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

HELENA TAINA DINIZ SILVA

EFEITOS DA ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E DE *Rosmarinus officinalis* L. COMBINADOS EM QUEIJO FRESCO DURANTE ARMAZENAMENTO

João Pessoa-PB
2019

HELENA TAINA DINIZ SILVA

EFEITOS DA ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E DE *Rosmarinus officinalis* L. COMBINADOS EM QUEIJO FRESCO DURANTE ARMAZENAMENTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Prof.ª Drª. Marciane Magnani

João Pessoa-PB

2019

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Helena Taina Diniz.
EFEITOS DA ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE Origanum vulgare L. E DE Rosmarinus officinalis L. COMBINADOS EM QUEIJO FRESCO DURANTE ARMAZENAMENTO / Helena Taina Diniz Silva. - João Pessoa, 2019.
113 f. : il.

Orientação: Marciane Magnani.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Cultura starter. 2. Cultura probiótica. 3. E. coli O157:H7. 4. óleos essenciais. 5. Produtos lácteos. 6. Sinergismo. I. Magnani, Marciane. II. Título.

UFPB/BC

HELENA TAINA DINIZ SILVA

EFEITOS DA ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E DE *Rosmarinus officinalis* L. COMBINADOS EM QUEIJO FRESCO DURANTE ARMAZENAMENTO

Tese APROVADA em 28 / 03 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

Marciane Magnani DEA/CT/UFPB
Presidente

Evandro Leite de Souza DN/CCS/UFPB
Examinador interno

Jailane de Souza Aquino DN/CCS/UFPB
Examinador interno

Mônica Tejo Cavalcanti CCTA/UFCG
Examinador externo

Marta Suely Madruga DEA/CT/UFPB
Examinador externo

Dedico estas linhas às minhas avós...

Vó Joanita e vó Júlia.

Que, apesar de analfabetas,

reconheciam e acreditavam no poder transformador da educação.

In memorian.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois d'Ele advém todas as coisas.

Aos meus pais, Angela e Arlindo, por todo apoio, incentivo e amor incondicionais em todos os momentos da minha vida, em especial à minha "mamain" que nunca mediu esforços para que eu alçasse meus objetivos, que sempre se manteve firme diante dos obstáculos que a vida impusera, que é um exemplo de mulher, de mãe, de ser humano, a quem jamais conseguirei agradecer o suficiente. Sou o que sou e cheguei onde chegue porque vim de você.

À minha Lua, que apesar de ser a caçula cuida e protege a todos que a cercam, que por trás da cara de poucos amigos tem um coração precioso, que em muitos momentos foi meu porto. Ao meu irmão Pedro, que mesmo não expressando sinto seu amor e carinho, e que me presenteou com os amores da minha vida, minhas sobrinhas Júlia, Valentina e Lorena.

À toda minha família, que o que tem de simples tem o dobro em amor e acolhimento, se hoje me torno a primeira com o título de Doutora da família foi porque tive todo o apoio e amor de vocês.

Ao meu marido, Marcos, meu amor, meu companheiro, meu maior incentivador. A pessoa mais paciente e impaciente do mundo, e mais compreensiva também. Que entende os momentos em que preciso ficar quieta, que entende e apoia minhas decisões, por sempre esteve ao meu lado, mesmo quando tudo está nublado.

Aos meus sogros, Kátia e Marcos Aurélio, que me acolheram em sua casa como filha, em especial à minha sogra cujo título nunca lhe serviu, que é tão mãe que não consegue ser sogra, mulher forte que esconde a força que tem, que sempre foi mulher à frente do seu tempo, que se doa completamente à aqueles que lhes são amados, a quem devo minha eterna gratidão.

Aos meus padrinhos, Inês e Giuseppe Tosi, por todo carinho, atenção e apoio.

À minha orientadora, Prof.ª Dr.ª Marciane Magnani, pela confiança em mim depositada, pelos muitos ensinamentos, mesmo sem querer, pelo incentivo, mesmo sem perceber, pela oportunidade de crescimento que esses quatro anos foram para mim. Meu mais profundo agradecimento e admiração pela sua força e competência.

Às grandes mulheres que tenho a honra em ter na minha vida. Minha irmã galêga, Camila, minha irmã de alma. Roberta, mulher gigante e aguerrida pela própria natureza. Minha Isinha, que não se curva diante da vida, a mulher "amarra as bactérias no laço". Jéssyca Virgulino, minha "irmã caçula postiça", que veio ao mundo para amar. Jéssica

Bezerra, a mulher multitarefas, e mãe da criança mais adorável do mundo. Como as amo e admiro, muito obrigada vida, por tê-las comigo nesta caminhada.

Aos meus amigos irmãos de infância, Anderson, Leon, Marinho, Vanvan, Delan e Alexandre. Que sempre, de alguma forma e ao seu jeito, se fazem presentes nos diversos momentos da minha vida.

Às irmãs que a Nutrição me presenteou (Joana, Morgana, Tássia, Amanda, Cely, Neusa, Rayanne), que mesmo distantes fisicamente, se fazem presentes em todos os momentos e em cada conquista.

Às minhas maravilhosas, Rhayane, Winnie, Camila, Janaína e Myrella, os dias no laboratório jamais teriam leveza sem vocês. A todos do Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos, pela força, pelo conhecimento compartilhado, pelos ouvidos, pelas risadas.

Aos meus queridos colegas e amigos de trabalho da Uninassau, Lavoisiana, Juliana, Adriana, Joana, Suellen, Karla, Dayanna, Carol, Lucas, Kirlene, Rayner, Romero, todos. Que tornam a cansativa rotina mais leves, que me ensinam todos os dias essa árdua, mas gratificante missão que é ser professor.

Ao técnico do Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos, Sr. Gilvandro, pelo cuidado, carinho, companhia e empenho para que nossas atividades sempre fossem realizadas da melhor forma possível.

Aos membros da banca, professora Jailane de Souza Aquino, professora Mônica Tejo Cavalcante, professora Marta Suely Madruga e professor Evandro Leite de Souza, meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade, atenção e contribuições para melhoria deste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Sr. Carlos e Sr. Marcos, pela paciência, atenção, disponibilidade, apoio, profissionalismo e dedicação. Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, professor Evandro Leite de Souza, pela competência com que vêm conduzindo este programa.

À minha primeira e eterna orientadora, Maria Lúcia da Conceição, que me concedeu a primeira oportunidade de ingressar na pesquisa de alimentos, e principal responsável pela minha opção por esta área. Minha eterna gratidão, admiração e carinho.

A todos os professores do PPGCN, pelos ensinamentos e exemplos de caminho a ser seguido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio de custo fornecido para realização deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

‘‘Mantenha seus pensamentos positivos, pois seus pensamentos tornam-se suas palavras.
Mantenha suas palavras positivas, pois suas palavras tornam-se suas atitudes.
Mantenha suas atitudes positivas, pois suas atitudes tornam-se seus hábitos.
Mantenha seus hábitos positivos, pois seus hábitos tornam-se seus valores.
Mantenha seus valores positivos, pois seus valores tornam-se seu destino.’’

Mahatma Gandhi

RESUMO

Bactérias ácido láticas (BAL) são amplamente utilizadas como culturas *starter* na elaboração de queijos frescos. Estes produtos têm sido descritos como boas matrizes para incorporação de bactérias probióticas, pois possuem pH próximo da neutralidade e elevado teor de umidade. Entretanto, estas características podem favorecer a contaminação de queijos frescos por patógenos capazes de sobreviver sob refrigeração, como *Escherichia coli* O157:H7. O óleo essencial (OE) de *Origanum vulgare* L. (orégano - OEOV) e de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim - OERO) podem atuar em sinergismo contra bactérias de origem alimentar, no entanto, são escassas as informações sobre seus efeitos frente culturas *starter* e probióticas, ou frente patógenos ao longo do armazenamento. O presente estudo avaliou os efeitos dos OEOV e OERO em combinação nas contagens de células viáveis do patógeno *Escherichia coli* O157:H7, da cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e de *Lactococcus* spp., e em queijo fresco ao longo de 21 dias de armazenamento refrigerado (7 ± 0,5 °C). Os terpenos prevalentes do OEOV e OERO, e os aspectos físico-químicos e sensoriais que caracterizaram o queijo incorporado destes OEs em concentrações sinérgicas também foram determinados durante o armazenamento. A incorporação de OEOV (0,03 ou 0,07 μL/g) e OERO (1,32 ou 2,65 μL/g) em combinação nos queijos (produzidos com a cultura *starter* ou probiótica) não reduziu as contagens de *Lactococcus* spp. ou *L. acidophilus* LA-5, enquanto causou redução de aproximadamente 3,0 log UFC/g nas contagens de *E. coli* O157:H7 durante os primeiros 15 dias armazenamento. Após esse tempo de armazenamento, apenas um efeito bacteriostático foi observado frente o patógeno nos queijos. A incorporação do OEOV e do OERO em combinação retardou o aumento das contagens da cultura probiótica e de *Lactococcus* spp. nos queijos durante os 15 dias iniciais do armazenamento, porém não afetou a capacidade da cepa probiótica de sobreviver em condições gastrointestinais simuladas ao longo do armazenamento. Um total de 15 terpenos distintos do OEOV e/ou OERO foram detectados nos queijos imediatamente após a produção, ou após 24 h de armazenamento e a quantidade de todos os terpenos detectados diminuiu durante os 21 dias de armazenamento. Eucaliptol, cânfora e α-pineno foram os terpenos detectados em maior quantidade nos queijos durante todo o tempo de armazenamento estudado. A incorporação de OEOV e OERO em concentrações sinérgicas nos queijos não afetou o rendimento, ou as características físico-químicas do produto. O queijo incorporado de OEOV e OERO em combinação produzido com a co-cultura *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* foi caracterizado pelo sabor de cânfora e menta e maior maciez. Os escores sensoriais atribuídos ao aroma, sabor, impressão global e à intenção de compra do queijo probiótico (produzido com *L. acidophilus* LA-5) com OEOV e OERO aumentaram ao longo do armazenamento. Os resultados mostram que a incorporação do OEOV e OERO em concentrações sinérgicas não compromete a viabilidade da cultura starter ou probiótica, porém é eficaz no controle de *E. coli* O157:H7 em queijo durante o armazenamento refrigerado.

Palavras-chave: Cultura starter, cultura probiótica, *E. coli* O157:H7, óleos essenciais, produtos lácteos, sinergismo.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are widely used as starter cultures in the preparation of fresh cheeses. These products have been described as good matrices for incorporation of probiotic bacteria, because they have pH close to neutral and high moisture content. These same characteristics can favor the contamination of fresh cheeses by pathogens able to survive under refrigeration, such as *Escherichia coli* O157:H7. The essential oil (EO) from *Origanum vulgare* L. (Oregano - OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary - ROEO) may act in synergism against food related bacteria, however, information on its effects on starter cultures and probiotics, or against pathogens during the storage are scarce. The present study evaluated the effects of OVEO and ROEO in synergistic combination on the viable cell counts of the pathogen *Escherichia coli* O157:H7, the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Lactococcus* spp., and in fresh cheese over 21 days refrigerated storage (7 ± 0.5 °C). The prevalent OVEO and ROEO terpenes and the physicochemical and sensory aspects that characterize the cheese incorporated of these EOs in synergistic concentrations were also determined during storage. The incorporation of OVEO (0.03 or 0.07 μL/g) and ROEO (1.32 or 2.65 μL/g) in combination in cheeses (produced with the starter or probiotic culture) did not reduce the counts of *Lactococcus* spp. or *L. acidophilus* LA-5, while caused a reduction of approximately 3.0 log CFU/g in *E. coli* O157:H7 counts during the earlier 15 days storage. After this storage time, only a bacteriostatic effect was observed against the pathogen in the cheese. The incorporation of OVEO and ROEO in synergistic combination delayed the increase in counts of both starter and probiotic cultures in cheeses during storage but did not affect the ability of the probiotic strain to survive under simulated gastrointestinal conditions throughout the storage time. A total of 15 OVEO and/or ROEO terpenes were detected in cheeses immediately after production or after 24 h of storage and the amount of all terpenes detected decreased over the 21 days of storage. Eucalyptol, camphor and α-pinene were the terpenes detected in highest amounts in cheeses during the storage time studied. The incorporation of OVEO and ROEO in synergistic concentrations in the cheeses did not affect the yield, or the physical-chemical characteristics of the product. The cheese incorporated of OVEO and ROEO in combination produced with the starter culture was characterized by camphor and mint flavor and greater softness. The sensory scores attributed to aroma, taste, overall impression and purchase intention of probiotic cheese (produced with *L. acidophilus* LA-5) with OVEO and ROEO increased over the storage. The results show that the incorporation of OVEO and ROEO in synergistic concentrations does not compromise the viability of starter or probiotic culture but is effective to control of *E. coli* O157:H7 in cheese during refrigerated storage.

Key-words: Dairy products, *E. coli* O157:H7, essential oils, probiotic culture, starter culture, synergism.

LISTA DE FIGURAS

TESE

Figura 1 Estrutura química dos consttuintes de óleos essenciais..... 27

Figura 2 Planta de *Origanum vulgare* L..... 29

Figura 3 Molécula do carvacrol (a) e timol (b)..... 30

Figura 4 Planta de *Rosmarinus officinalis* L..... 31

Figura 5 Representação gráfica do método de *checkerboard*..... 39

Figura 6 Desenho experimental da produção do queijo fresco com ou sem óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L..... 40

ARTIGO 1

Fig. 1 Cell counts of *Lactococcus* spp. in fresh cheese stored at 7 ± 0.5 °C as function of OVEO-ROEO combined: (●) control: 0 µL/g; (■): 0.03 µl/ g + 1.32 µl/g (OVEO and ROEO, respectively).……..... 68

Fig. 2 Viable cell counts of *Lactococcus* spp. and *E. coli* O157:H7 in homogenized fresh cheese stored at 7 ± 0.5 °C as function of OVEO-ROEO combined: *Lactococcus* spp. (●): 0 µL/g; (■): 0.03 µl/g + 1.32 µl/g (OVEO and ROEO, respectively); *E. coli* O157:H7 (▲): 0 µL/g; (▼): 0.03 µl/g + 1.32 µl/g (OVEO and ROEO, respectively). The error bars in the figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments.……. 68

Fig. 3 (A) Principal Component Analysis (PCA) graph of physicochemical and sensory aspects of fresh cheese without and with OVEO and ROEO combined; (B) distribution of fresh cheese samples according to the PCA. CT: fresh cheese without OVEO and ROEO combined; CO: fresh cheese with OVEO and ROEO combined.……. 70

ARTIGO 2

Fig. 1 Flowchart of the processes for the production of Minas cheese with or without *Origanum vulgare* L. (OVEO; 0.07 μL/g) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO; 2.65 μL/g).…….. 98

Fig. 2 (A) Viable counts of *L. acidophilus* LA-5 in Minas cheese stored at 7 ± 0.5 °C as a function of OVEO and ROEO combined concentrations: (●) control: 0 μL/g; (■): 0.07 μL/g + 2.65 μl/g (OVEO and ROEO, respectively). (B) Viable cell counts of *L. acidophilus* LA-5 and *E. coli* O157:H7 in cheese stored at 7 ± 0.5 °C as function of OVEO-ROEO combined: *L. acidophilus* LA-5 (●): 0 μL/g; (■): 0.07 μL/g + 2.65 μL/g (OVEO and ROEO, respectively); *E. coli* O157:H7 (▲): 0 μL/g; (▼): 0.07 μL/g + 2.65 μL/g (OVEO and ROEO, respectively). The error bars in the figures indicate the standard deviations of the average of three independent experiments.……. 99

