., Pepe, O., 2004. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus spp* strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology** 97, 719–730.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology** 94, 223–253.
- Canillac, N., Mourey, A., 2001. Antimicrobial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology** 18, 261–268.
- Chiang, Y.-C., Liao, W.-W., Fan, C.-M., Pai, W.-Y., Chiou, C.-S., Tsen, H.-Y., 2008. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology** 121, 66–73.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Santa, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology** 29, 130–135.
- de Boer, E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., Wit, B., Huijsdens, X.W., de Neeling, A.J., Bosch, T., van Oosteron, R.A.A., Vila, A., Heuvelink, A.E., 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. **International Journal of Food Microbiology** 134, 52–56.
- Del Nobile, M.A., Di Benedetto, N., Suriano, N., Conte, A., Lamacchia, C., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., 2009. Use of natural compounds to improve the microbial stability of Amaranth-based homemade fresh pasta. **Food Microbiology** 26, 151–156.

Dimirtiević, S.I., Mihajlovski, K.R., Antonović, D.G., Milanović-Stevanović, M.R., Mijin, D. Z., 2007. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry** 74, 774–782.

Gonçalves, A.C., Almeida, R.C.C., Alves, M.A.O., Almeida, P.F., 2005. Quantitative investigation on the effects of chemical treatments in reducing *Listeria monocytogenes* population on chicken breast meat. **Food Control** 16, 617–622.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology** 124, 91–97.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology** 26, 142–150.

Jørgensen, H.J., Mathisen, T., Lovseth, A., Omoe, K., Qvale, K.S., Loncarevic, S., 2005. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters** 252, 267–272.

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antimicrobial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology** 76, 623–631.

Karatzas, A.K., Bennik, M.H.J., Smid, E.J., Kets, E.P.W., 2000. Combined action of Scarvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott. A. **Journal of Applied Microbiology** 89, 296–301.

Kim, J., Marshall, M.R., Conelli, J.A., Preston, J.F., Wei, C.I., 1995. Antimicrobial activity of some essential oil components against five food-borne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 43, 2839–2845.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E., 2001. A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology** 91, 453–462.

Lin, Y.T., Labbe, R.G., Shetty, K., 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat system by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. **Applied and Environmental Microbiology** 70, 5672–5678.

Mahmoud, B.S., Yamazaki, K., Miyashita, K., Kawai, Y., Shin, I.S., Suzuki, T., 2006. Preservative effect of combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds on carp fillets during conventional air-drying. **International Journal of Food Microbiology** 106, 331–337.

Naveena, B.M., Muthukumar, M., Sen, A.R., Babji, Y., Murthy, T.R.K., 2006. Improvement of shelf-life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. **Meat Science** 74, 409–415.

- Nostro, A., Cannatelli, M.A., Musolino, A.D., Procopio, F., Alonzo, V., 2002. Helichrysum italicum extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology** 35, 181–184.
- Nostro, A., Blanco, A.R., Canntelli, M.A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Roccaro, A.S., Alonzo, V., 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters** 230, 191–195.
- Periago, P.M., Moezelaar, R., 2001. Combines effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the variability of different strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology** 68, 141–148.
- Pesavento, G., Ducci, B., Comodo, N., Nostro, A.L., 2007. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: a research for methicilin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Control** 18, 196–200.
- Pol, I.E., Smid, E.J., 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Bacteriology** 29, 166–170
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservation in soft cheese. **Food Microbiology** 18, 463–470.
- Souza, E.L., Stamford, T.L., Lima, E.O., 2006. Sensitivity of spoiling and pathogen-food related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology** 37, 527–532.
- Souza, E.L., Barros, J.C., da Conceição, M.L., Gomes Neto, N.J., Costa, A.C.V., 2009. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Microbiology** 40, 387–393.
- Spencer, C.M., Cay, Y., Martin, R., Gaffney, S.H., Goulding, P.N., Magnolete, D., Lilley, T.H., Haslam, E., 1988. Poly-phenols complexation. Some thoughts and observations. **Pythochemistry** 27, 2397–2409.
- Tassou, C., Drosinos, E.H., Nychas, G.-J.E., 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteridis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. **Journal of Applied Bacteriology** 78, 593–600.
- Viljoen, A., Van Vuuren, S., Ernst, E., Klepser, M., Demirci, B., Baser, H., 2003. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) – the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **Journal of Ethnopharmacology** 88, 137–143.
- Wendakoon, C.N., Sakaguchi, M., 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobacter aerogenes by active components in spices. **Journal of Food Protection** 58, 280–283.

