

ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA*

L. Faleiro

Universidade do Algarve, FERN, Campus de Gambelas 8005-139 Faro, Portugal

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

A quantificação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais é indispensável na exploração da sua aplicação. Os óleos essenciais, tal como outros agentes antimicrobianos podem exercer os mais variados efeitos sobre a célula microbiana, quer na sua estrutura quer no seu funcionamento e, sempre que possível, a identificação dos alvos celulares deve constituir uma meta. No presente capítulo abordam-se os métodos de avaliação da actividade antimicrobiana utilizados com maior frequência (Bloomfield 1991, Burt 2004, Lahlou 2004).

Efeito microbiostático ou microbiocida

Dado que não só a acção dos agentes antimicrobianos ocorre contra as células bacterianas, mas igualmente contra as células de fungos, algas, protozoários, entre outras estabelece-se a utilização de termos que englobem a acção sobre todos os tipos de células (mais generalista) ou seja microbiostático e microbiocida. Estes termos indicam pois a divisão da acção dos agentes biocidas em dois níveis. É de salientar que, sempre que se trabalha apenas com um tipo de células então a acção reporta-se a esse grupo, por exemplo se a acção é avaliada contra bactérias, nesse caso os níveis serão bacteriostático e bactericida, se for sobre fungos então os termos a utilizar correspondem a fungistático e fungicida.

O termo microbiostático é o termo utilizado para indicar o nível de acção do agente que provoca uma inibição do crescimento microbiano em condições que permitem o normal desenvolvimento. Este efeito tem carácter reversível uma vez que após a neutralização do agente as células microbianas recuperam a sua capacidade de reprodução (Bloomfield 1991). O efeito microbiocida ocorre no calas após a eso em que as céluxposição ao agente não são recuperadas, ou seja não ultrapassam a lesão provocada pelo agente e, por isso, o crescimento não acontece mesmo após a neutralização do agente (Bloomfield 1991).

A avaliação antimicrobiana é geralmente realizada sob populações microbianas e não sobre células individualizadas e assim pode-se encontrar algumas células em reprodução, enquanto que outras estão mortas ou seja existe uma situação dinâmica e por isso as diferenças entre os valores microbiostáticos e microbiocidas é, por vezes, difícil.

Cinética da acção antimicrobiana

De modo a estabelecer o efeito microbiostático ou microbiocida de um agente é primordial a análise do crescimento microbiano em condições normais (na ausência do agente e sob condições de nutrição, temperatura e atmosfera favoráveis). O crescimento em sistema descontínuo é o adoptado na generalidade. A Fig. 1 representa as curvas típicas para os efeitos microbiostático e microbiocida. A Fig. 1a) representa a curva de crescimento em condições normais e pode ser dividida em:

- fase exponencial durante a qual ocorre a divisão celular segundo uma relação exponencial (a fase lag foi suprimida pela utilização de um pré-inóculo).
- fase de desaceleração em que o crescimento se atenua no fim da fase exponencial.
- ... fase estacionária o número de total de células viáveis mantêm-se constante. Esta fase ocorre devido a alguns factores tais como o esgotamento de nutrientes ou oxigénio, mudança no valor de pH e a acumulação de produtos tóxicos.

* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 137-146, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

... O efeito microbiostático pode ser assumido como um aumento na fase lag em conjunto com uma diminuição da taxa específica de crescimento (μ) que pode ser parcial (como na Fig. 1b) ou total (como na Fig. 1c).