Fig. 3 Survival (log CFU/g) of *L. acidophilus* LA-5 in Minas cheese with (▲) or without OVEO (0.07 μL/g) and ROEO (2.65 μL/g) (■) during exposure to simulated gastrointestinal conditions after day zero (A), 7 (B), 14 (C) and 21 (D) of refrigerated storage. The error bars represent the standard derivations.…. 100

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 Etapas da simulação das condições gastrintestinais..... 45

ARTIGO 1

Table 1. Constituents identified by CG-MS in the essential oil from *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO).…… 67

Table 2. Results of the checkerboard assay for combined concentrations of *Origanun vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. essential oil (ROEO).…… 67

Table 3. Terpenes of *Origanum vulgare* L. (0.03 µL/g) and *Rosmarinus officinalis* L. (1.32 µL/g) detected in fresh cheese during refrigerate storage…… 68

Table 4. Physicochemical parameters, sugar and organic acids (n:3, mean values ± standard deviation) of fresh cheese with *Origanum vulgare* L. (OVEO; 0.03 µL/g) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO; 1.32 µL/g) during refrigerate storage.…… 69

ARTIGO 2

Table 1. Terpenes of *Origanum vulgare* L. (0.07 µL/mL) and *Rosmarinus officinalis* L. (2.65 µL/mL) detected in Minas cheese with *L. acidophilus* LA-5 during 21 days of refrigerated storage ……... 94

Table 2. **.** Correlation matrix of terpenes detected in Minas cheese with *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils over the 21 days of refrigerated storage with the counts of *E. coli* O157:H7 in log scale.……..... 95

Table 3. Values (n=3, mean values ± standard deviation) of technological and physiochemical parameters of Minas cheese with or without *Origanum vulgare* L. (OVEO; 0.07 μL/g) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO; 2.65 μL/g) during 21 days of refrigerated storage.……..**.....** 96

Supplementary Table 1. The conditions used during each step of the simulated gastrointestinal…. 101

Supplementary Table 2. Results of the checkerboard assay for combined concentration of *Origanun vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. essential oil (ROEO) against *L. acidophilus* LA-5……..…. 102

Supplementary Table 3. Parameters of sensory acceptability and purchase intention (n:100, mean values, ± standard deviation) of Minas cheese with or without OVEO (0.07 μL/g) and ROEO (2.65 μL/g) on day zero, 7, 14 and 21 of refrigerated storage……. 103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 16
2REFERENCIAL TEÓRICO 19
2.1 CULTURAS TECNOLÓGICAS APLICADAS EM PRODUTOS LÁCTEOS..... 19
2.2 CULTURAS PROBIÓTICAS APLICADAS EM PRODUTOS LÁCTEOS..... 21
2.3 *Escherichia coli* SOROTIPO O157:H7 EM QUEIJO..... 23
2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONSERVANTES EM ALIMENTOS..... 25
2.4.1 Óleo essencial de *Origanum vulgare* L. 28
2.4.2 Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 31
2.4.3 Uso combinado de OEs..... 33
3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 36
3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS..... 36
3.2 MICRO-ORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO..... 36
3.2.1 Preparo do inóculo..... 36
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E DE *Rosmarinus officinalis* L..... 37
3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) 37
3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONAL (CIF)..... 38
3.6 QUEIJO ADICIONADO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E DE *Rosmarinus officinalis* L. 39
3.6.1 Produção..... 39
3.6.2 Amostragem do queijo produzido com *Lactococcus* spp. 40
3.6.3 Amostragem do queijo produzido com *L. acidophilus*..... 41
3.7 DETERMINAÇÃO DOS TERPENOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E *Rosmarinus officinalis* L. EM QUEIJO DURANTE O ARMAZENAMENTO..... 41
3.7.1 Queijo produzido com *Lactococcus* spp. 42
3.7.2 Queijo produzido com *L. acidophilus* LA-5..... 42
3.8 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E DE *Rosmarinus officinalis* L. COMBINADOS SOBRE CONTAGENS DE *Lactococcus* spp. E *L. acidophilus* LA-5 VIÁVEIS EM QUEIJO 43
3.9 DESAFIO EXPERIMENTAL EM QUEIJO INOCULADO COM *E. coli* O157:H7..... 43

3.10 ENUMERAÇÃO DE *L. acidophilus* LA-5 EM QUEIJO APÓS SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS DURANTE O ARMAZENAMENTO..... 44
3.11 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FISICO-QUÍMICOS E COMPOSIÇÃO..... 45
3.12 CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL DE QUEIJO FRESCO COM OEOV E OERO DURANTE O ARMAZENAMENTO..... 46
3.12.1 Análise Descritiva Quantitativa..... 47
3.12.2 Teste de aceitação e intenção de compra..... 48
3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... 48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 49
REFERÊNCIAS..... 50
APÊNDICES..... 63
APÊNDICE A - Artigo I..... 64
APÊNDICE B - Artigo II..... 74
APÊNDICE C - Questionário de recrutamento e seleção do painel treinado..... 104
APÊNDICE D - Fichas de teste Threshold de reconhecimento..... 105
APÊNDICE E - Termo de consentimento livre e esclarecido..... **106**
APÊNDICE F – Ficha de Análise Descritiva Quantitativa não estruturada..... **107**
APÊNDICE G – Fichas de Teste Afetivo: Aceitação e intenção de compra..... **108**
ANEXOS..... 109
ANEXO A - Parecer consubstanciado do Conselho de Ética em Pesquisa..... 110
ANEXO B - Comprovante de depósito de patente de inovação ao INOVA-UFPB/INPI..... 113

1 INTRODUÇÃO

O queijo é definido como um produto obtido a partir da coagulação do leite submetido a maturação em temperatura adequada na presença de microbiota específica (ASENSIO; GROSSO; JULIANI, 2015). Queijos frescos podem ser produzidos com ou sem a adição de culturas iniciadoras e são obtidos por coagulação enzimática ou ácida do leite cru ou pasteurizado, sendo, geralmente, mantidos sob refrigeração (HASSANIEN et al, 2014). Estes queijos apresentam textura macia, sabor ligeiramente ácido, baixo teor de sal e elevado teor de umidade (COELHO et al; 2014). Dentre os queijos classificados como frescos, pode-se citar os queijos cottage, hispânico fresco, grego macio e Minas frescal, sendo este último de amplo consumo no Brasil (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005; ROGGA et al, 2015; COELHO et al, 2014; ASENSIO; GROSSO; JULIANI, 2015).

Bactérias ácido láticas (BAL), particularmente co-culturas de *Lactococcus lactis*, são empregadas como ferramentas importantes para a produção de derivados lácteos. As culturas mesófilas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* compõem uma das co-culturas tecnológicas mais importantes para produção de produtos lácteos (SMIT; SMIIT; ENGELS, 2005; TURCHI et al., 2013). Em derivados lácteos, a co-cultura de BAL é responsável pela produção de ácido lácteos por meio da fermentação da lactose, provocando a redução do pH do leite de 6,6 para aproximadamente 4,6, o que resulta na coagulação do leite (MADERA et al., 2003; BERESFORD; WILLIAMS, 2004). A acidificação do leite é essencial para a formação de características próprias do queijo por meio da produção de compostos decorrentes de seu metabolismo (PISANO et al., 2015).

Derivados lácteos, incluindo o queijo, tem sido as principais matrizes de incorporação de probióticos para a elaboração de alimentos funcionais (MOUSAVI et al., 2019). Probióticos são micro-organismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando consumidos em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2001; HILL et al., 2014). No intestino, esses micro-organismos auxiliam na manutenção da homeostase da mucosa, além de protegê-la contra adesão de micro-organismos patogênicos e exercem uma série de outros benefícios por meio da produção de metabólitos (KRISHNA RAO; SAMAK, 2013). Espécies do gênero *Lactobacillus* são os probióticos mais estudados para a incorporação em alimentos e têm sido amplamente utilizados como ingredientes ativos em produtos lácteos funcionais (MEIRA et al., 2015; AMIRI et al., 2019).

Queijos frescos são considerados matrizes adequadas para sobrevivência de probióticos. Entretanto, as características de pH e atividade de água relativamente elevados de

queijos frescos favorecem o crescimento de micro-organismos patogênicos durante o armazenamento, mesmo em temperaturas de refrigeração (CASTRO et al., 2012). Estas características tornam queijos frescos suceptíveis à sobrevivência de patógenos, como *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7), durante o armazenamento. A detecção deste patógeno em diferentes variedades de queijos produzidos a partir de leite cru ou pasteurizado tem sido documentada (GOVARIS et al., 2011; CHOI et al., 2016; KHORSHIDIAN et al., 2018; IOANNA et al., 2018; MEHDIZADEH et al., 2018). Particularmente, queijos frescos estão entre os produtos mais envolvidos em surtos causados por *E. coli* O157:H7 (CDC, 2016).

A crescente preocupação dos consumidores com o excesso de agentes conservantes sintéticos em alimentos tem direcionado a busca por novos antimicrobianos de origem natural que possam ser utilizados em alimentos, como extratos e óleos essenciais (OEs) de plantas. OEs são substâncias naturalmente sintetizadas por plantas como metabólitos secundários, os quais geralmente possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana, e atividade antioxidante (PESAVENTO et al., 2015; ASBAHANI et al., 2015). Dentre os OEs Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA, 2002) nas quantidades utilizadas em alimentos e bebidas, destacam-se aqueles obtidos das espécies *Origanum vulgare* L. (orégano - OEOV) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim - OERO) devido a atividade antimicrobiana frente bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos (BARBOSA et al., 2016). A aplicação destes OEs tem sido avaliada em diferentes matrizes, tais como sucos (ESPINA et al., 2013), carnes (PESAVENTO et al., 2015) e produtos lácteos (HASSANIEN; MAHGOUB; EL-ZAHAR, 2014; ASENSIO; GROSSO; JULIANI, 2015; CARVALHO et al., 2015).

A atividade antibacteriana do OEOV e do OERO frente bactérias tecnológicas e patogênicas associadas a queijos tem sido avaliada em ensaios utilizando meios laboratoriais, ou que simulam a composição de alimentos (CARVALHO et al., 2015; HONÓRIO et al., 2015; SOUZA et al., 2016). Porém, pouco se sabe sobre os efeitos decorrentes da adição de OEOV e OERO no queijo sobre a viabilidade de culturas tecnológicas ou probióticas durante o armazenamento do produto. Tendo em vista que estas bactérias são responsáveis por características sensoriais e funcionais particulares de diversos tipos de queijos, a inibição destes micro-organismos pode repercutir negativamente sobre as características particulares do produto e sobre o benefício à saúde do consumidor. Portanto, é de suma importância o preenchimento desta lacuna do conhecimento para avaliar o real potencial da aplicação sinérgica de OEs na preservação de queijos frescos.

Além disso, o principal fator limitante do uso do OEOV e do OERO em alimentos é o impacto que estas substâncias têm nos aspectos sensoriais dos produtos devido ao forte sabor e odor característico destas substâncias, uma vez que as quantidades desses OEs necessárias para estabelecer a eficácia antimicrobiana geralmente excedem o limiar sensorial para os consumidores (PEDROSA et al., 2019). O uso combinado de OEOV e OERO em concentrações sinérgicas tem sido proposto como uma estratégia para a redução das quantidades empregadas de cada OE em alimentos, como antimicrobianos com ação potencializada e com menor interferência nas características sensoriais do produto.

Considerando estes aspectos, o presente estudo foi desenvolvido para i) avaliar os efeitos da incorporação de OEOV e OERO em combinação sinérgica nas contagens de *Lactococcus* spp., da probiótica *Lactobacillus acidophilus* LA-5, bem como do patógeno *E. coli* O157:H7 em queijo fresco durante o armazenamento refrigerado; ii) determinar os terpenos prevalentes do OEOV e OERO empregados, no queijo ao longo do armazenamento e sua correlação com as contagens do patógeno teste, iii) avaliar os efeitos da incorporação do OEOV e OERO nos aspectos físico-químicos e sensoriais que caracterizam o queijo fresco elaborado, bem como na aceitação do produto durante o armazenamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CULTURAS TECNOLÓGICAS APLICADAS EM PRODUTOS LÁCTEOS

Bactérias ácido láticas (BAL) constituem um grupo de micro-organismos com características metabólicas, fisiológicas e morfológicas comuns. Amplamente distribuídas na natureza, podem ser encontradas na água, solo, esgoto, esterco e silagem. Ainda, podem ser isolados do trato digestório, cavidade oral, onde exercem influência benéfica nos ecossistemas microbianos de seres humanos e animais (HOLZAPFEL; GEISEN; SCHILLINGER, 1995). São predominantes na microbiota de alimentos ricos em proteínas, carboidratos e vitaminas, particularmente, leite, queijo, carne e vegetais (LOPEZ-DÍAZ, 2000).

BAL compõem a microbiota natural do leite cru, ou na forma industrializada, quando são adicionadas intencionalmente para a elaboração de produtos lácteos. BAL são definidas como bactérias Gram-positivas, bastonetes ou cocos não esporulados, anaeróbias facultativos, catalase negativas, desprovidas de citocromos, aerotolerantes, fastidiosas, ácido tolerantes, com metabolismo estritamente fermentativo, sendo o ácido lático o principal produto da fermentação de carboidratos (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007; TODOROV; FRANCO, 2010). Os principais gêneros de BAL incluem *Lactococcus, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus, Leuconoctoc, Oenococcus, Carnobacterium, Desemzia, Pediococcus, Tetragenococcus, Trichococcus, Isobacillum, Weissella* e *Paralactobacillus* (MOHANIA et al., 2008).

Devido à produção de compostos aromáticos como produtos do seu metabolismo, BAL são frequentemente aplicadas como culturas iniciadoras (*starters*) para elaboração de bebidas alcóolicas e produtos fermentados a base de carne, vegetais e leite, conferindo a esses produtos características sensoriais únicas (SMIT; SMIIT; ENGELS, 2005). Entende-se por culturas tecnológicas de BAL, preparações bacterianas compostas por um elevado número de células de um ou mais gêneros e espécies do grupo. Sua principal função tecnológica é promover acidificação rápida durante o processo fermentativo, garantindo a segurança do alimento. Os alimentos fermentados são considerados como parte da dieta básica, e de modo que os principais substratos utilizados na elaboração de produtos fermentados são leite, carne, pepino e repolho. Destes, são produzidas mais de 400 variedades de queijo, de 20 tipos distintos, e uma extensa gama de iogurte e bebidas lácteas fermentadas, salsichas fermentadas e salames, picles e chucrute (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

BAL desempenham papel importante no processamento do queijo, pois ao promover a acidificação rápida, facilitam a retirada do soro, além de contribuir significativamente para o desenvolvimento de propriedades sensoriais características do produto (MADERA et al., 2003; BURITI et al., 2007). *Lactococcus lactis* é uma cepa de BAL que desempenha um importante papel nos processos de fermentação na indústria de laticínios. Entre as cinco espécies de *Lactococcus* conhecidas, a espécie que contribui significativamente na produção de queijos é *L. lactis*, sendo as subespécies mais importantes *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* (SMIT; SMIIT; ENGELS, 2005; TURCHI et al., 2013). Estas bactérias são as mais importantes no uso tecnológico e sua presença em queijos tem sido associado com o aumento da estabilidade microbiana dos produtos durante o armazenamento, a produção de substâncias (por exemplo, ácidos orgânicos, bacteriocinas, gorduras e aminoácidos), e inibição de micro-organismos deteriorantes e patogênicos (COELHO et al., 2014; PISANO et al., 2015; CARVALHO et al, 2015).