APÊNDICE B - Influence of carvacrol and thymol on physiological characteristics and enterotoxins production by *S. aureus* strains isolated from foods

Influencia do carvacrol e timol sobre as características fisiológicas e de produção de enterotoxinas de *S. aureus* isolados de alimentos

Artigo submetido para publicação na revista:

Food science and tecnologia (Agosto 2009)

Autores

Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira

Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Nelson Justino Gomes Neto

Evandro Leite de Souza

Influence of carvacrol and thymol on physiological characteristics and enterotoxins production by *S. aureus* strains isolated from foods

Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira¹, Tânia Lúcia Montenegro Stamford¹, Nelson Justino Gomes Neto², Evandro Leite de Souza^{2*}

¹ *Laboratory of Fermentation, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

² *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

*Author for Correspondence: Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Abstract

This study evaluated the influence of the phenolics carvacrol and thymol on some physiological characteristics and modulation of secretion of the staphylococcal virulence factors, coagulase and enterotoxin. It was also, to study possible mechanisms for the establishment of the anti-staphylococcal activity of these compounds. Subinhibitory concentrations (0.3 and 0.15 $\mu\text{L mL}^{-1}$) of carvacrol and thymol strongly inhibited the activity of the enzymes coagulase and lipase, in addition to cause a significant loss of salt tolerance. The suppression of enterotoxins production occurred totally in the both tested phenolics subinhibitory concentrations. Loss of 260-nm-absorbing material and potassium ions occurred immediately after addition of carvacrol and thymol at 0.6 and 1.2 mL^{-1} . Electron microscopy of carvacrol- and thymol-treated cells revealed the formation of roles in the cell surfaces and loss of cytoplasm material.

Keywords: phenolics, physiological suppression, staphylococcal enterotoxins, virulence.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is a common pathogen associated with serious community and nosocomial infections and known as major cause of food-poisoning by the production of enterotoxins when grown in foods [1]. The occurrence of the intoxication caused by *S. aureus* depends on the capability of the strain to survive, multiply under a variety of conditions and produce extracellular compounds [2]. Haemolysins, nuclease, coagulase, lipase and staphylococcal enterotoxins are among the extracellular toxins and enzymes produced by *S. aureus*.

Staphylococcal enterotoxins (SEs) comprise a group of heat stable and serologically different proteins. Twenty different types of SEs, *i.e.*, SEA-SEE, SEG-SER, and SEU have already been discovered, however SEA-SEE are the most common enterotoxins involved in staphylococcal food poisoning [3].

Since staphylococcal foodborne intoxication represents a public health problem worldwide, the development of strategies to control the survival and growth of *S. aureus* in foods are of great interest [4]. Particularly, the increased demand for safe and natural foods has provoked researchers to investigate the antimicrobial efficacy of many natural compounds against some food-related pathogen microorganisms [5]. The current trend about the negative consumer perception to chemical preservatives prompts a particular increased interest in the use of essential oils as antimicrobial compounds to be applied in food conservation [6, 7].

The essential oil from oregano has been found to antagonize several food-related bacteria [8, 9]. Early study on the antimicrobial property of oregano essential oil found that this oil strongly inhibited the growth and some metabolic characteristics of food-isolated *S. aureus* strains, including the activity of coagulase, lipase and salt tolerance [4]. Some researchers have reported high content of phenolics compounds in oregano essential oil, mostly carvacrol and thymol, which are probably the responsible for its prominent antimicrobial effect [10, 11].

Although, previous researchers have found antimicrobial activity in carvacrol and thymol toward food-related microorganisms [12, 13], there is a lack of information about their efficacy in inhibiting physiological characteristics of *S. aureus*, including some attributes of virulence. The aim of this study was to verify if subinhibitory concentrations of the purified phenolic major components of oregano essential oil, carvacrol and thymol, exerts influence on some physiological characteristics of *S. aureus* strains isolated from foods,

including enterotoxins production. It was also, to study possible mechanisms for the establishment of the anti-staphylococcal activity of these compounds.

2. Material and Methods

2.1 Test organisms

S. aureus QCD, *S. aureus* QCE and *S. aureus* QCF obtained from the Microorganism Collection, Laboratory of Food Microbiology, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil were used as test microorganisms. These strains were isolated from different unripened cheese samples by the standard procedures [14, 15]. Stock cultures were kept on Nutrient Agar – NA (Sigma, France) slants under refrigeration.

Inocula used in the assays were obtained from overnight cultures grown on NA slants at 37 °C. A loopfull of the culture was diluted in sterile saline solution (0.85 g 100mL⁻¹) to have a final concentration of approximately 10⁸ colony forming unity per mL (cfu mL⁻¹) adjusted according to the turbidity of 0.5 McFarland standard tube.

2.2 Phenolics

The phenolics carvacrol and thymol were supplied by Sigma Aldrich (Sigma, France). Stock solutions were prepared in Nutrient Broth - NB (Sigma, France) using bacteriological agar (0.15 g 100mL⁻¹) as stabilizing agent [16]. Previous assays found values of Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration of 0.6 and 1.2 µL mL⁻¹, respectively, for both carvacrol and thymol toward the test strains included in this study (not published data).