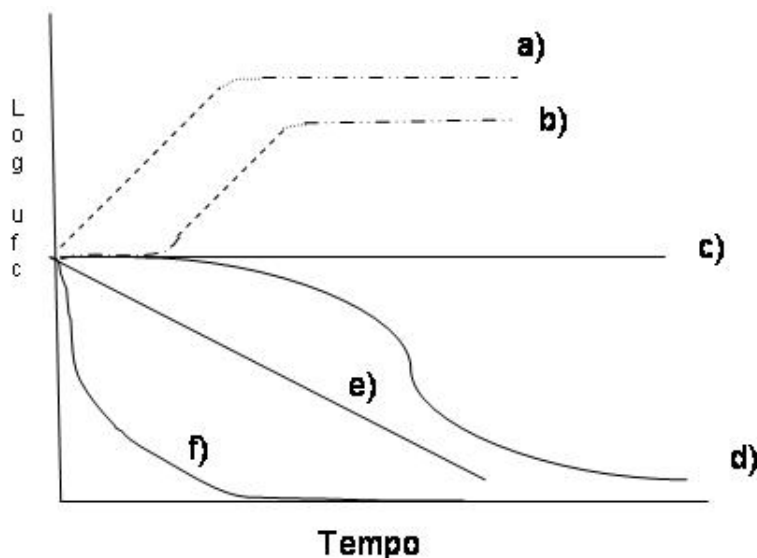


Fig. 1. Curvas de crescimento. Curva normal, a) ---- fase exponencial, fase de desaceleração, - - - - fase estacionária, b) e c) curvas que correspondem ao efeito microbiostático, d) e) e f) curvas de sobrevivência, efeito microbiocida.

A cinética do efeito microbiocida é geralmente avaliada através de curvas de sobrevivência. A curva típica de morte está representada na Fig. 1d. As curvas do tipo e) e f) da Fig. 1 estão associadas a taxas de morte elevadas.

A taxa específica de crescimento (μ) ou o tempo de duplicação (t_d) são dois parâmetros que podem ser utilizados na quantificação da actividade antimicrobiana.

Quando são utilizados métodos turbidimétricos na avaliação do crescimento microbiano o valor de μ corresponde ao gradiente do sector da curva que pertence à fase exponencial da curva de crescimento (Koch, 1994). O valor do tempo de duplicação iguala a:

$$\text{Tempo de duplicação} = \ln 2 / \mu$$

No caso de serem utilizados métodos de contagem de células viáveis aplica-se a dois pontos da fase exponencial a seguinte equação (Brock, 1971):

$$K = \log X_t - \log X_0 / (0.301) t$$

Onde X_0 = o valor da população no início da fase log; X_t = o valor da população no ponto mais elevado da fase log; t = tempo decorrido entre X_0 a X_t ; e $1/K$ = tempo de geração.

Factores que influenciam a avaliação da actividade antimicrobiana

A avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais é uma tarefa difícil devido à volatilidade destes, bem como à sua insolubilidade em água. É, de particular importância a natureza hidrofóbica e a elevada viscosidade dos óleos essenciais que podem provocar uma irregular distribuição pelo meio de cultura e igualmente uma diluição não homogénea.

De acordo com vários estudos (Janssen *et al.* 1987, Rios *et al.* 1988, Bloomfield 1991) evidenciam-se alguns factores especialmente importantes no estudo da actividade de óleos essenciais: i) a técnica de ensaio, ii) a composição do meio de crescimento, iii) os microrganismos usados, iv) o método de extracção do óleo essencial, v) o valor de pH, vi) a solubilidade do óleo no meio de cultura e vii) temperatura, entre outros. Alguns destes factores são seguidamente abordados.

A técnica de ensaio

As técnicas frequentemente utilizadas na avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais são geralmente adaptadas dos métodos aplicados aos antibióticos (Hammer *et al.* 1999, Santos *et al.* 1997, NCCLS 2000). Estas técnicas podem ser classificadas de acordo com a necessidade ou não uma dispersão homogénea em água. A técnica que não requer uma dispersão homogénea em água é o método de difusão em agar na qual são utilizados discos, orifícios, cilindros como reservatórios ou discos como fonte de vapor (Janssen *et al.* 1987, Kalemba e Kunicka 2003).

O reservatório contendo o óleo essencial a ser avaliado é colocado em contacto com o meio inoculado, e após incubação, o diâmetro da zona transparente à volta do reservatório (diâmetro de inibição) é medido. Este método foi originalmente desenhado para calcular as quantidades de antibiótico produzidas em extractos crus.

Diferentes tipos de reservatórios podem ser utilizados: discos de papel de filtro ou reservatórios colocados na superfície do meio ou ainda orifícios feitos no próprio no meio de cultura. Em qualquer dos casos a quantidade de óleo e o diâmetro do reservatório são parâmetros cruciais.

Técnicas que requerem uma dispersão homogénea em água (método de diluição; agar ou meio de cultura líquido) são aplicadas para a determinação dos valores de CMI (Concentração Mínima Inibitória) e CMB (Concentração Mínima Bactericida) através da análise das curvas de crescimento por comparação com a cultura de controlo (sem a adição do óleo essencial).