A microbiota dos queijos pode ser dividida em dois grupos: bactérias láticas iniciadoras (BLI) e micro-organismos secundários. O grupo de micro-organismos secundários é composto por bactérias láticas não iniciadoras (BLNI), que se multiplicam no interior da maioria das variedades de queijos, e outras bactérias, leveduras e/ou fungos filamentosos que crescem, tanto no interior, quanto na parte externa dos queijos. Entre estes micro-organismos, estão os proteolíticos, lipolíticos e os produtores de gás (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). BAL são responsáveis pela transformação de lactose em ácido lático durante a preparação do queijo. Suas enzimas também contribuem na maturação, estando envolvidas na proteólise e na conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis por propriedades sensoriais características do produto (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

A adição de substâncias antimicrobianas em produtos lácteos pode resultar na inibição do crescimento de BAL ao ponto de interferir na atividade metabólica destas bactérias, e assim, repercutir negativamente sobre as características sensoriais destes produtos. Tendo em vista a importante função das culturas de BAL iniciadoras sobre os atributos sensoriais característicos de produtos lácteos, é fundamental que quaisquer substâncias utilizadas como conservantes nestes produtos sejam avaliadas quanto aos efeitos sobre a viabilidade das culturas tecnológicas empregadas.

2.2 CULTURAS PROBIÓTICAS APLICADAS EM PRODUTOS LÁCTEOS

O interesse dos consumidores nos benefícios relacionados ao consumo de alimentos saudáveis tem aumentado a demanda por alimentos funcionais, particularmente aqueles contendo probióticos (MOUSAVI et al., 2019). Probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Probióticos também podem oferecer potenciais benefícios terapêuticos na prevenção e/ou tratamento de doenças gastrointestinais (KRISHNA RAO; SAMAK, 2013;ETIENNE-MESMIN et al., 2019).

Dentre os efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, probióticos podem melhorar a funcionalidade da permeabilidade da barreira intestinal e promover homeostase da microbiota intestinal, modulação da resposta imunológica através do estímulo na produção de imunoglobulinas, anticarcinogênese, efeito hipocolesterolêmico (VILLARREAL et al., 2013). Ainda, probióticos podem atuar no tratamento de distúrbios gastrointestinais, como a síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal e redução do risco de diarreia causada por bactérias e vírus através de exclusão competitiva, efeito protetor de barreira no lúmen intestinal, e produção de antimicrobianos, além de alívio da má absorção de lactose e alergias alimentares. Estes e outros efeitos benéficos à saúde do hospedeiro tornam os probióticos importantes ferramentas para produção de alimentos funcionais (SELLE; KLAENHAMMER; RUSSELL, 2014; AMIRI et al., 2019).

As espécies pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* (*B. adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. breve* e *B. longum*) e *Lactobacillus* (*L. acidophilus, L. casei, L. fermentum, L. gasseri, L. johnsonii, L. paracasei, L. plantarum, L. rhamnosus* e *L. salivarius*) são micro-organismos que apresentam um volume considerável de estudos para atestar alegações de benefícios à saúde, além de não-restrição para aplicação em produtos lácteos (HILL et al., 2014; AMIRI et al., 2019). Em relação à espécie *L. acidophilus*, sabe-se que algumas cepas que auxiliam na manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal (LUCIANO et al., 2018). Ainda, as cepas de *L. acidophilus* são capazes de produzir uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo ácido lático (> 85 %), peróxido de hidrogênio e numerosa gama de bacteriocinas peptídicas (por exemplo, lactacin B e acidophilucin A) (ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2007). A produção das bacteriocinas é considerada uma vantagem evolutiva e é comprovada pelos prováveis papéis competitivos destas substâncias sobre bactérias endógenas do trato gastrintestinal (TGI). As bacteriocinas sintetizadas por BAL são

heterogéneas, uma vez que variam nas propriedades estruturais e nos mecanismos de inibição, bem como na gama de alvos (SELLE; KLAENHAMMER; RUSSELL, 2014).

Para fornecer efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, os probióticos devem sobreviver às condições do TGI, tolerando pH ácido, enzimas gástricas e bile, para alcançar o intestino em contagens viáveis para aderir e colonizar o epitélio intestinal. Formulações de alimentos com um pH próximo a neutralidade (> 5) e capacidade de tamponamento aumentam o pH gástrico e, consequentemente, podem aumentar a estabilidade dos probióticos durante a digestão (OLIVEIRA et al., 2014).

Um requisito importante para que uma cepa microbiana cumpra o papel de probiótico é que permaneça viável, e em números suficientemente alto, desde a inoculação, durante o processamento e armazenamento e trânsito pelo trato gastrointestinal do hospedeiro. Então, se uma cepa microbiana incluída na formulação de um alimento não é ingerida em população suficiente para sobreviver à digestão, ela será incapaz de atingir o intestino de forma viável e terá sua funcionalidade comprometida (MADUREIRA et al., 2011). Para alegações de funcionalidade rara, o número mínimo de células viáveis pode variar com a cepa empregada (HILL et al., 2014), porém para alegações funcionais gerais, como aquelas comuns a todos isolados de uma mesma espécie, estima-se contagem mínima de probióticos em produtos alimentícios no momento do consumo de 10^6-10^8 UFC/g ou mL (MEDICI; VINDEROLA; PERDIGÓN, 2004; MOUSAVI et al., 2018).

As matrizes lácteas são tradicionalmente usadas como veículos para a administração de probióticos. Dentre elas, os queijos apresentam uma série de vantagens sobre produtos fermentados frescos, pois geralmente possuem pH próximo da neutralidade e capacidade de tamponamento, matrizes sólidas e consistentes, e de apresentarem disponibilidade de nutrientes e menores níveis de oxigênio. Em conjunto, estas condições podem conferir proteção aos micro-organismos durante o armazenamento e exposição às condições adversas encontradas no TGI (ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2006; VILLARREAL et al., 2013; CUFFIA et al., 2017).

Diversos estudos envolvendo queijos probióticos têm sido publicados, incluindo queijos frescos (MEDICI; VINDEROLA; PERDIGÓN, 2004; BURNS et al., 2012; CUFFIA et al., 2017), queijo cremoso (VILLARREAL et al., 2013), queijo Cheddar (ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2006; ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2007) e queijos semi-duros (OLIVEIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014; LOVAYOVÁ et al., 2015; ROLIM et al., 2015; BEZERRA et al., 2016).

Embora estudos que envolvem a incorporação de probióticos em queijos tenham reportado a viabilidade da cepa durante o armazenamento, pouco é sabido sobre os efeitos da adição de substâncias antimicrobianas sobre estas bactérias. Particularmente, são escassos os estudos que avaliam os efeitos de antimicrobianos de origem natural, como extratos de plantas e OEs propostos para aplicação em alimentos lácteos, na viabilidade de probióticos durante o armazenamento (MEHDIZADEH et al., 2018).

2.3 *Escherichia coli* SOROTIPO O157:H7 EM QUEIJO

A contaminação microbiana de queijos de baixa maturação é relevante para a indústria devido aos prejuízos econômicos e para a saúde pública devido ao risco de transmissão de micro-organismos potencialmente patogênicos para os consumidores (CARVALHO et al, 2015). Queijos são considerados veículos de agentes patogênicos de origem alimentar, em particular, os queijos frescos ou de baixa maturação produzidos a partir de leite cru ou pasteurizado (BROOKS et al, 2012; QUERO et al, 2014).

Dentre os diversos micro-organismos que tem sido comumente isolados a partir de queijo, destacam-se as bactérias patogênicas produtoras de shiga-toxina como *E. coli* sorotipo O157:H7 (KHORSHIDIAN et al., 2018), relatadas mundialmente como causadoras de surtos alimentares. *E. coli* têm a capacidade de sobreviver e crescer por até 16 dias no leite cru e pasteurizado, pode crescer em temperaturas variando de 7 °C a 50 °C, com uma temperatura ideal a 37 °C, em alimentos ácidos com pH de 4,4 e com atividade de água (Aa) mínima de 0,95 (HASSANIEN; MAHGOUB; EL-ZAHAR; IOANNA et al., 2018). Estas bactérias podem se reproduzir em temperaturas de refrigeração, que são tradicionalmente aplicadas para o armazenamento de queijo frescos e de baixa maturação (CHOI et al, 2016).

E. coli pertence à família *Enterobacteriaceae*, e devido a sua importância para a saúde pública e seu frequente envolvimento em doenças entéricas é uma espécie amplamente estudada. É uma bactéria Gram-negativa, presente no TGI de animais de sangue quente, exercendo papel de comensal (DRUMOND et al., 2018). Três síndromes clínicas gerais podem resultar da infecção pela *E. coli* patogênica: doença entérica/diarreica, infecções do trato urinário (ITUs) e sepse/meningite (KARPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As cepas de *E. coli* que apresentam patogenicidade intestinal são classificadas em grupos específicos com base em seus genes de virulência e características da doença que causam. São identificadas através dos antígenos expressos na superfície celular: antígenos O - polissacarídeos, antígenos H - flagelares e antígenos K - capsulares. As linhagens de *E. coli*

diarreiogênica incluem *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* difusamente aderente (DEAC) e *E. coli* invasiva aderente (AIEC) que têm sido associadas à doença de Crohn. Existem também grupos híbridos, incluindo *E. coli* enteroagregativa hemorrágica (EAHEC), que carregam genes de virulência associados a STEC e EAEC (KARPER; NATARO; MOBLEY, 2004; FRATAMICO et al., 2016).

Dentre os grupos de *E. coli*, a enterohemorrágica (EHEC) produtora de shigatoxina do sorotipo O157:H7 é um dos mais importantes patógenos de origem alimentar e a causa predominante de doença EHEC-associada no mundo (OTERO et al., 2014; TAYEL et al., 2015; STRATAKOS; GRANT, 2018). Nos seres humanos, um baixo número de células (10 e 100) do sorotipo O157:H7 podem causar diarreia e colite hemorrágica, que pode progredir para síndrome hemolítica urêmica (SHU), especialmente em crianças e idosos (OTERO et al., 2014). SHU é definida como insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática, é considerada a causa mais comum de insuficiência renal aguda em crianças e uma importante causa de morbidade e mortalidade em idosos (IOANNA et al., 2018). A SHU associada à infecção causada por EHEC, também referida como SHU "clássica" ou D + (associada a diarreia), é a forma mais comum de SHU (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010). A incidência de SHU em surtos de infecção causada pelo sorotipo O157:H7 tem sido tipicamente de 7 a 10%, também pode ocorrer como uma complicação da infecção do trato urinário associada ao EHEC (TARR et al., 2005). A gravidade da SHU varia de uma condição incompleta e/ou clinicamente leve a uma doença grave e fulminante com múltiplos órgãos comprometidos, incluindo o trato gastrointestinal, coração, pulmões, pâncreas e sistema nervoso central (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010).

Além de carne bovina malpassada, a água, frutas e vegetais, leite cru e queijos elaborados a partir de leite cru têm sido implicados em infecções causadas por *E. coli* O157:H7 (OTERO et al., 2014). Os principais surtos alimentares envolvendo *E. coli* O157:H7 foram associados ao consumo de produtos lácteos, incluindo queijos de baixa maturação (CDC, 2016).

O leite pode ser contaminado por meio do conteúdo fecal de animais ruminantes que abrigam o patógeno no seu TGI. Surtos de doenças transmitidas por alimentos relacionados a queijos de leite cru têm sido atribuídos a cepas STEC (HONISH et al., 2005; YOON et al., 2016). O consumo de leite não-pasteurizado e produtos derivados tem sido associado à transmissão de *E. coli* O157:H7, porém a contaminação cruzada em queijos preparados a

partir de leite parteurizado é também relevante. Em 1999, mais de 11 % de um número total de casos relatados de infecção causadas por *E. coli* O157:H7 na Inglaterra e País de Gales foram transmitidas pelo consumo de produtos lácteos contaminados (MAHER et al., 2001).

Em 2003, *E. coli* O157:H7 foi vinculada a um surto relacionado com queijo Gouda produzido a partir de leite não pasteurizado envolvendo 13 casos no Canadá. Esse surto resultou em dois casos de SHU letal (HONISH et al., 2005). Em 2010, houve um surto multi-estados de infecções por *E. coli* O157:H7 associadas à ingestão de queijo Gouda nos Estados Unidos, que afetou 38 pessoas em cinco estados (Arizona, Califórnia, Novo México e Nevada) com 15 hospitalizações relatadas e uma ocorrência SHU (CDC, 2010). No Canadá, um surto de colite hemorrágica causado por *E. coli* O157:H7 no final de 2002 foi atribuído ao consumo de queijo Gouda, produzido a com leite cru (HONISH et al., 2005).

O controle de patógenos em queijos é geralmente alcançado por meio do uso de temperaturas de refrigeração durante o armazenamento e uso de conservantes sintéticos (por exemplo, sorbato de potássio e sódio) (ANAND; SATI, 2013). Entretanto, existe uma crescente preocupação por parte dos consumidores em relação ao uso de agentes antimicrobianos sintéticos para a conservação de alimentos. O uso de óleos essências (OEs) tem sido proposto como uma tecnologia emergente de conservação devido a atividade destas substâncias frente bactérias patogênicas de origem alimentar (KHORSHIDIAN et al., 2018).

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONSERVANTES EM ALIMENTOS

Óleos essenciais (OEs) são compostos voláteis extraídos de plantas, líquidos, caracterizados por forte odor, raramente coloridos, solúveis em solventes orgânicos, lipossolúveis e com densidades geralmente menores que a da água. Podem ser extraídos de diversas regiões da planta, e são armazenados em cavidades ou células epidérmicas e secretoras. OEs são produzidos por mais de 17.000 espécies de plantas aromáticas comumente pertencentes às famílias Lamiaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Asteraceae e Zingiberaceae (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012; REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012; PRAKASH et al, 2015).

Constituídos por metabólitos secundários de plantas aromáticas, os OEs possuem forte atividade antioxidante e atividade antimicrobiana. Sua composição inclui, principalmente aldeídos, álcoois, cetonas, ésteres, monoterpenos e fenilpropanoides, que, em sua maioria, são voláteis (Figura 1). De acordo com a sua estrutura química esses compostos podem ser divididos em quatro grupos, terpenos, terpenoides, fenilpropenos e outros. Terpenos são

hidrocarbonetos constituídos por várias unidades de isopreno (C_5H_8), enquanto os terpenoides são modificações bioquímicas de terpenos, que através de enzimas recebem moléculas de oxigênio e ou recebem ou perdem grupos metil. Terpenoides, em geral, possuem maior potencial antimicrobiano do que os terpenos (BURT, 2004; AIT-OUAZZOU et al., 2011; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; PRAKASH et al, 2015). Fenilpropenos são sintetizados nas plantas a partir do aminoácido precursor fenilalanina, constituindo uma subfamília entre os vários grupos de compostos orgânicos denominados fenilpropanoides. Outros compostos fazem parte de uma série de diferentes produtos de degradação originários de ácidos graxos insaturados, lactonas, terpenos, glicosilados e compostos contendo enxofre e nitrogênio (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

Os constituintes presentes em maior concentração na composição de um OE são comumente citados como os principais responsáveis pelas propriedades antibacterianas. Entretanto, há algumas evidências de que os constituintes menores têm participação importante na atividade antibacteriana, possivelmente através do estabelecimento de um efeito sinérgico entre estes componentes. Ainda, a composição de um OE de uma determinada espécie pode diferir entre as estações de colheita da planta, entre as diferentes localidades geográficas, ou a partir de diferentes partes da mesma planta (BURT, 2004).