2.3 Assays of enzymatic activity and salt tolerance

The activity of lipase was estimated on Agar Salty Tween - AST [17] containing: (g L⁻¹) peptone 10.0; NaCl 75.0; CaCl₂H₂O 0.10; Tween 80 10; pH 7.2. 100 µL of the bacterial cultures grown overnight in NB (37 °C) and diluted (10⁻¹ - 10⁻⁴) in sterile peptone water (0.1 g 100mL⁻¹) were plated onto the AST and AST added of subinhibitory concentrations of carvacrol (AST-C) or thymol (AST-T) followed for incubation at 37 °C for 24 h. After the period of incubation, the numbers of colonies (cfu mL⁻¹) presenting positive lipase activity on

each AST plate were counted and compared to those on AST-C and AST-T plates, and the results were expressed as a percentage of inhibition.

For testing the activity of coagulase, a 100 μL aliquot of the inocula was transferred to Brain Heart Infusion (Sigma, France) broth added of subinhibitory concentrations of carvacrol or thymol and incubated at 37 °C for 24 h. After the incubation period, the activity of coagulase was estimated by the standard procedures [15], and the results were expressed in level (-; + to +++) of the coagulase test regarding the size of the formed plasma clot.

Preliminary experiments were performed for evaluating the salt tolerance of the strains. For this, untreated cultures were spread-plated onto sterile NA and NA containing NaCl at 5 to 100 g L^{-1} (NA-NaCl) in order to find concentration of NaCl that modestly inhibited the colony-forming ability of treated suspensions. Suspensions of bacteria were overnight treated with sub-inhibitory concentrations of carvacrol or thymol in NB (37 °C). After that, 100 μL of the cultures were diluted (10^{-1} - 10^{-4}) in sterile peptone water (0.1 g 100mL^{-1}) and plated onto NA-NaCl at 37 °C for 24 h [18]. Control flasks without phenolics were tested in the same way. After the period of incubation, the numbers of cfu mL^{-1} of each NA-NaCl plate were compared to those found for the control assay, and the results were expressed as a percentage of cells able to form colonies.

2.4 Assay of enterotoxins production

The production of staphylococcal enterotoxins was estimated by immunological assay using the VIDAS Staph Enterotoxin II (SET2) Kit (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France) and the Mini VIDAS apparatus - AOAC RI N° 070404. For this, a loopfull of an overnight culture grown in NB at 37 °C was suspended in Brain Heart Infusion broth added of subinhibitory concentrations of the phenolics and incubated for 18 h under static conditions at 37 °C. After the incubation period, the growth media was centrifuged (3 000 rpm per 15 min), and an aliquot of the supernatant was taken and submitted to enterotoxins detection test according to the procedures described by the manufacturer. Results were expressed in positive (+) and (-) negative enterotoxin production. Tubes without the phenolics were tested in the same way as positive control assay.

2.5 Assay of potassium ions efflux

The potassium ions concentration in bacterial suspension was measured after exposure to carvacrol and thymol in sterile peptone water (0.1 g 100mL^{-1}) for 0, 30, 60 and 120 min. At each pre-established intervals, the extracellular potassium concentration was

measured by a photometric procedure using the kit Potassium (Human GmbH, Wiesbaden, Germany). Control flasks without antimicrobials were tested in the same way. Results were expressed in amount of extracellular free potassium (mmol L^{-1}) in the growth media in each interval of incubation.

2.6 Release of cellular material

The release of cellular material absorbing at 260 nm from *S. aureus* cells was carried out in aliquots of 2 mL of the bacterial inocula containing approximately 1.0×10^8 cfu mL^{-1} in sterile peptone water ($0.1 \text{ g } 100\text{mL}^{-1}$) added of carvacrol and thymol at 37 °C. At 0, 30, 60 and 120 min of treatment, cells were centrifuged at 3500 rpm, and the absorbance of the obtained supernatant at 260 nm was determined in a Biochrom Libra S32/S32 spectrophotometer [18]. Control flasks without carvacrol and thymol were tested in the same way. Results were expressed in percent of material absorbing at 260 nm in each interval in respect of the last time.

All antimicrobial assays were carried out in triplicate and the results were expressed as average of the parallel assays.

2.7 Cell morphology by scanning electronic microscopy

After an overnight treatment with carvacrol or thymol in BHI broth at 37 °C, the bacterial cells were pre-fixed with 2 % glutaraldehyde for 2 h at 4 °C. Postfixation was carried out using a 2 % osmium tetroxide solution during 30 min at 30 °C. After each fixation the cells were washed twice with PBS. The cells were then dried at a critical point in liquid CO_2 under 95 bar pressure and after that gold covered by cathodic spraying (Fine coat ion sputter JFC-1100, JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Finally the cells were examined with a scanning electron microscope (JEOL JSM-5600LV, PAIS) as previously described [16].

3. Results

3.1 Enzymatic activity

Proportion of *S. aureus* cells presenting lipase negative activity colonies after exposure to sub-inhibitory concentrations of carvacrol or thymol was monitored (Table 1).

Table 1 - Proportion of *S. aureus* cells presenting lipase negative activity colonies onto Salty Tween agar (STA) and Salty Tween agar added of carvacrol or thymol at sub-inhibitory concentrations.