O método de difusão em agar é o mais utilizado na determinação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais e é considerado bastante preciso, apesar de alguns aspectos menos favoráveis puderem ser apontados, tais como devido à volatilidade dos componentes dos óleos essenciais estes desaparecerem conjuntamente com o solvente durante a incubação, enquanto que os componentes menos solúveis podem não se difundir de modo apropriado no meio de cultura (Janssen *et al.* 1987, Kalemba e Kunicka 2003, Burt 2004). Quando se aplica este método são utilizadas placas de Petri, geralmente de 9 cm que são preenchidas com cerca de 10 a 20 ml de meio de cultura e posteriormente inoculadas com o microrganismo teste. A colocação do óleo essencial é realizada usualmente de duas maneiras: através da disposição de discos de papel (Kim *et al.* 1995, Senatore *et al.* 2000, Burt e Reindres 2003, Wilkinson *et al.* 2003, Faleiro *et al.* 2003, 2005) ou no interior de um poço (orifício) feito no agar (Baratta *et al.* 1998, Lis-Balchin *et al.* 1998, Dorman e Deans 2000).

Os parâmetros a ter em atenção são o diâmetro do disco ou do poço, a quantidade do óleo e do solvente ou emulsionante utilizado. Este último factor parece variar consideravelmente e são várias as substâncias utilizadas, nomeadamente tem sido referida a utilização do álcool (Deans e Svoboda 1989, Sivropoulou *et al.* 1996, Ouattara *et al.* 1997, Marino *et al.* 2001), do composto Tween-20 (Man e Markham 1998, Hammer *et al.* 1999, Pol e Smid 1999, Griffin *et al.* 2000), do composto Tween-80 (Cosentino *et al.* 1999, Mourey e Canillac 2002, Hood *et al.* 2003, Wilkinson *et al.* 2003), do metanol (Niu e Gilbert 2004) e do sulfoxido de dimetilo (Hili *et al.* 1997, Firouzi *et al.* 1998). É, de particular importância que se verifique que as concentrações do agente emulsionante ou o solvente utilizado não prejudicam o crescimento dos microrganismos utilizados. Outro aspecto a ter em conta é o seguimento dos ensaios através da inserção de culturas controlo negativas, ou seja a adição do óleo essencial é substituída por água estéril ou o solvente. Do mesmo modo a inserção de culturas positivas que são constituídas pela adição de um antibiótico padrão em vez do óleo essencial é, igualmente crucial na metodologia de avaliação da actividade dos óleos essenciais.

A eficácia do óleo essencial é revelada pelo tamanho da zona de inibição do crescimento do microrganismo utilizado no teste e o grau de actividade é expresso como o diâmetro da referida zona (em mm ou cm) e, geralmente é incluído o diâmetro do disco.

Em virtude da facilidade de execução e da necessidade de reduzidas quantidades do óleo a testar este método é recomendado na pré-avaliação de um número considerável de óleos essenciais e posteriormente os que apresentam maior actividade são sujeitos a estudos mais aprofundados. Este método é ainda aplicado na verificação da susceptibilidade de um elevado número de microrganismos a determinado óleo essencial.

O método de diluição em agar ou em meio líquido é utilizado, quer em bactérias quer em

fungos. Neste método são utilizados tubos ou frascos de volumes que podem variar de 100ml a 2-5ml de meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do óleo essencial a testar. A utilização de métodos baseados em microdiluições tem tido uma crescente aceitação (Shapiro *et al.* 1994, Avato *et al.* 1997, Mann e Markham 1998, Lambert *et al.* 2001, Burt e Reinders 2003, Faleiro *et al.* 2005) e mostra-se um método bastante expedito na determinação dos valores CMI e CMB.

A eficácia da actividade dos óleos essenciais quando se aplica este método, quer se utilize tubos ou microplacas, é verificada por turbidimetria (Faleiro *et al.* 2005), colorimetria (Burt e Reinders 2003) ou ainda por contagem de viáveis (Sivropoulou *et al.* 1997). É forçoso destacar o elevado esforço requerido por este último método em contrapartida com a medição por turbidimetria que é um método muito mais expedito. Os valores CMI e CMB são retirados das curvas de crescimento ou morte como descrito no ponto “Cinética da acção antimicrobiana”.