A inibição do crescimento dos micro-organismos deve-se, em parte, à hidrofobicidade dos OEs, fato que permite sua passagem pela parede celular e membrana plasmática, danificando a estrutura de polissacarídeos, lipídios e fosfolipídios e provocando dano à membrana. Ainda, algumas moléculas lipofílicas podem se acumular na bicamada lipídica e perturbar a interação lipídio-proteína (BURT, 2004; CALO et al, 2015).

Assim, a ação dos OEs pode provocar vários eventos celulares, destacando-se a sensibilização da dupla camada fosfolipídica, com perturbação na função e composição da membrana plasmática, inativação de vias enzimáticas, inibição do transporte de elétrons para produção de energia, síntese de componentes celulares, bem como o extravasamento de material citoplasmático, lise e eventual morte celular (BURT, 2004; CALO et al, 2015).

Devido às suas propriedades antimicrobianas já comprovadas, OEs têm sido citados como candidatos promissores para uso na conservação de alimentos (BURT, 2004; BOUHDID et al., 2010). OEs e seus constituintes têm sido avaliados na conservação de sucos de fruta (FRIEDMAN et al, 2004; LU; JOERGER; WU, 2014), frutas e vegetais minimamente processados (SOUSA et al., 2015; BARBOSA et al., 2016), carnes (PESAVENTO et al., 2015; GOVARIS et al., 2010) e queijos (GOVARIS et al, 2011;

OLMEDO; NEPOTE; GROSSO, 2013; OTERO et al, 2014; MAKHAL; KANAWJIA; GIRI, 2014; ASENSIO; GROSSO; JULIANI, 2015).

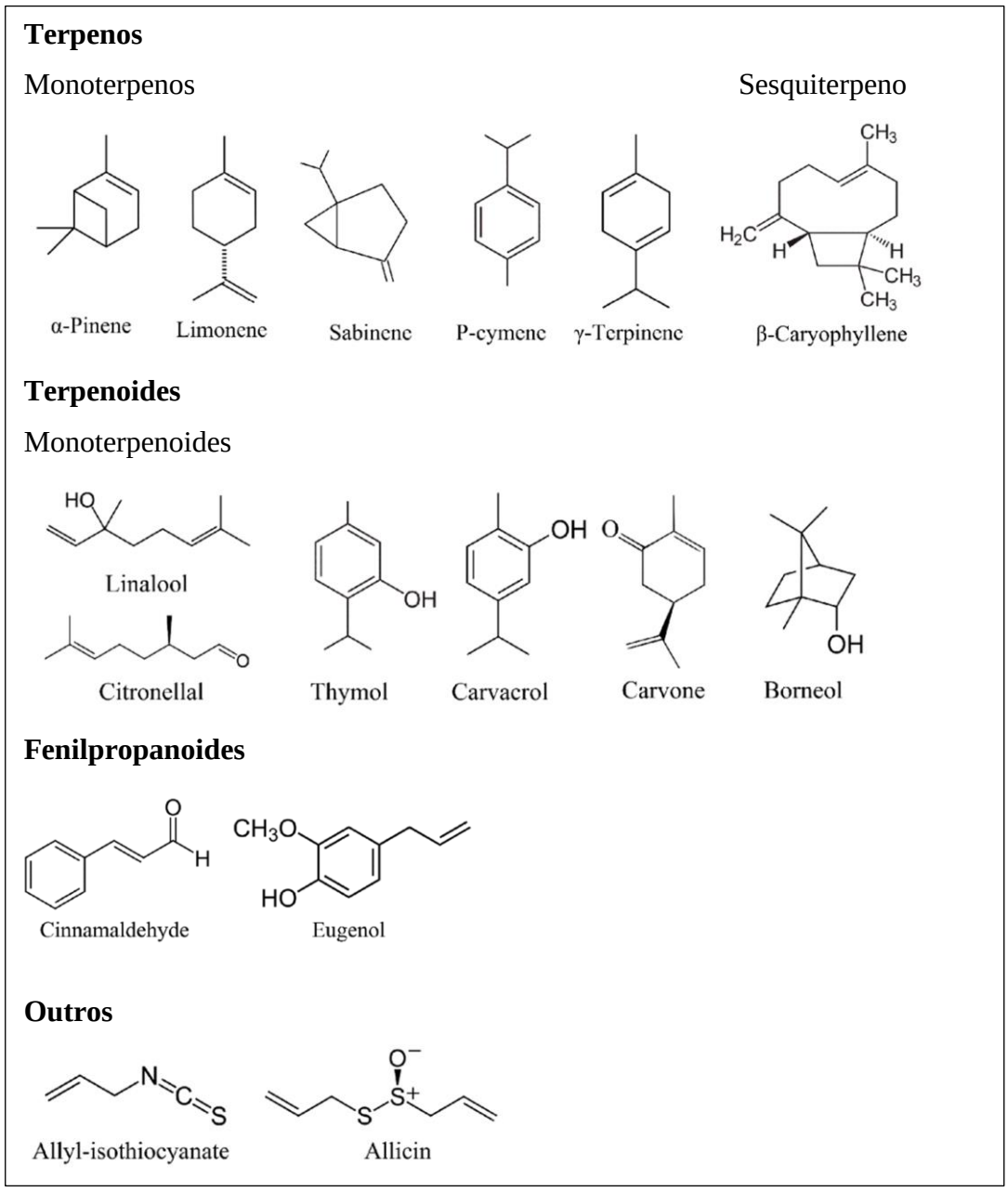

Figura 1. Estruturas químicas dos constituintes de óleos essenciais.

Fonte: Adaptado de Hyldgaard, Mygind e Meyer (2012).

Os fatores intrínsecos e extrínsecos das matrizes alimentares como gordura, proteínas, atividade da água, pH e enzimas podem afetar a eficácia de OEs contra micro-organismos.

Em condições ácidas, por exemplo, a solubilidade e estabilidade do OE pode aumentar, e, consequentemente, sua efetividade antimicrobiana. (BURT, 2004; CALO et al, 2015).

Embora escasso, o conhecimento sobre a eficácia da atividade antibacteriana dos OEs em alimentos e os seus mecanismos de interação com componentes alimentares, estudos prévios mostraram que, em alimentos, maiores concentrações são necessárias que em meios experimentais, devido à interação de alguns compostos da matriz (HSIEH, MAU; HUANG, 2001). Carvalho e colaboradores (2015) encontraram efeitos inibitórios do óleo essencial de *Tymus vulgaris* contra bactérias patogênicas e culturas iniciadoras maiores em caldo à base de queijo do que em queijo semi-sólido. De forma similar, Souza et al. (2016) relataram maior eficácia do OEOV na inibição de patógenos em caldo queijo comparada aquela observada em modelo-base queijo. Entretanto, o odor forte limita a utilização de OE para aumentar a vida de prateleira e a segurança dos produtos alimentares. Como resultado disso, uma dose inibitória (concentração mínima à qual não será observado crescimento bacteriano) em vez de uma dose bactericida é geralmente aplicada (BURT, 2004).

Concentrações elevadas de OEs podem ultrapassar o limite de aceitação sensorial nos alimentos. No entanto, concentrações mais baixas de OEs distintos podem ser usadas em combinação com o objetivo de inibir a multiplicação de patógenos e microbiota deteriorante em alimentos perecíveis sem comprometer a aceitação sensorial (HONÓRIO et al., 2015). Além disso, em alimentos em geral, as concentrações de patógenos são muito mais baixas do que em meios experimentais, estabelecida muitas vezes com valores maiores que 10^5 UFC/g: em alimentos, *S. aureus* e *L. monocytogenes* raramente excedem 10^4 UFC/g e 10^2 UFC/g, respectivamente. Consequentemente, concentrações muito baixas de OEs podem ter efeitos potencialmente bactericidas ou bacteriostáticas nos alimentos (PESAVENTO et al, 2015).

Os OEs classificados como GRAS pela FDA incluem, entre outros, aqueles extraídos do alecrim, cravo, orégano, tomilho, noz-moscada, manjericão, mostarda e canela (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Dentre os diversos OEs que apresentam potencialidade antimicrobiana, destacam-se àqueles obtidos das espécies vegetais *Origanum vulgare* L. (OEOV) e *Rosmarinus officinalis* L. (OERO), conhecidos como fontes de compostos antimicrobianos com potencial uso na conservação de alimentos (CHUN et al., 2005; SOUZA et al., 2007).

2.4.1 Óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

Pertencente à família *Lamiaceae*, o gênero *Origanum* é composto por aproximadamente 38 espécies, as quais são comumente encontradas em áreas montanhosas do Mediterrâneo, podendo crescer em abundância nas pedras, encostas e regiões montanhosas em ampla faixa de altitude (0 - 4000m) (Figura 2). As diferentes espécies pertencentes ao gênero *Origanum* apresentam grande variabilidade química e aroma característico, sendo amplamente empregadas na indústria farmacêutica, cosmética e na culinária (ŞAHIN et al., 2004).

Uma espécie amplamente estudada do gênero *Origanum* é *vulgare* (Figura 2). As propriedades bioativas do OEOV têm sido intensamente estudadas, principalmente sua atividade antimicrobiana (OLMEDO; NEPOTE; GROSSO et al., 2013). O OEOV é uma mistura de monoterpenoide lipofílicos, onde os isômeros carvacrol e timol são geralmente constituintes majoritários e são os principais compostos responsáveis pelo efeito antimicrobiano (PESAVENTO et al., 2015). Outros constituintes frequentemente encontrados no OEOV são linalol, espatulenol, α-pineno, ß-pineno, terpineol, cariofileno, ρ-cimeno, α-pineno, mirceno, canfeno, limoneno, trans-cariofileno, borneol, diidrocarveol e cineol (PESAVENTO et al., 2015). O timol (ou 2-isopropil-5-metilfenol), um derivado natural de monoterpenoide fenol do cimeno, é isômero do carvacrol, estando presente no OEOV e várias outras plantas, com o grupo hidroxila em uma posição diferente no anel fenólico (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

Figura 2. Planta *Origanum vulgare* L.

Fonte: https://tamarorganics.co.uk/product/oregano-p

A ação do OEOV sobre micro-organismos ocorre principalmente pela sensibilização da dupla camada fosfolipídica, com perturbação na função e na composição da membrana plasmática. Além disso, pode causar inativação do mecanismo enzimático e inibição do

transporte de elétrons para produção de energia e da síntese de componentes celulares, resultando no extravasamento de material citoplasmático, lise e eventual morte celular (BURT, 2004).

A presença do grupo hidroxila (OH) nos compostos fenólicos desempenha um papel importante na atividade antimicrobiana do carvacrol e timol (Figura 3). Grupo ativo como o OH promove a deslocalização de elétrons que, em seguida, atuam na troca de prótons e reduzem o gradiente através da membrana citoplasmática de células bacterianas. Isso causa o colapso da força motora de prótons e o esgotamento do pool de ATP e, em última instância, a morte celular. Também foi demonstrado que esses grupos OH podem facilmente estabelecer ligação com o sítio ativo de enzimas, alterando o metabolismo celular de micro-organismos. Esta ação demonstra a importância dos grupos OH na atividade antimicrobiana de constituintes como carvacrol e timol (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

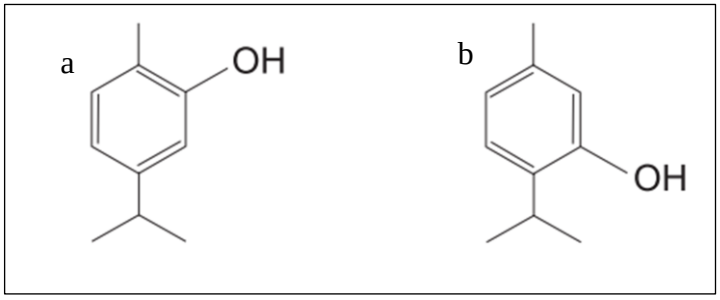

Figura 3. Molécula de carvacrol (a) e timol (b).
Fonte: Burt (2004).

Os isômeros carvacrol e timol possuem estrutura semelhante, no entanto, apresentam eficácia diferente antimicrobiana quando testados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em meio ágar (DORMAN; DEANS, 2000). A diferença na eficácia foi atribuída ao grupo OH localizado na posição *meta* no timol em comparação com a posição *orto* em carvacrol (BURT, 2004).

Entretanto, além do grupo OH, o carvacrol possui um sistema de elétrons deslocalizados envolvido na desestabilização da membrana citoplasmática que atuam como trocadores de prótons, reduzindo assim o gradiente de pH através da membrana citoplasmática e levando à morte celular. Embora, compostos como o eugenol, tenham um grupo OH, não apresentam alta atividade antimicrobiana devido à ausência de um sistema de ligações duplas que dificulta a liberação do próton H^+ (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Acredita-se que os constituintes de OEs são geralmente mais eficazes contra bactérias Gram-positivas devido à interação direta da membrana celular com os componentes hidrofóbicos dos OEs (CALO et al., 2015). Entretanto, o carvacrol e o timol são capazes de causar desintegração da membrana externa das bactérias Gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos (LPS) e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP (BURT, 2004).

A exposição de cepas de *S. aureus*, isoladas a partir de alimentos, ao OEOV resultou na perda da tolerância ao sal e à redução da capacidade de formação de colônias (BARROS et al., 2009). Souza et al. (2010) relataram que este OE pode ser aplicado em produtos alimentares, tanto para inibir o crescimento de *S. aureus* quanto para suprimir a síntese de enterotoxinas estafilocócicas. Govaris e colaboradores (2010) estudaram a ação combinada de OEOV com 0,6% de nisina a 500 ou 1000 UI/g de carne ovina picada, e obtiveram efeito um antimicrobiano aditivo contra *Salmonella* Enteritidis durante o armazenamento a 4 °C ou 10 °C. Em outro estudo, Govaris e colaboradores (2011) relataram a atividade antibacteriana de OEOV contra *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* em queijo artificialmente contaminado.

2.4.2 Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

A espécie *Rosmarinus officinalis* L. pertencente à família *Lamiaceae*, a espécie *Rosmarinus officinalis* L., vulgarmente conhecida como alecrim, possui porte subarbustivo lenhoso, ereto e muito ramificado de até 1,5 m de altura. As folhas são sésseis, finas, opostas e lanceoladas; as flores são azuis ou brancas e tem sabor picante (Figura 4) (LORENZI; MATOS, 2006). A planta exala aroma forte e agradável, sendo uma erva muito usada para fins culinários, medicinais e aromáticos, sendo o OE aplicado em cosméticos e perfumaria (LORENZI; MATOS, 2006). É nativa do Mediterrâneo, cultivada também na Ásia Central, Índia, Sudeste Asiático, África do Sul, Austrália e Estados Unidos. No Brasil, sua produção se localiza, principalmente, na região sul do país (CARVALHO JÚNIOR, 2004). Diversos estudos têm relatado propriedades antimicrobianas do alecrim, e particularmente do seu OE (SOUSA et al., 2012; GOMES NETO et al., 2012).