Strains	AST	AST-C		AST-T	
		0.3 $\mu\text{L mL}^{-1}$	0.15 $\mu\text{L mL}^{-1}$	0.3 $\mu\text{ mL}^{-1}$	0.15 $\mu\text{L mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> QCD	0 % *	50 %	48 %	50 %	49 %
<i>S. aureus</i> QCE	0 % *	51 %	49 %	52 %	50 %
<i>S. aureus</i> QCF	0 % *	51 %	49 %	51 %	49 %

AST-C: Agar Salt-Tween added of carvacrol

AST-T: Agar Salt-Tween added of thymol

* All colonies grown in AST showed lipase positive activity

Incubation of the cultures with sub-inhibitory concentrations of both compounds revealed strong inhibition of the lipase activity. Carvacrol and thymol at 0.3 and 0.15 $\mu\text{L mL}^{-1}$ provided an inhibition of lipase activity over 50 % in all test strains.

The effect of carvacrol and thymol on the coagulase activity of *S. aureus* cells is shown in Table 2.

Table 2 - Effect of sub-inhibitory concentrations of carvacrol and thymol on coagulase activity in *S. aureus* strains.

Strains	Control	Carvacrol		Thymol	
		0.3 $\mu\text{L mL}^{-1}$	0.15 $\mu\text{L mL}^{-1}$	0.3 $\mu\text{ mL}^{-1}$	0.15 $\mu\text{L mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> QCD	++++	-	++	-	+++
<i>S. aureus</i> QCE	++++	-	++	-	+++
<i>S. aureus</i> QCF	++++	-	++	-	++

AST-C: Agar Salt-Tween added of carvacrol

AST-T: Agar Salt-Tween added of thymol

The phenolics at 0.3 $\mu\text{L mL}^{-1}$ caused large reduction in coagulase activity, where no clot was formed after incubation of the cultures in the presence of rabbit plasma. When carvacrol or thymol were added to the growth medium at 0.15 $\mu\text{L mL}^{-1}$ a smaller reducing effect was noted in cells, which revealed levels ++ (level 2) or +++ (level 3) of coagulase activity.

3.2 Salt tolerance

The growth of *S. aureus* cells exposed to carvacrol or thymol in salt-added agar was assessed in order to verify the influence of these compounds on the bacterial salt tolerance (Table 3).

Table 3 - Proportion of *S. aureus* cells able to form colonies on NA supplemented with 75 g NaCl L⁻¹ (NA-NaCl) after exposure to carvacrol or thymol at sub-inhibitory concentrations.

Strains	Control	AST-C		AST-T	
		0.3µL mL ⁻¹	0.15µL mL ⁻¹	0.3µ mL ⁻¹	0.15µL mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> QCD	100 %	0 %	12 %	0 %	10 %
<i>S. aureus</i> QCE	100 %	0 %	8 %	0 %	11 %
<i>S. aureus</i> QCF	100 %	0 %	9 %	0 %	16 %

AST-C: Agar Salt-Tween added of carvacrol

AST-T: Agar Salt-Tween added of thymol

The addition of subinhibitory concentrations of the phytochemicals clearly reduced the colony-forming ability of the treated cells in the selective medium. Treatment with carvacrol and thymol at 0.3 µL mL⁻¹ suppressed totally the capability of the cells to form colonies on NA-NaCl. At the lower concentration (0.15 µL mL⁻¹) the phenolics also caused a reduction in the capability to form colonies on NA-NaCl, however in a lesser extent (8 – 16 %).

3.3 Enterotoxin production

The influence of carvacrol and thymol at subinhibitory concentrations on the enterotoxin production by *S. aureus* QCF was evaluated (Table 4).

Table 4 - Effect of carvacrol and thymol at subinhibitory concentrations on the enterotoxin production by *S. aureus* QCF.

Compound added (µL mL ⁻¹)	Enterotoxin production
Control (none)	+
Thymol	
0.3 ^a	-
0.15 ^b	-
Carvacrol	
0.3 ^a	-
0.15 ^b	-

^a: MIC x 1/2; ^b: MIC x 1/4

Early assays showed that *S. aureus* QCF presented highlighted capability to produce enterotoxins in comparison to other strains included in this study. Cultures that grew in the presence of the phytochemicals in both tested concentrations revealed a total inhibition of enterotoxins production.

3.4 Loss of 260-nm-absorbing material and release of potassium ions

In attempt to elucidate the cause of the anti-staphylococcal effect the loss of 260-nm-absorbing material (table 5) and release of potassium ions of cells treated with carvacrol and thymol at 0.3 and 0.6 $\mu\text{L mL}^{-1}$ was evaluated (Figure 1).

Table 5 - Rate of 260nm absorbing material release from *S. aureus* QCF treated by carvacrol or thymol.