A aplicação de métodos baseados em microdiluições na avaliação da actividade dos óleos essenciais que são bastante expeditos e com forte aplicação na determinação da susceptibilidade a antibióticos (Chapin e Musnug 2004) podem fornecer um volume de informação incalculável nos nossos dias onde a procura de novos agentes antimicrobianos tem crescido exponencialmente e em particular a de produtos naturais, como os óleos essenciais. A acrescentar a possibilidade destes métodos realizarem um rápida discriminação das estirpes resistentes que actualmente constituem um sério perigo para a saúde pública.

Existem ainda outros métodos menos referidos e que são considerados não-convencionais como, por exemplo, os métodos denominados por microatmosfera, bioautografia e bioimpedimétrico (Burt 2004, Kalemba e Kunicka 2003).

O método denominado por microatmosfera resultou fundamentalmente de uma ligeira modificação do método de difusão em agar e é mais apropriado na determinação da actividade do óleo essencial na fase de vapor. Este método aplica-se a óleos que se destinam a ser utilizados como conservantes de atmosferas. Assim neste método o disco com o óleo essencial é colocado na tampa da placa de Petri que é posteriormente invertida e colocada a incubar. A actividade é expressa do mesmo modo que no método por difusão em agar, ou seja é indicada a zona de inibição do crescimento microbiano (Amvam *et al.* 1998, Bishop *et al.* 1997).

Na avaliação de extractos de plantas é utilizado o método denominado por bioautografia (Rios *et al.* 1988, Tellez *et al.* 2000, Kobaisy *et al.* 2001). Este método é raramente aplicado na avaliação dos óleos essenciais (Rios *et al.* 1988, Sridhar *et al.* 2003). Os extractos são constituídos por diversos componentes que se podem separar através de cromatografia em papel ou por camada fina. Quando o solvente se evapora pode-se colocar o meio de cultura líquido inoculado no papel ou nas placas de cromatografia. Após o período de incubação adequado o crescimento microbiano é avaliado. No caso de actividade o crescimento é nulo e, então os componentes do extracto são eluídos e posteriormente identificados.

O método de avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais não-convencional designado por bioimpedimétrico é caracterizado por ser muito expedito e possuir as vantagens dos métodos rápidos. O método baseia-se na correlação entre a alteração dos parâmetros eléctricos do crescimento microbiano que estão ligados de modo restrito com a actividade metabólica do microrganismo em teste e igualmente ao número de células viáveis. Os resultados desta avaliação são expressos por tempo de detecção (TD). Este parâmetro é definido como o tempo necessário para que a cultura microbiana alcance a quantidade limiar que geralmente é igual a 10^6 ufc.ml⁻¹. Deste modo a actividade antimicrobiana do óleo essencial pode ser expressa, quer pelo tempo que a cultura na presença do óleo leva a atingir o tempo de detecção em comparação com a cultura microbiana negativa ou ainda pela taxa de decréscimo do número de células (Lachowicz *et al.* 1998; Wan *et al.* 1998; Marino *et al.* 1999; Marino *et al.* 2001)

O microrganismo teste

A actividade dos óleos essenciais sobre as células microbianas do mesmo género e espécie determinada nas mesmas condições, de modo geral aparenta ser similar (Faleiro *et al.* 2005, Mourey e Canillac 2002). Ressalve-se a importância de se utilizar um número significativo de

estirpes nesta determinação.

É reconhecido que a actividade antimicrobiana aumenta com o decréscimo do tamanho do inóculo e por isso é crucial que a densidade da população microbiana seja padronizada nestes ensaios.

O meio de cultura e o valor do pH

A utilização de determinados meios de cultura na determinação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos como os antibióticos está padronizado e a utilização do meio Mueller-Hinton é a recomendada (NCCLS 2000) e também já foi adoptado na determinação da susceptibilidade aos óleos essenciais (Hammer *et al.* 1999). O meio de cultura pode não só activar ou decrescer a actividade do óleo essencial como pode proteger as células microbianas dos agentes, como os meios de cultura mais ricos. É pois necessário que os vários trabalhos sejam homogéneos, pois tem uma importância vital na comparação da acção antimicrobiana.

Relativamente ao efeito do valor de pH na actividade dos óleos essenciais, é reconhecido que os fenóis e ácidos carboxílicos só podem atravessar a célula microbiana quando estão na forma não carregada e para os compostos dos óleos essenciais eugenol, l-carvone, d-carvone, e mentol a sua actividade é superior quando o valor de pH do meio de cultura sobe de 6 para 8 (Janssen *et al.* 1987, Bloomfield 1991).