Figura 4. Planta *Rosmarinus officinalis* L.
Fonte: https://wsimag.com/pt/bem-estar/26679-alecrim

OERO apresenta ação inibitória do crescimento e sobrevivência de diferentes micro-organismos patogênicos e deteriorantes de interesse em alimentos, embora os resultados tenham variado de acordo com os micro-organismos ensaiados, origem do OE e método utilizado para determinar efeito antimicrobiano (DIMITRIJEVIĆ et al., 2007; MARINO; BERSANI; COMI, 2001; JIANG et al. 2011). Sua atividade antimicrobiana tem sido relacionada a mecanismos comuns aos demais OEs, que tem início com a perturbação da membrana, podendo ser seguida de interferência em eventos celulares fundamentais para a viabilidade da célula microbiana (AZERÊDO et al., 2011). O OERO pode ser classificado em três quimiotipos: cineoliferum (alto conteúdo em 1,8-cineol ou eucaliptol); canforiferum (cânfora > 20%); e verbenoniferum (verbenona > 15%) (NAPOLI; CURCURUTO; RUBERTO, 2010). Esta variabilidade química pode ser encontrada entre plantas pertencentes à uma mesma população (JORDÁN et al., 2011). Essa variabilidade pode ser considerada como uma vantagem evolutiva, permitindo correlacionar a composição química e as atividades biológicas descritas para plantas individuais (JORDÁN et al., 2013).

Dentre os constituintes do OERO descritos pela literatura, são citados cânfora, α-pineno, borneol, verbenona, mirceno, entre outros, porém o constituinte mais comumente relatado como majoritário é 1,8-cienol (eucaliptol), que pode representar até 47% do OERO (SANTOYO et al., 2005). A atividade antibacteriana do óleo essencial de alecrim contra bactérias Gram-negativas pode ser atribuída à combinação de vários constituintes menores presentes no óleo, que atuam sinergicamente com outros compostos voláteis presentes em menor quantidade (NIKKAH et al., 2017).

Embora o OERO seja constituído por uma variedade de compostos individuais, suas propriedades antimicrobianas, geralmente, são atribuídas ao seu composto majoritário 1,8-cineol. Devido a suas propriedades hidrofóbicas, o 1,8-cienol (eucaliptol) é capaz de penetrar

na célula microbiana, onde interfere em mecanismos essenciais para o metabolismo microbiano (CELIKTAS et al., 2005). Em contraste ao conhecimento já estabelecido acerca do mecanismo de ação do carvacrol, que é o composto majoritário comumente relatado do OEOV, OE oriundo de espécie pertencente à mesma família que o OERO, o mecanismo de ação do 1,8-cienol (eucaliptol) ainda não é totalmente conhecido (PESAVENTO et al., 2015). Entretanto, assim como observado para o carvacrol e o OEOV, ensaios com o OERO e o 1,8-cienol (eucaliptol) conduzidos paralelamente tem demonstrado resultados semelhantes (GOMES NETO et al., 2012), embora as proporções de 1,8-cienol (eucaliptol) no OERO sejam menores quando comparadas aquelas geralmente encontradas de carvacrol no OEOV.

Entretanto, há uma carência de informações sobre os efeitos do OEOV e OERO na sobrevivência e o crescimento de destas bactérias patogênicas quando aplicados em queijo durante o armazenamento. E ainda são escassos relatos científicos, até o presente momento, sobre a influência do OEOV na sobrevivência de BAL utilizadas como ferramentas tecnológicas na produção de queijo.

2.1.3 Uso combinado de OEs

O uso de OEs como conservantes de alimentos é limitado, pois para alcançar o efeito antimicrobiano desejado na matriz alimentar, em muitos casos as concentrações requeridas causam alterações sensoriais indesejáveis, particularmente, no sabor e odor do alimento (OLMEO; NEPOTE; GROSSO, 2013). Esta aplicação de OEs em alimentos exige a avaliação dos efeitos sobre as propriedades organolépticas do produto onde estes compostos serão aplicados com o objetivo de controlar o micro-organismo de risco na matriz alimentar (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008). Uma alternativa é a aplicação combinada de OEs ou seus constituintes em concentrações sub-inibitórias, que permitam manter a segurança do produto, garantindo sua vida de prateleira, porém minimizando o sabor indesejável e ou alterações sensoriais associadas (AZERÊDO et al., 2011; SOUSA et al., 2012).

Estudos têm relatado que a combinação de alguns OEs e/ou seus constituintes pode contribuir mais efetivamente que um OE/constituinte aplicado de maneira isolada. Os efeitos benéficos dessa combinação podem ser aditivos ou sinérgicos, sendo de grande interesse industrial, uma vez que menores concentrações seriam requeridas para atuar na preservação de alimentos (SOLORZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2011).

Azerêdo e colaboradores (2011) relataram efeito sinérgico entre o OEOV e OERO frente *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610, *Aeromonas hydrophilla* INCQS 7966 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 11253 em vegetais folhosos frescos. Segundo os pesquisadores, os OEs combinados em concentrações subinibitórias foram eficazes na inibição do crescimento e sobrevivência dos micro-organismos testados. E quando avaliados os atributos sensoriais, a aplicação combinada dos OEs para desinfecção dos vegetais folhosos recebeu escores equivalentes a "gostei ligeiramente", demonstrando que a combinação de OEs pode ser uma alternativa para garantir a segurança microbiana e aceitabilidade sensorial em alimentos. Barbosa e colaboradores (2016) encontraram efeito redutor dos OEOV e OERO combinados sobre as contagens de células viáveis de *E. coli* e *S. enterica* Sorovar Enteritidis em legumes frescos infectados experimentalmente, além de diminuir as contagens da microbiota autóctone (bactérias mesófilas, enterobactérias e fungos).

Uma possível explicação para ocorrência do sinergismo entre OEs seria uma potencialização decorrente de um facilitador inicial para o estabelecimento da atividade, como por exemplo, uma perturbação inicial da membrana pela ação dos constituintes mais hidrofóbicos presentes no óleo, facilitando a entrada de outros constituintes na célula. No caso do OEOV e do OERO, este sinergismo poderia ocorrer particularmente entre os compostos majoritários, onde pela ação do eucaliptol, a entrada do carvacrol na célula é facilitada (1AZERÊDO et al., 2011). Honório e colaboradores (2016) investigaram a aplicação combinada de OEOV e OERO e de carvacrol e eucaliptol em amostras de carne e queijo, e relataram redução da viabilidade celular e alterações ultra-estruturais na superfície das células de *S. aureus*.

Sousa e colaboradores (2012), investigaram os efeitos da exposição a concentrações sub-letais de carvacrol e eucaliptol isoladamente e em combinação sobre a morfologia, a viabilidade celular e permeabilidade da membrana de *P. fluorescens.* As análises ultra-estruturais revelaram que a exposição aos compostos em combinação provocou alterações na membrana citoplasmática, causando vazamento do material intracelular devido ao aumento da permeabilidade da membrana. Nesse estudo, os pesquisadores relataram uma potencialização da atividade dos compostos na aplicação combinada, que foi traduzida em maior queda da contagem de células viáveis em comparação a aplicação isolada. Posteriormente, Oliveira et al., (2015) relatou que quando aplicados em combinação frente bactérias associadas com hortaliças minimamente processadas (*Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila* e *P. fluorescens*), em cultura mista, carvacrol e eucaliptol apresentaram interação sinérgica. Similar ao reportado por Sousa et al. (2012), a aplicação combinada do carvacrol e do

eucaliptol causou, além do aumento da permeabilidade da membrana, alterações ultra estruturais na superfície das células.

Embora já se tenha bem estabelecido o papel antimicrobiano dos OEs e seus constituintes em estudos *in vitro* e em algumas matrizes alimentares, são ainda escassos os dados acerca da ação destes compostos aplicados sozinhos ou em combinação, durante o armazenamento, bem como os efeitos sobre bactérias tecnológicas. A adição de OEs em produtos lácteos pode interferir também na sobrevivência de culturas probióticas, e assim, repercutir negativamente nos aspectos funcionais dos produtos. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos que o uso de concentrações efetivas destas substâncias para a inativação de patógenos em produtos lácteos exerceria na sobrevivência de culturas *starter* ou probióticas, ou ainda nos aspectos de qualidade do produto. Assim, o desenvolvimento de pesquisas com este enfoque pode contribuir para a geração de informações relevantes tanto para a indústria de alimentos, como para a área acadêmica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

O OEOV (lote 228, densidade a 20 °C: 0,93; índice de refração a 20 °C: 1,51) e o OERO (lote 165, densidade a 20 °C: 0,92; índice de refração a 20 °C: 1,46) foram adquiridos através da empresa nacional fornecedora de óleos essenciais Ferquima Indústria e Comércio LTDA (Vargem Grande Paulista, Brasil), a qual obtém o produto através de processo de arraste por vapor d'água (hidrodestilação) em escala industrial. As emulsões do OEOV e OERO utilizadas em ensaios foram preparadas em caldo de Brian Heart Infusion esterilizado (BHI, Himedia, Índia) em uma variedade de concentrações usando Tween 80 (1%, v/v; Sigma-Aldrich, EUA) como emulsionante (SOUZA et al., 2016). Na concentração mais elevada (1%, v/v), o Tween 80 não apresentou efeito inibitório contra as cepas bacterianas testadas.

3.2 MICRO-ORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A co-cultura iniciadora composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R-704, lote 3122631) e a cultura probiótica comercial de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5, lote 2914230) foram obtidas da Christian Hansen Brasil® (Valinhos, Minas Gerais, Brasil). A cepa de *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7) isolada de alimentos (SISGEN A1802CF) foi utilizada como patógeno de teste. As cepas estoque de todas as bactérias ensaiadas foram mantidas em criotubos contendo caldo BHI e glicerol (8:2, v/v) a -80 °C.

3.2.1 Preparo do inóculo

Para preparo do inóculo, *Lactococcus* spp., *L. acidophilus* LA-5 ou *E. coli* O157:H7, foram previamente cultivados *overnight* (18-20h) a 37 °C em caldo M17 (Himedia), caldo Man, Rogosa, and Sharpe (MRS, Himedia) ou caldo BHI (Himedia), respectivamente. Em seguida, a massa celular dos cultivos foi coletada por centrifugação (4500 × *g* por 15 min a 4 °C) foi lavada duas vezes e resuspendida em solução salina (NaCl 0,85 g/100 mL, p/v) (SOUZA et al., 2016).

Para a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC), as suspensões microbianas foram submetidas à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) e cada diluição foi inoculada pela técnica de microgota (HERIGSTAD et al., 2001) na superfície de placas de Petri contendo o ágar seletivo para a bactéria em cultivo (M17, MRS ou BHI ágar pata *Lactococcus* spp., *L. acidophilus* LA-5 e *E. coli* O157:H7, respectivamente. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 ºC por 24 horas. As placas contendo o inóculo de *L. acidophilus* LA-5 foram incubadas em condições anaeróbicas (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). Após incubação, as placas contendo o crescimento bacteriano foram submetidas à contagem do número de colônias formadas. A leitura de Densidade Óptica (OD) a 660 nm (OD_{660}) destas suspensões foi de 0,1 e 0,09 o que proporcionou contagem de células viáveis de, aproximadamente, 8 e 7 log UFC/mL para as BALs e para o patógeno, respectivamente.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E DE *Rosmarinus officinalis* L.

Os compostos voláteis do OEOV e OERO foram identificados usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-SM, QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japão) como descrito previamente por Carvalho et al. (2015). Foram aplicadas as seguintes condições: coluna capilar RTX-5MS (30 m em 0,25 mm por 0,25 μm), temperatura do programa, 60 a 240 °C (3 °C/min); temperatura do injetor, 250 °C; temperatura do detector, 220 °C; gás transportador, hélio ajustado para 0,99 mL/min; energia ionizante, 70 eV; e intervalo de massa, de 40 a 500 Da. O banco espectral de GC-MS, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database versão 1.7 (Instituto Nacional de Tecnologia de Padrões, Norwalk, CT) foi usado para identificar os constituintes individuais em OEOV e OERO, que foram expressos como unidade de área (unidade de área, UA x 10^6) (BEZERRA et al., 2017).

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEOV e OERO frente *Lactococcus* spp. e *L. acidophilus* LA-5 foi determinada através do método de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) com modificações (CLSI, 2012). Inicialmente, um volume de 50 μL (~ 6 log UFC/mL) do inóculo da cepa teste foi adicionado a cada poço da microplaca contendo 50 μL de caldo BHI ou MRS adicionado de diferentes concentrações dos OEs, variando de 40 a 0,312 μL/mL para OEOV e

de 85 a 0,66 μL/mL para OERO. As microplacas foram parcialmente embaladas com filme plástico para evitar a desidratação bacteriana e garantir que OEOV e OERO não se volatilizassem. Cada placa incluía controles da cepa teste sem OEOV e OERO e o controle de esterilidade do meio sem a cepa teste. A microplaca contendo *L. acidophilus* LA-5 foi incubada sob anaerobiose. Após o período de incubação por 24 h a 37 °C foram adicionados 30 μL da solução aquosa de resazurina (Inlab) (0,01%) em todos os poços, seguido de reincubação a 37 °C por 20 min, quando foi realizada a leitura visual. A permanência da cor azul nos poços foi interpretada como ausência do crescimento bacteriano, enquanto o desenvolvimento de cor rosa ou incolor foi interpretada como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração de OE capaz de inibir o crescimento a cepa teste (CARVALHO et al., 2015).

3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONAL (CIF)

O método de *checkerboard* usando macrodiluição em caldo foi realizado para obter o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) para a aplicação combinada de OEOV e OERO frente *Lactococcus* spp. e *L. acidophilus* LA-5. As emulsões dos OEs foram preparadas em caldo BHI ou MRS adicionado de Tween 80 (1%, v/v; Sigma–Aldrich, USA) como agente estabilizador da emulsão e o inóculo microbiano foi preparado como descrito no item 3.2.1. Foram utilizadas concentrações finais iguais a CIM, 1/2 CIM, 1/4 CIM, 1/8 CIM, 1/16 CIM, e 1/32 CIM para OEOV e OERO distribuídos em 49 tubos de 15 mL ordenados em 7 colunas de 7 tubos. Em cada tubo, foram adicionados 5 mL de cada emulsão de OE e, em seguida, 1 mL do inóculo da cepa teste. Na horizontal (da direita para esquerda), o OEOV foi adicionado a cada tubo com concentração decrescente (Figura 5). Na vertical (de cima para baixo), o OERO foi adicionado com concentração decrescente (Figura 5). Após a adição do inóculo da cepa teste, os tubos foram incubados a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação (em anaerobiose para *L. acidophilus* LA-5), foram adicionados 3 mL da solução aquosa de resazurina (Inlab) (0,01%) em todos os poços, seguido de reincubação a 37 °C por 20 min, quando foi realizada a leitura visual. A CIF foi definida como a menor combinação dos OEs capaz de inibir o crescimento a cepa teste (BARBOSA et al., 2016).