Time (min)	Carvacrol		Thymol	
	0.3 $\mu\text{L mL}^{-1}$ A ₂₆₀	0.6 $\mu\text{L mL}^{-1}$ A ₂₆₀	0.3 $\mu\text{L mL}^{-1}$ A ₂₆₀	0.6 $\mu\text{L mL}^{-1}$ A ₂₆₀
	(%)	(%)	(%)	(%)
0	66.01	93.48	36.87	40.67
30	88.71	98.49	61.11	57.09
60	89.30	100	66.56	69.45
120	100	100	100	100

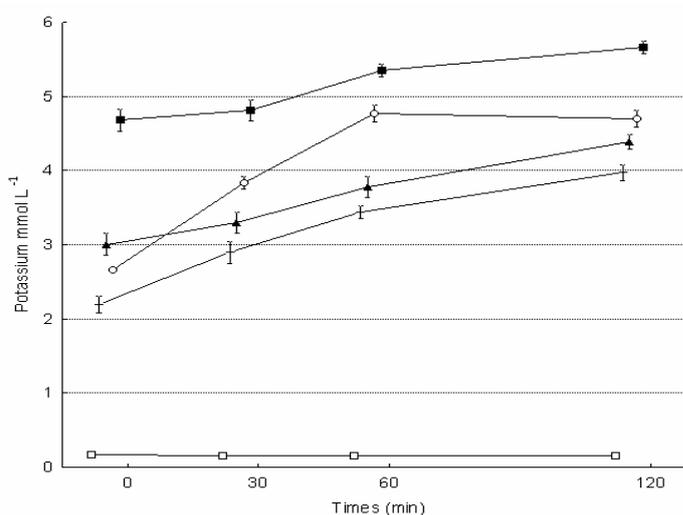


Figure 1 – Leakage of potassium ions from *S. aureus* QCF induced by exposure to carvacrol and thymol along 120 min at 37 °C (□: control, 0 $\mu\text{L mL}^{-1}$; +: thymol, 0.6 $\mu\text{L mL}^{-1}$; ▲: thymol, 0.12 $\mu\text{L mL}^{-1}$; ○: carvacrol, 0.6 $\mu\text{L mL}^{-1}$; ■: 0.12 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

The DO_{260nm} of the filtrates of *S. aureus* QCF cells exposed to carvacrol and thymol showed increasing values along the evaluated times. The efflux of potassium ions from *S.*

aureus cells occurred immediately after the addition of the phenolics and followed a steady loss along the evaluated intervals. Carvacrol provided higher loss of 260-nm-absorbing material and leakage of potassium ions in comparison to thymol.

No leakage of potassium was observed when *S. aureus* grew in media without the phenolics. These results simply purpose that increased permeability of membrane is a factor involved in the establishment of the anti-staphylococcal property of the tested compounds.

3.6 Scanning electron microscopy

Regarding that the assayed phenolics components caused a release of cellular compounds of *S. aureus* QCF, the effect of carvacrol and thymol on the bacterial surface cells was investigated. The electron microphotography obtained from scanning microscopy showed some morphological damages due to treatment with these phenolics at $1.2 \mu\text{L mL}^{-1}$ (Figure 2a e b), although the damage provided by carvacrol seemed to be greater from that observed to thymol. It might be observed that surface of some cells were consistently deformed revealing a projecting appearance of cellular materials, but some cells in background did not present alterations. Untreated cells showed no changes in cell surface morphology (Figure 2c).