O valor de pH pode ainda intervir ao nível de modificações na distribuição da carga na superfície da célula microbiana e por isso a ligação do composto do óleo carregado à célula microbiana pode ser comprometida.

Interacções entre os componentes dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de uma enorme diversidade de compostos e a actividade antimicrobiana dos óleos essenciais é pois relacionada com a sua composição, configuração, o seu teor e ainda as possíveis interacções entre eles (Lis-Balchin *et al.* 1998). Três efeitos podem ser destacados: adição, antagonismo e sinergismo. O efeito adicional ocorre quando o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais. O antagonismo ocorre quando o efeito da combinação dos compostos é inferior ao efeito quando são aplicados individualmente. Por outro lado, quando o efeito da combinação dos compostos é maior que a soma dos efeitos individuais está-se na presença de um fenómeno de sinergismo.

Para efeitos quantitativos é utilizado o conceito de concentrações inibitórias fraccionadas (CIF, *fractional inhibitory concentrations*). O valor CIF para cada composto numa combinação é, geralmente, calculado utilizando os valores de CMI. O valor CIF é expresso pela relação entre o valor de CMI do composto na combinação em relação ao valor de CMI quando se aplica a substância individualmente. A soma dos valores CIF (o índice CIF) para os componentes da combinação mais eficaz é o indicador da natureza da sua interacção. O valor do índice CIF aceite como indicador de sinergia é 0,5, e para a adição é 1,0. Se o valor CIF excede este último, então considera-se que ocorre antagonismo (Hodges e Hanlon 1991).

Algumas misturas de óleos essenciais podem resultar ineficazes e o elevado potencial de um óleo pode ficar diluído na combinação e daí a importância da determinação da interacção dos óleos/componentes (Lis-Balchin e Deans 1998).

É importante referir o estudo conduzido por Delaquis e colaboradores (2002) onde testaram misturas de fracções dos óleos essenciais de coentros (sementes e folhas), aneto e eucalipto contra bactérias gram positivas e gram negativas e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e foi-lhes possível discriminar os efeitos aditivo, antagonista e de sinergismo.

Em alimentos a actividade antibacteriana resultante da combinação de diferentes óleos essenciais em conjunto com outros agentes antibacterianos (ex: ácidos orgânicos) pode resultar em sinergismo e ao se associarem outras técnicas de conservação (ex: utilização de temperaturas baixas) a inibição bacteriana é bastante mais eficaz (Lin *et al.* 2004).

Alvos celulares

Em comparação com o número de estudos sobre as características dos óleos essenciais e dos seus componentes o número de estudos sobre os mecanismos de acção é bastante inferior (Lambert *et al.* 2001, Dorman e Deans 2000). De acordo com o elevado número de tipos de compostos químicos que são constituídos os óleos essenciais é de esperar que vários alvos celulares sejam atingidos durante a sua acção (Carson *et al.* 2002). Os alvos celulares referidos como locais de actividade dos óleos essenciais estão representados na Fig 2 e são: a degradação da parede celular (Helander *et al.* 1998), o distúrbio da membrana citoplasmática, alteração da força motriz protónica, fluxo de electrões, transporte activo, coagulação dos constituintes celulares, perda de constituintes celulares (Cox *et al.* 2000, Dorman e Deans 2000, Lambert *et al.* 2001, Ultee *et al.* 2000, 2002). Estas acções estão ligadas a uma das mais importantes características dos óleos essenciais que é serem hidrofóbicos o que lhes permite a distribuição pelos lípidos da membrana celular e mitocôndrias com a consequente alteração da sua estrutura e torná-las mais permeáveis. Nesta altura é pois possível que ocorra a perda de iões e algum teor celular (Lambert *et al.* 2001, Carson *et al.* 2002, Ultee *et al.* 2002)