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

$$ICIF = CIF\ (OEOV) + CIF\ (OERO)$$

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

Os resultados obtidos foram interpretados como sinergismo (FIC ≤ 0.5), aditivo (0.5 < FIC ≤ 1); indiferença (1 < FIC < 4) ou antagonismo (FIC ≥ 4) (ITEN et al., 2009).

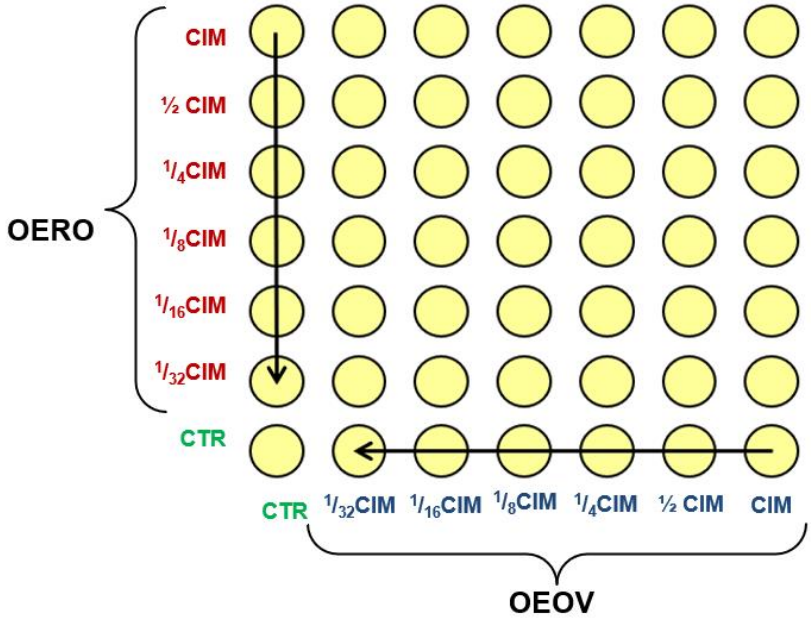

Figura 5. Representação gráfica do método de *checkerboard.*

3.6 QUEIJO ADICIONADO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E DE *Rosmarinus officinalis* L.

3.6.1 Produção dos queijos

Todos os queijos foram elaborados no Laboratório de Leite e derivados da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa, Paraíba, Brasil). O queijo foi produzido seguindo o procedimento descrito por Sant'Ana et al. (2013) com modificações (Figura 6). Foram produzidos queijos com culturas de BALs distintas; um queijo com adição de *Lactococcus* spp. e um outro queijo com adição de cultura probiótica composta por *L. acidophilus* LA-5. Para o queijo produzido com *Lactococcus* spp. foram adotadas as concentrações de 0,03 μL/g e 1,32 μL/g de OEOV e OERO, respectivamente; e para o queijo produzido com *L. acidophilus* LA-5 foram adotadas as concentrações de 0,07 μL/g e 2,65

μL/g de OEOV e OERO, respectivamente. Estas concentrações foram selecionadas porque foram a menor concentração combinada que apresentou ICIF correspondente a sinergismo no teste de *checkerboard* frente às culturas de BAL. A produção do queijo sem OEOV e OERO foi realizada de forma semelhante.

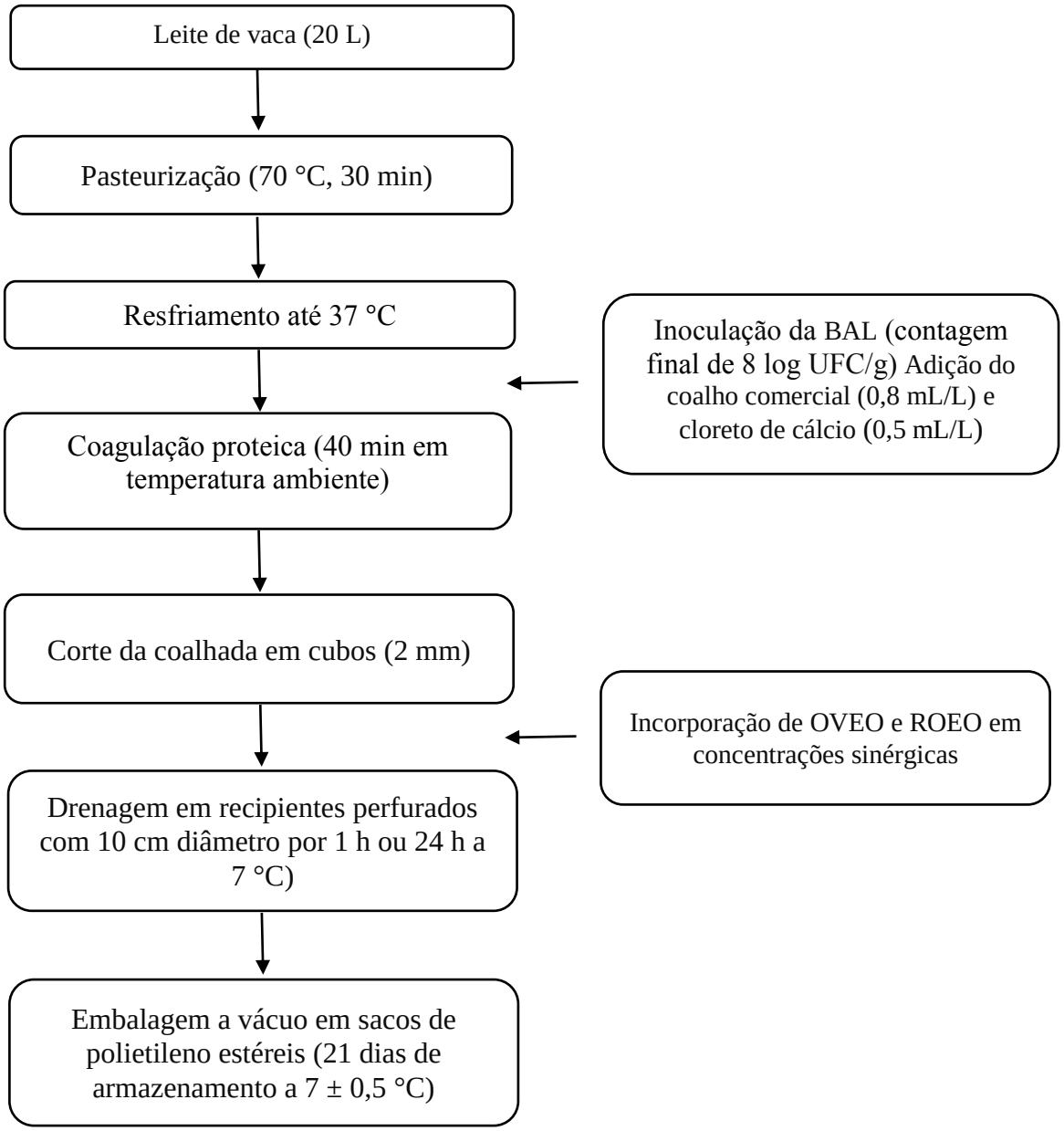

Figura 6. Fluxograma da produção do queijo com ou sem óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e de *Rosmarinus officinalis* L.

3.6.2 Amostragem do queijo produzido com *Lactococcus* spp.

Um total de 40 unidades de queijo fresco (100 g) produzidos com *Lactococcus* spp. foram elaboradas com OEs e 40 queijos sem OEs foram obtidos em triplicata. Oito unidades de cada queijo (com ou sem OE) foram utilizadas para avaliar os efeitos dos OEs combinados sobre as contagens de *Lactococcus* spp., bem como para quantificar os terpenos prevalentes em zero, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias de armazenamento refrigerado. Em paralelo, em oito unidades de cada queijo foi adicionado uma suspensão de *E. coli* O157:H7 com uma população final de 5 log UFC/g, aproximadamente, homogeneizadas e embaladas separadamente para análises realizadas em zero, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias de armazenamento. Dezesseis unidades de cada lote foram utilizadas nas análises físico-químicas (Aa, sinérese, umidade, gordura, proteínas, acidez titulável, pH, cor, textura, determinação de ácidos orgânicos e açúcares), onde quatro unidades foram selecionadas aleatoriamente para uso em análises realizadas em 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento. Finalmente, oito unidades de cada queijo foram usadas para análises sensoriais (ADQ) e para análises microbiológicas, com o intuito de verificar a conformidade com o padrão microbiológico em 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado (7 ± 0,5 °C).

3.6.3 Amostragem do queijo produzido com *L. acidophilus* LA-5

Um total de 60 queijos (200 g) produzidos com *L. acidophilus* LA-5 foram elaborados com e sem OVEO e ROEO em cada lote (três lotes independentes foram preparados). Oito unidades de cada queijo (com ou sem OEs) foram utilizadas para avaliar os efeitos dos OEs combinados sobre as contagens de *L. acidophilus* LA-5 e quantificação de terpenos em zero, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias de armazenamento refrigerado. Outras oito unidades de cada queijo foram adicionadas de uma suspensão de *E. coli* O157:H7 para análises em zero, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias de armazenamento. Quatro unidades de cada queijo foram produzidas para enumeração de *L. acidophilus* LA-5 após condições gastrointestinais simuladas e análises físico-químicas (sinérese, umidade, gordura, proteínas, acidez, pH, determinação de ácidos orgânicos e açúcares) durante o armazenamento. Quarenta unidades de cada queijo (com ou sem OEs) foram utilizadas na análise sensorial (teste de aceitação e intenção de compra). Os queijos obtidos foram embalados a vácuo em sacos de polietileno esterilizados e armazenados por 21 dias em armazenamento refrigerado (7 ± 0,5 °C).

3.7 DETERMINAÇÃO DOS TERPENOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E *Rosmarinus officinalis* L. EM QUEIJO DURANTE O ARMAZENAMENTO

Os terpenos identificados em quantidades mais elevadas no OEOV (ou seja, timol, benzeno, carvacrol, ρ-cimeno, α-terpineno, linalol e γ-terpineno) e OERO (ou seja, eucaliptol, cânfora, α-pineno, cariofileno e borneol) foram monitorados em amostras de queijo fresco com e sem OEOV e OERO em combinação nos dias zero, 3, 6, 9, 15, 18 e 21 de armazenamento refrigerado.

3.7.1 Queijo produzido com *Lactococcus* spp.

Os extratos foram obtidos seguindo procedimentos descritos por Jiang; Kempinski; Chappell (2017) com modificações. Amostras de queijo (1g) foram homogeneizadas com 5 mL de hexano sob agitação usando agitador magnético durante 10 min à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada (4000 g, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,45 mm e analisado através de CG-MS seguindo os procedimentos descritos na seção 3.3.

3.7.2 Queijo produzido com *L. acidophilus* LA-5

Os extratos foram obtidos seguindo os procedimentos descritos por Abilleira et al. (2010). A concentração inicial de cada terpeno monitorado no queijo foi definida como aquela medida no queijo logo após o tempo de 24 horas de dessoragem (dia zero de armazenamento), tempo definido como dia "zero" de armazenamento.

A extração dos terpenos foi realizada utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME) com dispositivo SPME (Supelco, Bellafonte, PA, USA) contendo uma fibra de sílica fundida revestida com camada de 50/30 µm de Polidimetilsiloxano/Carboxen/Divinilbenzeno (PDMS/CAR/DVB). Foram pesadas 2g de queijo em frasco de vidro âmbar de 20 mL hermeticamente fechados com tampas rosqueáveis, contendo septo revestido de teflon. Após o equilíbrio a 40 ºC por 10 min, a fibra foi exposta ao *headspace* por 40 min. Após a extração, o dispositivo SPME foi inserido diretamente na porta de injeção da GC-MS.

A separação dos compostos foi realizada em cromatógrafo a gás 7890B acoplado a um espectrômetro de massas da Agilent Technologies 5977B (Little Falls, DE, USA). A coluna

utilizada foi a VF-5ms (30m x 0,25mm x 0,25 µm). O forno foi inicialmente aquecido a 40 °C por 10 min, com um aumento até 110 °C a uma taxa de 5 °C/min, seguido por outro aumento até 240 ºC a uma taxa de 10 ºC/min, com totalizando 37 min de tempo de corrida. A linha de transferência entre o cromatógrafo e espectro de massa foi equilibrado a 230 °C. O sistema operou no modo *splitless*. A válvula do *split* foi aberta 5 min após a injeção. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C. O espectrômetro de massa operou em uma faixa de massa de 35 a 350 m/z. A identificação foi realizada segundo descrito na seção 3.3. Os resultados foram expressos como área unitária (unidade de área, UA x 10^5) (Bezerra et al., 2016).

3.8 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E DE *Rosmarinus officinalis* L. COMBINADOS SOBRE CONTAGENS DE *Lactococcus* spp. E *L. acidophilus* LA-5 VIÁVEIS EM QUEIJO

Os efeitos da adição do OEOV (0,03 ou 0,07 µL/g) e OERO (1,32 ou 2,65 µL/g) em combinação sobre as contagens de *Lactococcus* spp. e *L. acidophilus* LA-5 em amostras de queijo foram ensaiados nos dias zero, 3, 6, 9, 15, 18 e 21 de armazenamento refrigerado. A cada tempo de armazenamento pré-estabelecido, as amostras de cada queijo (25 g), com *Lactococcus* spp ou *L. acidophilus* LA-5, foram homogeneizadas em solução salina esterilizada (1:10 p/v) seguido de diluição seriada em solução salina (10^{-1} – 10^{-5}). Subsequentemente, alíquotas de 10 µL de cada diluição foram inoculadas por meio da técnica de microgota (HERIGSTAD et al., 2001) em ágar M17 (Himedia, India) para enumeração de *Lactococcus* spp. e em ágar MRS Bile (MRSB) para enumareação de *L. acidophilus* LA-5 (GEBARA et al., 2015) . As placas foram incubadas a 37 °C por 24 - 48 h, sob anaerobiose para enumeração de *L. acidophilus* LA-5, e os resultados foram expressos em log UFC/g o limite de detecção foi de 2 log UFC/g. A produção do queijo sem OEOV e OERO foi ensaiado similarmente ao queijo com OE.

3.9 DESAFIO EXPERIMENTAL EM QUEIJO INOCULADO COM *E. coli* O157:H7

Os efeitos da adição de OEOV (0,03 ou 0,07 µL/g) e OERO (1,32 ou 2,65 µL/g) sobre as contagens de *E. coli* O157:H7 em amostras de queijo artificialmente contaminadas foram monitorados nos dias zero, 3, 6, 9, 15, 18 e 21 de armazenamento refrigerado. Após a remoção do soro na coalhada (como descrito na seção 3.6.1) as amostras de queijo (9 g) foram inoculadas com a suspensão de *E. coli* O157:H7 com população final de

aproximadamente 5 log UFC/g, homogeneizadas, embaladas a vácuo em sacos de polietileno esterilizadas e armazenadas sob refrigeração. Em cada intervalo de tempo de armazenamento pré-estabelecido, a amostra de queijo contaminado foi misturado à solução salina (1:10 p/v) usando um agitador e diluído seriadamente (10^{-1} – 10^{-5}) em solução salina (COSTA et al., 2018). Posteriormente, alíquotas de 10 µL de cada diluição foram distribuídas por meio da técnica de inoculação por microgota (HERIGSTAD et al., 2001) em ágar MacConkey Sorbitol (HiMedia, Mumbai) para contagem de células viáveis de *E. coli* O157:H7. O queijo produzido sem OEOV e OERO foi ensaiado similarmente ao queijo com OE. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e os resultados foram expressos em log UFC/g e o limite de detecção foi de 2 log UFC/g.