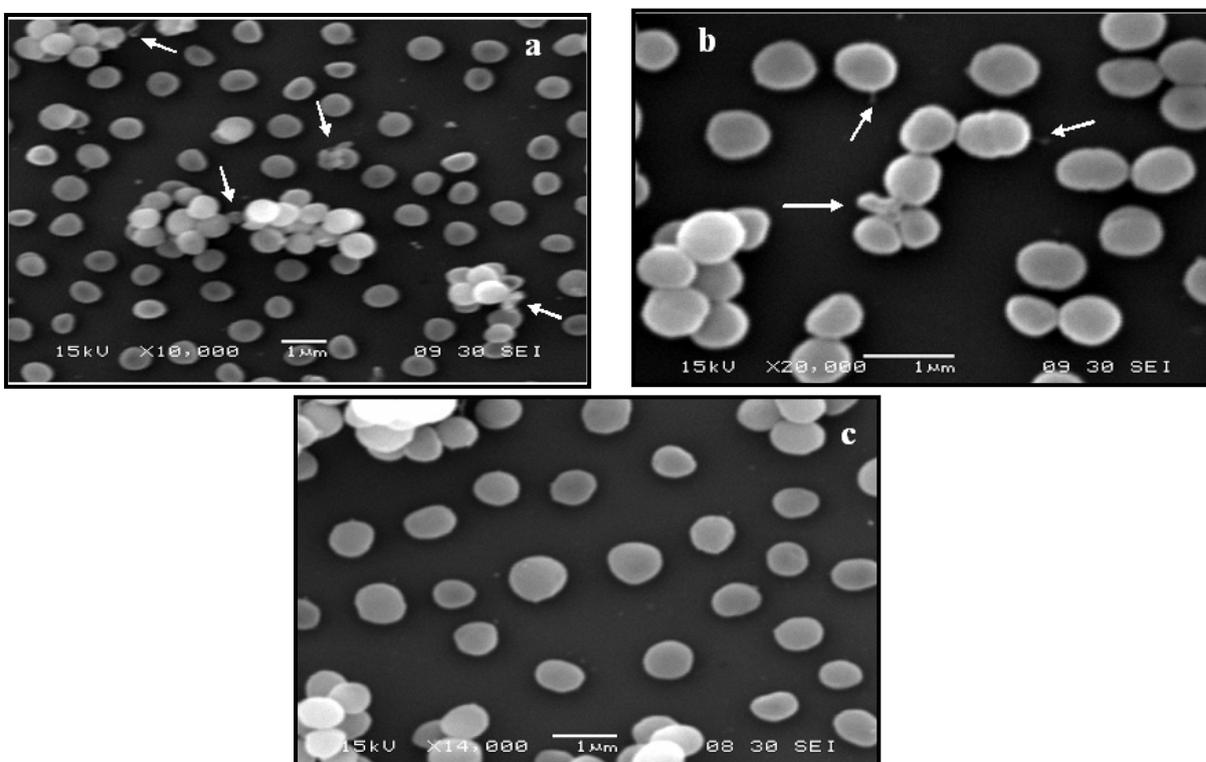


Figure 2 – Scanning electron microphotography of *S. aureus* QCF after treatment with carvacrol and thymol. (a) carvacrol: $1.2 \mu\text{L mL}^{-1}$; (b) thymol $1.2 \mu\text{L mL}^{-1}$; (c) control: $0 \mu\text{L mL}^{-1}$.

These findings suggests that both tested compounds could exert their anti-staphylococcal activity causing damage to cell envelop, which play a fundamental role in the life of bacteria.

1. Discussion

The effect of the phenolics carvacrol and thymol on some physiological characteristics and morphological aspects of *S. aureus* strains isolated from foods was reported. It was clear that the assayed compounds interfered strongly in physiological behavior of the test strains. For all observed parameters, the tested compounds interfered on the microbial metabolic activity in dose-dependent manner.

Assays of coagulase and lipase revealed that carvacrol and thymol suppressed a lot the enzymatic activity of *S. aureus*. These compounds also demonstrate to be effective at reducing or inhibiting the production of staphylococcal enterotoxins. Such phenotypic modifications possibly arise as result of a direct or indirect interaction of the phytochemicals and the enzyme [19]. The reduction in lipase and coagulase activity of the cells and synthesis of enterotoxins is probably due to a prevention of the secretion of proteins as consequence of changes in the physical nature of the staphylococcal cytoplasm membrane [20; 21]. Still, it is reported that the intercalation of active plant compounds into the cytoplasm membrane may interfere with process of membrane-associated signal transduction and decrease the efficiency of function of a number of membrane proteins resulting in changes to the architecture and composition of cell wall [22, 23].

Some plant products when tested at subinhibitory concentrations may interfere on the secretion of virulence factors in bacteria. *Helichrysum italicum* extract was effective in inhibiting the enterotoxins production (SEB and SEC) and activity of coagulase and lipase in *S. aureus* cells [17, 20]. Likewise, the extract of *Nepeta cataria* caused suppression of the activity of these enzymes in a number of *S. aureus* strains [19]. The extract of *Punica granatum* L. was found to inhibit staphylococcal enterotoxin (SEA) production [24].

Sublethal injury of bacterial cell membrane may interfere on their permeability and affect the capability to osmoregulate the cell adequately or to exclude toxic materials [4, 18]. Exposure of *S. aureus* cells to carvacrol and thymol strongly reduced the capability of the cells to form colonies on selective media added of salt. The loss of salt tolerance has been cited to reveal membrane damage in sublethally injured bacterial cells [25]. These observations are in accordance with the results of the loss of 260-nm-absorbing material and

leakage of potassium ions, since that addition of thymol and carvacrol to the growth media caused fast loss release of cellular material. These experiments were carried out simultaneously and led us to suppose that the accumulation of phenolics compounds in the cytoplasm membrane becoming increasingly permeable to protons and ions and causing lose of their integrity might be responsible for the establishment of their anti-staphylococcal activity.

Marked leakage of cytoplasm material and potassium ions is used an indicative of gross and irreversible damage to the cytoplasm membrane [26]. Some essential oil and their compounds induce loss of 260-nm-absorbing material including tea tree oil [16, 27, 28]. Significant loss of 260-nm-absorbing material is reported to suggest loss of nucleic acid thorough a damaged cytoplasmic membrane [18].

As expected the electron microscopy micrographs showed important damages of *S. aureus* cells submitted to treatment with carvacrol and thymol overnight. Surfaces of some individual cells seemed to be significantly deformed resulting in projection of cellular material, although cells in background did not show apparent surface alterations. Furthermore, scanning electron microscopy observations may suggest that carvacrol and thymol cause membrane damage accompanied by important surface alterations in *S. aureus* cells. These antimicrobial mechanisms could also affect the entire envelop of the bacterial cell. Structures like blebs in the outside surface of the cells treated with the phenolic compounds may represent collection of cytoplasmic constituents which were pushed through cracks produced in cell wall. Our results presenting great release of OD 260 nm absorbing material reinforce this supposition. Similar observations were previously noted in *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Saccharomyces cerevisiae* [10, 16].