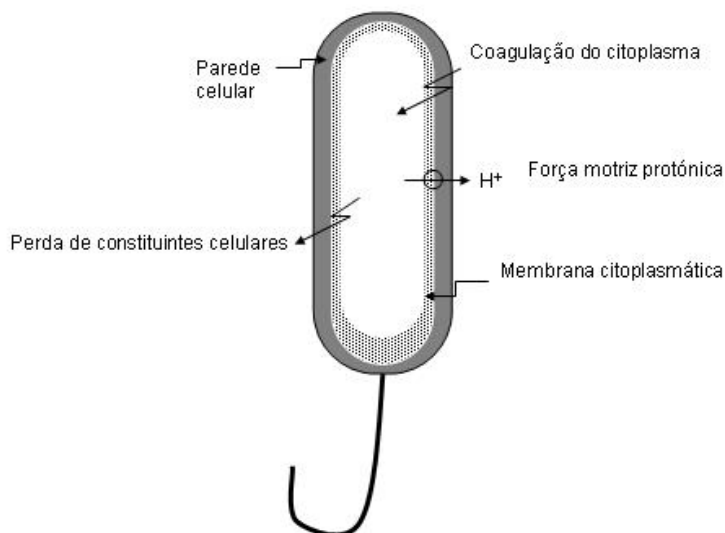


Fig. 2. Principais alvos celulares dos óleos essenciais.

Avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais em sistemas alimentares

Nos últimos anos tem-se assistido a uma crescente procura de produtos naturais por parte dos consumidores que são actualmente mais intervenientes e exigentes. Este tipo de comportamento direccionou, quer os investigadores quer as indústrias agro-alimentares na pesquisa de aditivos alimentares naturais, em especial os de origem vegetal que possam assegurar um tempo de conservação adequado às novas realidades do mercado global, bem como às preocupações do novo tipo de consumidor (Gould 2001). Deste modo, na última década assistiu-se ao aparecimento de um número significativo de trabalhos científicos sobre a actividade dos óleos essenciais em sistemas alimentares, em particular em carnes e produtos cárneos (Burt 2004).

Muitos dos compostos alvo de estudos recentes já são utilizados à séculos, quer como substâncias aromatizantes, quer como conservantes. No entanto, com a alteração das técnicas de produção face à necessidade de uma vida de prateleira mais prolongada surgiram os designados microrganismos emergentes e, conseqüentemente surgiu a procura de substâncias para o seu controlo. Outro facto preocupante é o aparecimento de microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos e a aquisição de resistência pelas bactérias patogénicas de origem alimentar (White *et al.* 2002) que pode constituir um enorme problema para a terapêutica. A utilização de compostos naturais como os óleos essenciais pode ser considerada uma potencial ferramenta no entrave ao desenvolvimento de resistências.

Da análise da avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais *in vitro* e em

alimentos é referida a necessidade de aumentar a concentração do óleo essencial nos alimentos para atingir níveis semelhantes ao dos atingidos *in vitro* (Burt 2004, Holey e Patel 2005). As diferenças nas concentrações utilizadas em alimentos vão desde 2 a 100 vezes à concentração utilizada *in vitro* (Burt 2004). Algumas causas apontadas estão, geralmente ligadas à protecção dos microrganismos nos alimentos, nomeadamente a influência dos factores intrínsecos do alimento onde estão incluídos os teores de gordura, proteína, actividade da água, disponibilidade de nutriente, valor de pH, concentração de sais, a própria estrutura do alimento e ainda os factores extrínsecos que englobam a temperatura de conservação do alimento, a atmosfera e a exposição à flora microbiana. É, de particular importância o facto de existir uma maior quantidade e diversidade de nutriente disponível no alimento, em comparação com os nutrientes disponíveis no meio de cultura que permitem aos microrganismos a reparação mais rápida dos danos causados (Jay 1996, Skandamis *et al.* 2000, Gill *et al.* 2002).

A adição do óleo essencial ao alimento é geralmente directa (Tsigarida *et al.* 2000, Skandamis e Nychas 2001, Singh *et al.* 2003;) ou ainda o óleo essencial ou um dos seus componentes podem ser incorporados em películas que são depois aplicadas no alimento (Ouattara *et al.* 2000, Oussalah *et al.* 2004).

As bactérias patogénicas de origem alimentar que são alvo maioritário nos estudos da actividade dos óleos essenciais em alimentos são *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Aeromonas hydrophyla*, *E. coli* O157:H7 e em menor número as bactérias *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (Burt 2004).