3.10 ENUMERAÇÃO DE *L. acidophilus* LA-5 EM QUEIJO APÓS SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS DURANTE O ARMAZENAMENTO

Células viáveis de *L. acidophilus* LA-5 foram enumeradas no queijo fresco com e sem OEs durante a exposição a condições gastrointestinais simuladas em zero, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado. Amostras de queijo foram submetidos ao processo de simulação da digestão em múltiplos passos como apresentado na Tabela 1, a simulação foi realizada em incubadora a 37 ºC e agitação mecânica (Thoth 6420) foi utilizada para simular os movimentos peristálticos, com ajuste de rotação em cada etapa (esôfago-estômago, duodeno e íleo) (LUCIANO et al., 2018). a simulação foi contínua com aumento do volume total em cada etapa, assim como ocorre na digestão real.

A etapa do esôfago-estômago foi simulada usando 25 mg de pepsina diluída em 1 mL de HCl 0,1 M, adicionado a uma taxa de 0,05 mL/mL, com redução gradual do pH usando HCl 1 M (pH 5,5/10 min; pH 4,6/10 min, pH 3,8/10 min, pH 2,8/20 min, pH 2,3/20 min e pH 2,0/20 min) sob agitação (130 rpm) a 37 °C.

A etapa do duodeno foram simuladas com adição de solução intestinal contendo pancreatina (2 g/L de NaHCO3 0,1 M) e sais biliares bovinos (12 g/L de NaHCO3 0,1 M), pH ajustado para 5,0 com NaHCO3 0,1 M e tempo de exposição de 30 min sob agitação (45 rpm); e etapa do íleo com pH ajustado para 6,5 utilizando NaHCO3 0,1 M, com tempo de exposição de 60 min sob agitação (45 rpm). Após cada etapa digestiva, alíquotas da amostra (100 µl) foram diluídas em seriadamente (10^{-1} – 10^{-5}), e distribuídas em MRSB como descrito na seção 3.8, e incubadas por 24 a 48 h a 37 °C sob condições de anaerobiose. Todas as enzimas e sais biliares bovinos foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

Tabela 1. Etapas da simulação das condições gastrintestinais.

Etapas	Compartimento simulado	Condições	pH	Agitação (rpm)	Tempo de exposição (min)
1	Esôfago - Estômago	1.25 mL de solução de pepsina + 0.4 mL de 1 mM HCl	5,5	130	10
2		0.6 mL de 1 mM HCl	4,6		10
3		1.1 mL de 1 mM HCl	3,8		10
4		1 mL de 1 mM HCl	2,8		20
5		0.8 mL de 1 mM HCl	2,3		20
6		0.8 mL de 1 mM HCl	2,0		20
7	Duodeno	6.0 mL de solução intestinal + 11 mL de 0,1 mM $NaHCO_3$	5,0	45	30
8	Íleo	29 mL de 0,1 mM $NaHCO_3$	6,5	45	60

Fonte: Adaptado de Luciano et al. (2018).

3.11 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FISICO-QUÍMICOS

O nível de sinérese (gramas de soro por quilograma de queijo) e o rendimento (gramas de queijo por litro de leite) foram avaliados como descrito por Meira e col. (2015). Nos dias 1 ou zero, 7, 14 e 21 de armazenamento refrigerado (7 ± 0,5 ºC), as amostras de queijo (com ou sem OEOV e OERO em combinação) foram avaliadas para determinar a composição centesimal, Aa, pH, cor, textura instrumental, açúcares e conteúdo de ácidos orgânicos.

O teor de umidade (925.09), gordura (2000.18), proteína (939.02), cinzas (930.30), acidez (g/100 g de ácido lático) (920.124) e Aa (978.18) foram determinados de acordo com AOAC (2016). Os valores de pH foram mensurados usando um pHmetro digital.

Os ácidos orgânicos (ácidos acético, fórmico e lático) e açúcares (glicose, galactose e lactose) foram determinados nas amostras de queijo fresco. Uma alíquota de queijo (2 g) foi homogeneizada em 10 mL de água ultrapura durante 10 min usando um aparelho mini-Turrax. A mistura foi centrifugada (4000 rpm, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante foi recolhido e filtrado através de uma membrana de 0,45 mm.

O extrato obtido foi submetido a análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinar os ácidos orgânicos e os conteúdos de açúcares usando um Varian Waters 2690 (Califórnia, EUA) equipado com um sistema de solvente binário "válvula Rheodyne" com um loop de 20 μL, a uma temperatura de 65 °C, juntamente com um detector de matriz de diodos (Varian 330) em comprimentos de onda de 220 a 275 nm, um sistema de bombeamento com ajuste de gradiente de alta pressão (VARIAN 230) e software de processamento GALAXIE Chromatography Data System. As outras condições analíticas foram as seguintes: uma coluna Agilent Hi-Plex H (7,7 x 300 mm, 8 μ); fase móvel 0,009 N H_2SO_4; e taxa de fluxo, 0,7 mL/min. Os tempos de retenção dos picos correspondentes a cada amostra foram identificados em comparação aqueles dos padrões (Sigma Aldrich®) (ZEPPA et al., 2001).

A cor instrumental foi mensurada usando um colorímetro Konica Minolta (Modelo CR-400, Osaka, Japão). Para ler os parâmetros L* (luminosidade), a* (intensidade de vermelho/verde) e b* (intensidade de amarelo/azul), as seguintes condições foram fixadas: iluminante C, ângulo de visão 8°, ângulo de observação padrão 10°, especular incluído, de acordo com as especificações da Comissão Internationale de L'éclairage (CIE, 1996). Antes de executar as leituras, o instrumento foi calibrado colocando a cabeça do medidor verticalmente sobre o centro da placa de calibração branca (Iluminante C: Y = 92,84 X = 0,3136, y = 0,3201).

Os parâmetros de textura instrumental (dureza, elasticidade, adesividade, coesão, mastigabilidade e gomosidade) foram medidos usando um Texturômetro TA XT Plus (Extralab, Brasil). Uma compressão de duas mordidas de amostras cilíndricas (sonda cilíndrica acrílica de 25 mm de diâmetro (P25), taxa de deformação programada para uma velocidade de 1 mm/s e profundidade máxima de penetração de 10 mm) foi utilizada para medir parâmetros de textura instrumental (MEIRA et al., 2015).

3.12 CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL DE QUEIJO FRESCO COM OEOV E OERO DURANTE O ARMAZENAMENTO

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde/UFPB sob o número e protocolo 2.237.293/2017, segundo os critérios estabelecidos pela Norma Operacional nº 001/2013 – Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e Resolução 466/12 – A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

Antes de avaliar as características sensoriais, todas as amostras de queijo foram avaliadas para condições higiênico-sanitárias seguindo os padrões sanitários vigentes estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), que estabelece os limites de coliformes a 45 ºC ($5x10^3$ UFC/g) , *Staphylococcus* coagulase positiva (10^3 UFC/g), *Salmonella* spp. (ausente em 25 g) e *Listeria monocytogenes* (ausente em 25 g). As análises microbiológicas foram realizadas seguindo os métodos descritos pela American Public Health Association (APHA, 2015) e os dados obtidos demonstraram a qualidade sanitária satisfatória das amostras de queijos.

3.12.1 Análise descritiva quantitativa

As características sensoriais do queijo produzido com *Lactococcus* spp. foram estudadas utilizando análise descritiva quantitativa (ADQ). As análises foram realizadas nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento refrigerado com 9 panelistas selecionados com base em sua capacidade de distinguir as características sensoriais do queijo. Os panelistas foram treinados através de oito sessões de treinamento (cada sessão durando uma hora) para desenvolver sua terminologia descritiva e se familiarizar com os materiais de referência (Apêndices C e D). Esta etapa somente foi realizada após explicação minuciosa do seu desenvolvimento e mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice E). Os atributos avaliados incluíram a aparência (esbranquiçado e brilho), aroma (queijo, hortelã e canforoso), sabor (queijo, ácido, salgado e hortelã) e textura (macia e homogênea). Uma escala não estruturada variando de 0 (fraco) a 9 (forte), que ancorou os valores mínimo e máximo (Apêndice F), foi utilizada para avaliar a intensidade de cada atributo descrito (MEIRA et al., 2015). As amostras de queijo foram avaliadas em cabines individuais com temperatura e iluminação controladas e as amostras foram servidas à temperatura de refrigeração em pratos descartáveis codificados com três dígitos aleatórios e acompanhados de água mineral e bolacha de água e sal.

3.12.2 Teste de aceitação e intenção de compra

O teste de aceitação e intenção de compra dos queijos com e sem OVEO e ROEO foi executado nos dias zero, 7, 14 e 21 de armazenamento refrigerado (Apêndice G). Os ensaios foram realizados utilizando 100 panelistas não treinados, dos sexos feminino e masculino, com idades variando de 18 a 40 anos. A avaliação das amostras de queijo foi realizada em

cabines individuais com temperatura e iluminação controladas (luz natural, led 5500 K). Para o teste de aceitação os consumidores avaliaram cor, aparência, aroma, sabor, textura e impressão geral das amostras, utilizando uma escala hedônica de nove pontos (um "não gostou muito" para nove "gostou muito") (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007). O teste de intenção de compra foi avaliado usando uma escala hedônica de cinco pontos (um "certamente não compraria" a cinco "certamente compraria").

3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os ensaios foram realizados em triplicata com três experimentos independentes e os resultados foram expressos como uma média dos ensaios. Os resultados de CIM e CFI foram expressos como valores modais pois os valores das repetições foram os mesmos. A análise estatística foi realizada para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) usando ANOVA seguido do pós-teste Tukey ou T-Student usando o software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para integrar dados significativos. Os dados físico-químicos e sensoriais que diferiram entre amostras de queijos foram normalizados e submetidos à análise multivariada de PCA. Os coeficientes de correlação linear de Pearson (r) entre as quantidades de terpenos e contagens de *E. coli* O157: H7 foram calculados em correlações lineares bivariadas ($p <0,01$). O software de computador Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia) foi utilizado para a análise estatística dos dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O artigo apresentado no apêndice A (“A synergistic mixture of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils to preserve overall quality and control *Escherichia coli* O157:H7 in fresh cheese during storage”) avaliou os efeitos de OEOV e OERO em combinação nas contagens de *Lactococcus* spp. e *E. coli* O157:H7 em queijo durante 21 dias de armazenamento refrigerado, bem como, os terpenos predominantes do OEOV e OERO no queijo, os aspectos físico-químicos e sensoriais do queijo durante o armazenamento. A adição de OEOV (0,03 μL/g) e OERO (1,32 μL/g) não diminuiu as contagens de *Lactococcus* spp. enquanto causou uma diminuição de aproximadamente 3,0 log CFU/g nas contagens de *E. coli* O157:H7 nos primeiros 12 dias de armazenamento; e o terpenos de OEOV e/ou OERO apresentaram correlação com os decréscimos nas contagens de *E. coli* O157:H7. OEOV e OERO não afetaram os parâmetros físico-químicos e caracterizaram o queijo pelo aroma refrescante, sabor de “menta” e maciez.

O artigo apresentado no apêndice B (“Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Escherichia coli* O157:H7 in Minas frescal cheese made with oregano and rosemary essential oils”) avaliou os efeitos da incorporação de OEOV (0,07 μL/g) e OERO (2,65 μL/g) combinados em queijo Minas Frescal nas contagens do probiótico *L. acidophilus* LA-5 e *E. coli* O157:H7 durante o armazenamento refrigerado. Os terpenos do OEOV e OERO e a sobrevivência da cepa probiótica durante a digestão *in vitro* ao longo do armazenamento, os aspectos físico-químicos e sensoriais foram monitorados durante o armazenamento. Todos os terpenos diminuíram no queijo quando o tempo de armazenamento aumentou. A incorporação dos OEs retardou o crescimento de *L. acidophilus* LA-5 em queijo, mas não afetou sua capacidade de sobreviver no queijo sob condições gastrointestinais simuladas ao longo do tempo. As contagens de *E. coli* O157:H7 reduziram nos primeiros 15 dias de armazenamento do queijo probiótico e foram fortemente correlacionadas ($r \geq 0,82$) com os terpenos detectados ao longo do armazenamento. Os escores atribuídas ao aroma, sabor, impressão geral e intenção de compra do queijo com OEs aumentaram com o aumento do tempo de armazenamento.

Esta tese também resultou na elaboração de uma patente de invenção depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), com depósito sob o número BR102018075330-4_870180159621 (Anexo B).

REFERÊNCIAS

AIT-OUAZZOU, A.; CHERRAT, L.; ESPINA, L.; LORÁN, S.; ROTA, C.; PAGÁN, R. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 3, p. 320-329, 2011.

American Public Health Association (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 5th ed. American Public Health Association, Washington, DC. 2015.

AMIRI, S.; MOKARRAM, R. R.; KHIABANI, M. S.; BARI, M. R.; KHALEDABAD, M. A. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12: Optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 752–765, 2019.

ANAND, S. P.; SATI, N. Artificial Preservatives and Their Harmful Effects: Looking Toward Nature for Safer Alternatives. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research IJPSR**, v. 4, n. 7, p. 2496–2501, 2013.

AOAC. 2012. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist** (18th eds.). Washington. DC USA.

ASENSIO C. M., GROSSO N. R., JULIANI H. R. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential Oils. **Food Chemistry**. v. 60 p. 664-671. 2015.

ASBAHANI, A.E., MILADI, K., BADRI, W., SALA, M.A., AÏT ADDI, E.H., CASABIANCA, H., MOUSADIK, A.E., HARTMANN, D., JILALE, A., RENAUD, F.N.R., ELAISSARI, A. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmacology**, v. 483, p. 220-243. 2015.

AZERÊDO, G.A. et al. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541-1548, 2011.

BAJPAI, V. K., BAEK, K. H., & KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722–734. 2012.

BARBOSA, I.M., MEDEIROS, J.A.C., OLIVEIRA, K.A.R., GOMES-NETO, N.J., TAVARES, J.F., MAGNANI, M., SOUZA, E.L. Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli, Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. **Food Control**, v. 59, p. 468-477. 2016.

BARROS J. C., CONCEIÇÃO M. L., NETO N. J. G., COSTA A. C. V., SIQUEIRA-JÚNIOR J. P., BASÍLIO-JUNIOR I. D., SOUZA E. L., Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Food Science and Technology**, v. 42 p.1139–1143. 2009.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. (Ed.). **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3. ed. Amsterdam: Elsevier, v. 1, n. 1, p. 287-317. 2004.

BEZERRA, T. K. A.; ARAUJO, A. R. R.; NASCIMENTO, E. S.; PAZ, J. E. M.; GADELHA, C. A.; GADELHA, T. S.; PACHECO, M. T. B.; QUEIROGA, R. C. R. E.; OLIVEIRA, M. E. G.; MADRUGA, M. S. Proteolysis in goat "coalho" cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 196, p. 359–366, 2016.

BEZERRA, T.K.A.; ARCANJO, N.M.O.; ARAÚJO, A.R.R.; QUEIROZ, A.L.M.; OLIVEIRA, M.E.G.; GOMES, A.M.P.; MADRUGA, M.S. Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 209-215. 2017.

BOUHDID, S.; ABRINI, J.; AMENSOUR, M.; ZHIRI, A.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, A. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1139-1149, 2010.