Membrane active compounds are cited to denature proteins and disrupt membrane structure, leading to cytoplasm leakage, cell lysis and death [12]. Early studies revealed that phytochemicals, including phenolic compounds, are able to disrupt and penetrate into lipid structures [10]. These findings have reinforced the hypothesis that these compounds inhibit the microbial viability in a fashion similar to membrane active disinfectants [29].

New antimicrobials with capability to inhibit the secretion of virulence attributes, in addition to inhibit the growth and survival of pathogen bacteria in foods, could be extremely effective in decrease the occurrence of foodborne diseases. Our results showed by the first time that the phenolics carvacrol and thymol at subinhibitory concentrations interfere strongly on some physiological characteristics of *S. aureus* cells, including the suppression of enterotoxins production. The observations of loss of cellular material and altered cell surfaces

morphology suggested that the gross damage of the cell cytoplasm membrane resulting in disruption of proteins secretion could be responsible for these effects. These findings show that further investigations are required for evaluating the antimicrobial properties of phenolics compounds and their influence on metabolic characteristics of other foodborne pathogens microorganisms.

Acknowledges: The authors thank to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, Brazil) for the financial support.

References

- [1] V. Pereira, C. Lopes, A. Castro, J. Silva, P. Gibbs, P. Teixeira. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from various foods in Portugal. *Food Microbiol* 26 (2009); 278-282.
- [2] K. Shale, J.F.R. Lues, P. Venter, E.M. Buys (2005). The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. *Food Microbiol* 22 (2005); pp. 433-438.
- [3] H.J. Jørgensen, T. Mathisen, A. Lovseth, K. Omoe, K.S. Qvale, S. Loncarevic. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol Let* 252 (2005), pp.267-272.
- [4] J.C. Barros, M.L.C. Conceição, N.J. Gomes Neto, A.C.V. Costa, J.P. Siqueira Júnior, I.D. Basílio Júnior, E.L. Souza. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Lebensm-Wiss u-Technol* 42 (2009); 1139-1143.
- [5] R.A. Bento, T.L.M. Stamford, G.M. Campos-Takaki, T.C.M. Stamford, E.L. Souza. Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. *Braz J Microbiol* 40 (2009); pp.583-589.
- [6] E.L. Souza, T.L.M. Stamford, E.O. Lima, V.N. Trajano. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Cont* 18 (2007), pp.409-413.
- [7] J. Gutierrez, C. Barry-Ryan, P. Bourke. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int J Food Microbiol* 124 (2008), pp.91-97.
- [8] A. Nostro, A.R. Blanco, M.A. Cannatelli, V. Enea, G. Flamini, I. Morelli, A.S. Roccaro, V. Alonzo. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Let* 230 (2004), pp.191-195.
- [9] E.L. Souza, T.L. Stamford, E.O. Lima, E.O. Sensitivity of spoiling and pathogen-food related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. *Braz J Microbiol* 37 (2006), pp.527-532.
- [10] K. Rhayour, T. Bouchikhi, A. Tantaoui-Elaraki, K. Sendide, A. Remmal. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components. *J Essent Oil Res* 15 (2003); pp.286-292.
- [11] S. Burt. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol* 94 (2004), pp.223-253.

- [12] R.J.W. Lambert, P.N. Skandamis, P. Coote, P., G.J.E. Nychas. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol, and carvacrol. *J Appl Microbiol* 91 (2001), pp.453-462.
- [13] A. Ultee, M.H.J. Bennik, R. Moezelaar. The phenolic group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 68 (2002), pp.161-1568.
- [14] R.W. Bennett, M. Yeterian, W. Smith, C.M. Coles, M. Sassaman, F.D. McClure. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. *J Food Sci* 51 (1986), pp.1337-1339.
- [15] C. Vanderzant, D.F. Splittstoesser. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington D.C.: American Public Health Association (APHA): 1992.
- [16] S. Bennis, F. Chami, N. Chami, T. Bouchikhi, A. Remma. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Let Appl Microbiol* 38 (2004), pp.454-458.
- [17] A. Nostro, G. Bisignano, M.A. Cannatelli, G.Crisaf, M.P Germano, V. Alonzo. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 17 (2001), pp.517-520.
- [18] C.F. Carson, B.J. Mee, T.V. Riley. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assay and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2002), pp.191-1920.
- [19] A. Nostro, M.A. Cannatelli, G. Crisafi, V. Alonzo. The effect of *Nepeta cataria* extract on adherence and enzyme production of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 18 (2001), pp.583-555.
- [20] A. Nostro, M.A. Cannatelli, A.D. Musolino, F. Procopio, V. Alonzo. *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Let Appl Microbiol* 35 (2002); pp.181-184.
- [21] S. Shah, P.D Stapleton, P.W. Taylor. The polyphenol (-)-epicatechin gallate disrupts the secretion of virulence-related proteins by *Staphylococcus aureus*. *Let Appl Microbiol* 46 (2008), pp.181-185.
- [22] S. Okubo, H. Ikigai, M. Toda, T. Shimamura. (1989). The anti-haemolysin activity of tea and coffee. *Let Appl Microbiol* 9 (1989), pp.65-66.
- [23] H. Ikigai, M. Toda, S. Okubo, Y. Hara, T. Shimamura. Relationship between the anti-haemolysin activity and the structure of catechins and theaflavins. *Nippon Saikingaku Zasshi* 45 (1990); 913-919.