As leveduras e os fungos filamentosos são igualmente importantes, quer em termos de segurança alimentar quer em termos de assegurar uma boa qualidade dos alimentos durante um período mais prolongado. Estes microrganismos têm a capacidade de crescer na maioria dos produtos alimentares produzindo maus odores, descoloração e proteólise através da produção de enzimas como as proteases e lipases (Jay 1996). O mais importante, em termos de segurança alimentar é que podem produzir toxinas que presentes nos alimentos em pequenas quantidades podem causar quadros patológicos muito graves com o comprometimento da vida do consumidor.

A eficácia dos óleos essenciais no controlo de leveduras e fungos filamentosos em alimentos é, igualmente registada com a necessidade da utilização de concentrações mais elevadas do que aquelas utilizadas *in vitro* (Lopez-Malo 2002).

REFERÊNCIAS

- Amvam ZPH, L Biyiti, F Tchoumboungang, C Menut, G Lamaty, P Bouchet, (1998) Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal* 13: 107-114.
- Avato P, C Vitali, P Mongonelli, A Tava, (1997) Antimicrobial activity of polyacetylenes from *Bellis perennis* and their synthetic derivatives *Planta medica* 63:503-507.
- Bloomfield, S. F. (1991) Methods for Assessing Antimicrobial Activity. In: Denyer, S. P. ; Hugo, W. B. (Eds), *Mechanisms of action of chemical biocides. Their study and exploitation*. Technical series of the Society for Applied Bacteriology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Baratta MT, HJD Dorman, SG Deans, AC Figueiredo, JG Barroso, G Ruberto (1998) Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13: 235-244.
- Brock TD (1971) Microbial growth rates in nature. *Bacteriology Reviews* 35:39-58.
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- Burt SA, R.D. Reinders (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36 (3), 162-167.
- Carson CF, BJ Mee, TV Riley (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (6): 1914-1920.
- Chapin KC, MC Musgnug (2004) Evaluation of sensititre automated reading and incubation system for automated reading of sensititre broth microdilution susceptibility plates. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (2): 909-911.
- Cosentino S, CIG Tuberoso, B Pisano, M Satta, V Mascia, E Arzedi, F Palmas (1999) In vitro antimicrobial

- activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29: 130-135.
- Cox SD, CM Mann, JL Markham, HC Bell, JE Gustafson, JR Warmington, SG Wyllie (2000) The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88:170-175.
- Deans SG, KP Svoboda (1989) Antibacterial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L) essential oil and its constituents. *Journal of Horticultural Science* 64 (2): 205-210.
- Delaquis PJ, K Stanich, B Girard, G Mazza (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptos essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74:101-109.
- Dorman HJD, SG Deans (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308-316.
- Faleiro L, G Miguel, S Gomes, L Costa, F Venâncio, A Teixeira, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro (2005) Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils Isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53:8162-8168.
- Faleiro, ML, MG Miguel, F Ladeiro, F Venâncio, R Tavares, JC Brito, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro (2003) Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology* 36 (1): 35-40.
- Firouzi R, M Azadbakht, A Nabinedjad (1998) Anti-listerial activity of essential oils of some plants. *Journal of Applied Animal Research* 14:75-80.
- Gould, GW (2001) New processing technologies: an overview. *Proceedings of the Nutrition Society* 60 (4): 463-474.
- Griffin SG, Markham JL, DN Leach (2000) An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Essential Oil Research* 12: 249-255.
- Hammer KA, CF Carson, TV Riley (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86:985-990.
- Helander IM, H-L Alakomi, K Latva-Kala, T Mattila-Sandholm, I Pol, EJ Smid, LGM Gorris (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 3590-3595.
- Hili P, CS Evans, RG Veness (1997) Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology* 24:269-275.
- Hodges NA, GW Hanlon (1991) Detection and measurement of combined biocide action. In: Denyer SP, Hugo WB (Eds), *Mechanisms of action of chemical biocides. Their study and exploitation*. Technical series of the Society for Applied Bacteriology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Holey RA, D Patel (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22:273-292.
- Hood JR, Wilkinson JM, HMA Cavanagh (2003) Evaluation of Common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research* 15: 428-433.
- Janssen, AM; JJ Scheffer, AB Svendsen (1987) Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica* 53: 395-398.
- Jay, JM (1996) Modern Food Microbiology. Heldman DR (Ed) Food Science Text Series. Chapman & Hall, NY, USA.
- Kalembe D, A Kunicka (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10: 813-829.
- Kobaisy M, MR Tellez, CL Webber, FE Dayan, KK Schader, DE Wedge (2001) Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Leaves and its composition. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49:3768-3771.
- Koch AL (1994) Growth measurement. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N. R. (Eds), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Lachowicz KJ, GP Jones, DR, Briggs, FE, Bienvenue, J Wan, A Wilcock, MJ Coventry (1998) The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Letters in Applied Microbiology* 26: 209-214.
- Lahlou M (2004) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18: 435-448.
- Lambert RJW, PN Skandamis, PJ Coote, GJE Nychas (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol *Journal of Applied Microbiology* 91:453-462.
- Lin YT, RG Labbe, K Shetty (2004) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (9): 5672-5678.