- [24] L.C. Braga, J.W. Shupp, C. Cumming, M. Jett, J.A. Takahashi, L.S. Carmo, E. Chartone-Souza, A.M.A. Nascimento. Pomegrate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxins production. *J Ethnopharmacol* 96 (2005), pp.335-339.
- [25] J.J. Iandolo, Z.J. Ordal, Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 91 (1966); 134-142.
- [26] S.E. Walsh, J.-Y. Maillard, A.D. Russel, C.E. Catrenich, D.L. Charbonneau, R.G. Bartolo. Activity and mechanism of action of selected biocidal agents on Gram-positive and – negative bacteria. *J Appl Microbiol* 94 (2003); 240-247.
- [27] S.D. Cox, C.M. Mann, J.L. Markhan, H.C. Bell, J.E. Gustafson, J.R. Warmington, S.G. Wyllie. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 88 (2000); pp.170-175.
- [28] S.D. Cox, C.M. Mann, J.L. Markhan, J.E. Gustafson, J.R. Warmington, S.G. Wyllie. D. Determining the antimicrobial action of tea tree oil. *Molecules* 6 (2001): 87-91.
- [29] J.E. Gustafson, Y.C. Liew, S. Chew, J. Markhan, H.C. Bell, S.G. Wyllie, J.R. Warmington. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Let Appl Microbiol* 26 (1998), pp.194-198.

8 Considerações Finais

- O estudo mostrou um efeito sinérgico dos compostos fenólicos, em concentrações sub-inibitórias, e ácidos orgânicos na diminuição da concentração de *S.aureus*.
- Redução considerável de *S. aureus* em caldo carne e no modelo carne.
- Pela primeira vez estes resultados mostram que o timol e o carvacrol interferem fortemente sobre algumas características fisiológicas das células de *S. aureus*, incluindo supressão da produção de enterotoxinas.
- As observações de perda de material genético e morfologia da superfície celular sugerem um dano bruto na membrana citoplasmática da célula.
- O timol e o carvacrol quando combinados com ácidos orgânicos em doses baixas, são uma alternativa para controlar o crescimento de *S. aureus* em carne, sugerindo assim uma abordagem interessante para melhoria da conservação de alimentos que utilizam procedimentos naturais, considerando ainda a qualidades organolépticas.

Anexos

Anexo A

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

Assunto: Your Submission

De: "Vijay K. Juneja" <vijay.juneja@ars.usda.gov>

Data: Sab, Novembro 21, 2009 9:11 am

Para: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Ms. Ref. No.: FOOD-D-09-00852R1

Title: Inhibition of Staphylococcus aureus in broth and meat model using synergies of phenolic compounds and organic acids
International Journal of Food Microbiology

Dear Souza,

I am pleased to inform you that your paper "Inhibition of Staphylococcus aureus in broth and meat model using synergies of phenolic compounds and organic acids" **has been accepted for publication in International Journal of Food Microbiology.**

Further information on the handling of your manuscript as well as the scheduled time of publication may be obtained at:

<http://authors.elsevier.com>

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

Yours sincerely,

Vijay K. Juneja

Editor

International Journal of Food Microbiology

Comments from the editors and reviewers:

For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author Support at authorsupport@elsevier.com

Global telephone support is available 24/7:

For The Americas: +1 888 834 7287 (toll-free for US & Canadian customers)

For Asia & Pacific: +81 3 5561 5032

For Europe & rest of the world: +353 61 709190

Laboratório de Microbiologia de Alimentos

Departamento de Nutrição
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba
Fone: 083 32167807
e-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Anexo B

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

Assunto: A manuscript number has been assigned: LWT-D-09-00815
 De: "LWT - Food Science & Technology" <katrin.hecht@ilw.agrl.ethz.ch>
 Data: Qui, Agosto 20, 2009 3:02 am
 Para: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

 Ms. Ref. No.: LWT-D-09-00815

Title: Influence of carvacrol and thymol on physiological characteristics and enterotoxins production by Staphylococcus aureus strains isolated from foods

LWT - Food Science and Technology

Dear Dr. Evandro Leite de Souza,

Your submission "Influence of carvacrol and thymol on physiological characteristics and enterotoxins production by Staphylococcus aureus strains isolated from foods" has been assigned manuscript number LWT-D-09-00815.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/lwt/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to LWT - Food Science and Technology.

Kind regards,

Liz Wang

Central Administrator

LWT - Food Science and Technology

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:

http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author Support at authorsupport@elsevier.com

Global telephone support is available 24/7:

For The Americas: +1 888 834 7287 (toll-free for US & Canadian customers)

For Asia & Pacific: +81 3 5561 5032

For Europe & rest of the world: +353 61 709190

Evandro Leite de Souza, PhD
Laboratório de Microbiologia de Alimentos
Departamento de Nutrição
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)