- Lis-Balchin M, SG Deans (1998) Studies on the potential usage of mixtures of plant essential oils as synergistic antibacterial agents in foods. *Phytotherapy Research* 12: 472-475.
- Lis-Balchin M, SG Deans, E Eaglesham (1998) Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13: 98-104.
- Lopez-Malo A, SM Alzamora, E Palou (2002) *Aspergillus flavus* dose-response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology* 73: 213-218.
- Mann CM, JL Markham (1998) A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84: 538-544.
- Marino M, C Bersani, G Comi (1999) Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedimetric method. *Journal of Food Protection* 62 (9): 1017-1023.
- Marino M, C Bersani, G Comi (2001) Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology* 67: 187-195.
- Mourey A, N Canillac (2002) Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13: 289-292.
- NCCLS (2000) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard - Fifth edition. NCCLS document M7-A5, Wayne, USA.
- Niu C, ES Gilbert (2004) Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (12): 6951-6956.
- Ouattara B, RE Simard, GJ-P Piette, A Bégin, RA Holley (2000) Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology* 62:139- 148.
- Ouattara B, RE Simard, RA Holley, GJ-P Piette, A Bégin (1997) Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 37: 155-162.
- Oussalah M, S caillet, S Salmiéri, L Saucier, M Lacroix (2004) Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52:5598-5605.
- Pol IE, EJ Smid (1999) Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 29:166-170.
- Rios JL, MC Recio, A Villar (1988) Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23:127-149.
- Santos FA, GMA Cunha, GSB Viana, VSN Rao, AN Manoel, ER Silveira (1997) Antibacterial activity of essential oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants. *Phytotherapy Research* 11: 67-69.
- Senatore F, F Napolitano, M Ozcan (2000) Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 15:186-189.
- Shapiro S, A Meier A, B Guggenheim (1994) The antimicrobial activity of essential oils and essential oils components towards oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* 9:202-208.
- Singh A, RK Singh, AK Bhunia, N Singh (2003) Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensm.-Wiss. U.-Technology* 36:787-794.
- Sivropoulou A, C Nikolaou, E Papanikolaou, S Kokkini, T Lanaras, M Arsenakis (1997) Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fructicosa* essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45: 3197-3201.
- Sivropoulou A, E Papanikolaou, C Nikolaou, S Kokkini, (1996) Antimicrobial and citotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44:1202-1205.
- Sridhar SR, RV Rajagopal, R Rajavel, S Masilamani, S Narasimhan (2003) Antifungal activity of some essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51:75-96-7599.
- Skandamis P, GJE Nychas (2001) Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced beef stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 91:1011-1022.
- Skandamis P, E Tsigarida, GJE Nychas (2000) Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatine gel with or without the addition of oregano essential oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16:31-35.
- Tellez MR, FE Dayan, KK Schrader, DE Wedge, SO Duke (2000) Composition and some biological activities of the essential oil of *Callicarpa americana* (L.) *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48:3008-3012.
- Tsigarida E, Skandamis P, GJE Nychas (2000) Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *Journal of Applied Microbiology* 89: 901-909.
- Ultee A, MHJ Bennink, R Moezelaar (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4): 1561-

1568.

Ultee A, EPW Kets, M Alberda, FA Hoekstra, EJ Smid (2000) Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174 (4):233-238.

Wan J, A Wilcock, MJ Coventry (1998) The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophyla* and *Pseudomonas fluorescences*. *Journal of Applied Microbiology* 84: 152-158.

White DG, S Zhao, S Simjee, DD Wagner, PF McDermonntt (2002) Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes Infection* 4:405-412.

Wilkinson JM, M Hipwell, T Ryan, HMA Cavanagh (2003) Bioactivity of *Backhousia citrodora*: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 76-81.