BROOKS, J.C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROM, R.; HUTKINS, R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**, v. 31, p. 154–158. 2012.

BURNS, P.; CUFFIA, F.; MILESI, M.; VINDEROLA, G.; MEINARDI, C.; SABBAG, N.; HYNES, E. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 45–50, 2012.

BURITI, F. C. A.; OKAZAKI, T. Y.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in

comparison with the traditional products. **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, v. 57, n. 2, p. 179-185. 2007.

BURITI, F. C. A.; DA ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 12, p. 1279–1288, 2005.

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

CALO J. R., CRANDALL P. G., O'BRYAN C. A., RICKE S. C., Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**. v. 54 p. 111-119. 2015.

CASTRO, V., ESCUDERO, J.M., RODRIGUEZ, J.L., MUNIOZGUREN, N., URIBARRI, J., SAEZ, D., VAZQUEZ J., Listeriosis outbreak caused by Latin-style fresh cheese, Bizkaia, Spain. **Euro Surveillance,** v. 17 n. 42, p. 8–10. 2012.

CARVALHO R. J., SOUZA G. T., HONÓRIO V. G., SOUSA J. P., CONCEIÇÃO M. L., MAGANANI M., SOUZA E. L., Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, v. 52 p. 59-65. 2015.

CELIKTAS, O.Y.; HAMES KOCABAS, E.E.; BEDIR, E.; VARDAR SUKAN, F.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, p. 553-559. 2005.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) **Reports of selected *E. coli* outbreak investigation** (2016). https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html/ Accessed 2 January 2018.

CIE e Commission Internationale de l'Éclairage. (1996). **Colourimetry (2nd ed.).** Vienna: CIE Publication.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow 17 Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: 18 **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2012. P. 18-20.

CHOI, K., LEE, H., LEE, S., KIM, S., AND YOON, Y. Cheese microbial risk assessments -A Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, p. 307-314. 2016.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S., Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives – Review. **Medicines**, v. 4, n. 58, p. 1-21. 2017.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; 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.

COELHO M. C., SILVA C.C.G., RIBEIRO S.C., DAPKEVICIUS M.L.N.E., ROSA H.J.D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53-59. 2014.

COSTA, W. K. A.; SOUZA, G. T.; BRANDÃO, L. R.; LIMA, R. C.; GARCIA, E. F.; LIMA, M. S.; SOUZA, E. L.; SAARELA, M.; MAGNANI, M. Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. **Food Research International**, v. 108, p. 172–182, 2018.

CUFFIA, F.; GEORGE, G.; RENZULLI, P.; REINHEIMER, J.; MEINARD, C.; BURNS, P. Technological challenges in the production of a probiotic pasta filata soft cheese. **LWT- Food Science and Technology**, v. 81, p. 111–117, 2017.

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

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

DRUMOND, S. N.; SANTIAGO, A. F.; MOREIRA, M.; LANNA, M. C. S.; ROESER, H. M. P. Identificação molecular de *Escherichia coli* diarreiogênica na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó na região do Alto Rio Doce. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, n. 3, p. 579–590, 2018.

ESPINA, L.; GARCÍA-GONZALO, D.; LAGLAOUI, A.; MACKEY, B. M.; PAGÁN, R. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, 161, 23-30. 2013.

FAO/WHO, Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food In- cluding Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Joint FAO/WHO Expert Consultation, **Food and Agriculture Organisation of the United Nations**, Cordoba, Argentina, 2001.

FRATAMICO, P. M.; DEBROY, C.; LIU, Y.; NEEDLEMAN, D. S.; BARANZONI, G. M.; FENG, P. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–8, 2016.

FRIEDMAN, M., HENIKA, P. R., LEVIN, C. E., & MANDRELL, R. E. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* enterica in apple juice. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 6042-6048. 2004.

FDA – Food and Drug Administration. **Secondary direct food additives permitted in food for human consumption**. 2002. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov./>. Acesso em: 29 mar. 2016.

GEBARA, C.; RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GANDARA, A. L. N.; GIGANTE, M. L. Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 508–513, 2015.

GOVARIS, A., SOLOMAKOS, N., PEXARA, A., CHATZOPOULOU, P.S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 175–180, 2010.

GOVARIS A., BOTSOGLOU E., SERGELIDIS D., CHATZOPOULOU P. S., Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. **Food Science and Technology**, v. 44 p. 1240-1244, 2011.

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

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

HASSANIEN M. F. R. H., MAHGOUB S. A., EL-ZAHAR K. M. Soft cheese supplemented with black cumin oil Impact on food borne pathogens and quality during storage. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v 21. p. 280-288, 2014.

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

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

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

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U., Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **Food Microbiology**, v. 24 p. 343-362, 1995.

HONISH, L.; PREDY, G.; HISLOP, N.; CHUI, L.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; TROTTIER, L.; KREPLIN, C.; ZAZULAK, I. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized Gouda cheese. **Canadian Journal of Public Health**, v. 96, p. 182-184, 2005.

HONÓRIO, V. G., RODRIGUES, J. B. S., SOUZA, G. T., CARVALHO, R. J., GOMES-NETO, N. J., FIGUEIREDO, R. C. B. Q., MELO, J. V., SOUZA, E. L., AND MAGNANI, M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1,8-cineole. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-10, 2015.

HSIEH, P. C.; MAU, J. L.; HUANG, S. H. Antimicrobial effects of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 35-43, 2001.

JIANG, Y.; WU, N.; FU, Y.; WANG, W.; LUO, M.; ZHAO, C.; ZU, Y.; LIU, X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32 p. 63-68, 2011.

JIANG, Z.; KEMPINSKI, C.; CHAPPELL, J. Extraction and analysis of terpenes/terpenoids. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 1, p. 345–358, 2017.

JORDÁN, M. J.; LAX, V.; MARTÍNEZ, C.; AOUISSAT, M.; SOTOMAYOR, J. A. Chemical intraspecific variability and chemotypes determination of *Rosmarinus officinalis* L. in the region of Murcia. **Acta Horticulturae**, v. 925, p. 109-114. 2011

JORDÁN, M. J.; LAX, V.; ROTA, M. C.; LORÁN, S.; SOTOMAYOR, J. A. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. **Food Control**, v. 30, p. 463-468. 2013.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology** v. 2, p. 123–140, 2004.

KHORSHIDIAN, N.; YOUSEFI, M.; KHANNIRI, E.; MORTAZAVIAN, A.M., Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies,** v. 45, p. 62-72, 2018.

KRISHNA RAO, R.; SAMAK, G. Protection and restitution of gut barrier by Ppobiotics: nutritional and clinical implications. **Current Nutrition & Food Science**, v. 9, n. 2, p. 99–107, 2013.

LOVAYOVÁ, V.; DUDRIKOVÁ, E.; RIMÁROVÁ, K.; SIEGFRIED, L. Quantity of selected probiotic cultures in semi-hard cheese with low-cooking curd during the maturation process. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 4697–4702, 2015.

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

LU, Y.J.; JOERGER, R.; WU, C.Q. Similar reduction of *Salmonella enterica* Typhimurium on grape tomatoes and its cross-contamination in wash water by washing with natural antimicrobials as compared with chlorine treatment. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, p. 661-670, 2014.

LUCIANO, W. A.; MATTE, T. C.; PORTELA, I. A.; MEDEIROS, L. L.; LIMA, M. S.; MACIEL, J. F.; SOUZA, E. L.; GARCIA, E. F.; MAGNANI, M. Effects of *Lactobacillus acidophilu*s LA-3 on physicochemical and sensory parameters of açaí and mango based smoothies and its survival following simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 114, p. 159–168, 2018.

LV, F.; LIANG, H.; YUAN, Q.; LI, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v. 44, p. 3057-3064, 2011.

MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANSEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 213-222, 2003.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465–470, 2011.

MAHER, M.M.; JORDAN, K.N.; UPTON, M.E.; COFFEY, A. Growth and survival of E. coli O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 201-207, 2001.

MAKHAL S., KANAWJIA S. K., GIRI A., Effectiveness of thymol in extending keeping quality of cottage cheese. **Journal of Food Science Technology**, v. 51, n. 9, p. 2022–2029, 2014.

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

MAZZARRINO, G.; PAPARELLA, A.; CHAVES-LÓPEZ, C.; FABERI, A.; SERGI, M.; SIGISMONDI, C.; COMPAGNONE, D.; SERIO, A. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. **Food Control**, 50, p.794-803, 2015.

MOUSAVI, M.; HESHMATIA, A.; GARMAKHANY, A. D.; VAHIDINIA, A.; TAHERI, M. Optimization of the viability of *Lactobacillus acidophilus* and physico-chemical, textural and sensorial characteristics of flaxseed-enriched stirred probiotic yogurt by using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 102, n. 2019, p. 80–88, 2018.

MEIRA, Q.G.S.; MAGNANI, M.; MEDEIROS JÚNIOR, F.C.; QUEIROGA, R.C.R.E.; MADRUGA, M.S.; GULLÓN, B.; GOMES, A.M.P.; PINTADO, M.M.E.; SOUZA, E.L. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 76, p. 828-838, 2015.

MEDICI, M.; VINDEROLA, C. G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 7, p. 611–618, 2004.

MEHDIZADEH, T.; NARIMANI, R.; LANGROODI, A. M.; KIA, E. M.; NEYRIZ-

NAGHADEHI, M. Antimicrobial effects of *Zataria multiflora* essential oil and *Lactobacillus acidophilus* on *Escherichia coli* O157 stability in the Iranian probiotic white-brined cheese. **Journal of Food Safity,** p. 1–8, 2018.

MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; SINGH, V.; PARKASH, O.; YADAV, H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria**. Journal of Digestive Diseases**, v. 9, n. 4, p. 190-198, 2008.

NAPOLI, E. M. G.; CURCURUTO, G.; RUBERTO, G. Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 659-670. 2010.

OLIVEIRA, M. E. G.; GARCIA, E. F.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Technological , physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 370-379, 2012.

OLIVEIRA, M. E. G.; GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, C. E. V.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; MADUREIRA, A. R. M. F.; CONCEIÇÃO, M. L.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241–247, 2014.

OLIVEIRA, K.A.R.; SOUSA, J.P.; MEDEIROS, J.A.C.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; MAGNANI, M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, M. J. P.; SOUZA, E.L. Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. **Food Control**, v. 47, p. 334-339, 2015.

OLMEDO, R.H.; NEPOTE, V.; GROSSO, N.R. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. **Food Science and Technology**, v.53 p. 409-417, 2013.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 5, p. 446–456, 2006.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 1, p. 67–78, 2007.

OTERO V., BECERRIL R., SANTOS J. A., RODRÍGUEZ-CALLEJA J. M., NERÍN C., GARCÍA-LÓPEZ M. L., Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). **Food Control**, v. 42 p. 296-302, 2014.

PEDROSA, G. T.; CARVALHO, R. J.; BERDEJO, D.; SOUZA, E. L.; PAGÁN, R.; MAGNANI, M. Control of autochthonous spoilage lactic acid bacteria in apple and orange juices by sensorially accepted doses of *Citrus* Spp. essential oils combined with mild heat treatments. **Journal of Food Science**, In press, 2019.

PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; BILIA, A.R.; BARNABEI, M.; CALESINI, F.; ADDONA, R.; MENCARELLI, L.; CARMAGNINI, L.; DI MARTINO, M.C.; LO NOSTRO, A. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54 p.188-199, 2015.

PFEILER, E.A.; KLAENHAMMER, T.R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v.15, n. 12, p. 546-553, 2007.

PISANO, M.B.; FADDA, M.E.; MELIS, R.; CIUSA, M.L.; VIALE, S.; DEPLANO, M.; COSENTINO, S. Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. **Food Control**, v. 51 p. 1-8, 2015.

PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities e potentials and challenges. **Food Control**, v.47, p. 381-391, 2015.

QUERO, G.M.; SANTOVITO, E.; VISCONTI, A.; FUSCO, V., Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk and soft cheeses: culture-independent versus liquid and solid-based culture-dependent real time PCR approaches. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 11-20, 2014.

REGNAULT-ROGER, C., VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v.57, p. 405-424, 2012.

ROGGA, K.J.; SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; KATSIARI, M.C.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G., Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek

soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4 °C and 12 °C. **International Diary Journal**, v. 15 p.59-67, 2015.

ROLIM, F. R. L.; SANTOS, K. M. O.; BARCELOS, S. C.; EGITO, A. S.; RIBEIRO, T. S.; CONCEIÇÃO, M. L., MAGNANI, M.; OLIVEIRA, M. E. G.; QUEIROGA, R.C. R. E.Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 807–813, 2015.

SANT'ANA, A.M.S.; BEZERRIL, F.F.; MADRUGA, M.S.; BATISTA, A.S.M.; MAGNANI, M.; SOUZA, E.L.; QUEIROGA, R.C.R.E. Nutritional and sensory characteristics of minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 12, p. 7442–7453, 2013.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBANEZ, E.; SENORANS, F.J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 790-95, 2005.

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

SELLE, K. M.; KLAENHAMMER, T. R.; RUSSELL, W. M. **Lactobacillus: Lactobacillus acidophilus**. Second Edi : Elsevier, 2014. v. 2.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 591–610, 2005.

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

SOUSA, J.P.; OLIVEIRA, K.A.R.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; SOUZA, E. L. Influence of carvacrol and 1,8-cineole on cell viability, membrane integrity and morphology of *Aeromonas hydrophila* cultivated in a vegetable-based broth. **Journal of Food Protection**, v.78, p. 424-429, 2015.

SOUSA, J. P.; TORRES, R.A.; AZERÊDO, G.A.; SOUZA, E.L.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; VASCONCELOS, M.A.S. Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal

concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, p. 9-13, 2012.
SOUZA, E.L.; BARROS, J.C.; OLIVEIRA, C.E.V.; CONCEIÇÃO, M.L. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 308-311, 2010.

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, n. 5, p. 409-413, 2007.

SOUZA, G. T.; CARVALHO, R. J.; SOUSA, J. P.; TAVARES, J. F.; SCHAFFNER, D.; SOUZA, E. L.; MAGNANI, M. Effects of the Essential Oil from *Origanum vulgare* L. on Survival of Pathogenic Bacteria and Starter Lactic Acid Bacteria in Semihard Cheese Broth and Slurry. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 2, p. 246–252, 2016.

STRATAKOS, A. Ch; GRANT, I. R. Evaluation of the efficacy of multiple physical, biological and natural antimicrobial interventions for control of pathogenic *Escherichia coli* on beef. **Food Microbiology**, v. 76, p. 209–218, 2018.

TARR, P.I., GORDON, C.A., CHANDLER, W.L. Shiga toxin-producing Escherichia coli and hemolytic uremic syndrome. **Lancet,** v. 365, p. 1073–1086. 2005.

TAYEL, A. A.; HUSSEIN, H.; SOROUR, N. M., EL-TRAS, W. F. Foodborne Pathogens Prevention and Sensory Attributes Enhancement in Processed Cheese via Flavoring with Plant Extracts. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, 2015.

TODOROV, S. D.; FRANCO, B. G. M. *Lactobacillus plantarum:* Characterization of species and application in food production. **Food Reviews International**, v. 26, n. 3, p. 205-229, 2010.

TURCHI, B.; VAN TASSELL, M.L.; LEE, A.; NUVOLONI, R.; CERRI, D.; MILLER, M. J. Phenotypic and genetic diversity of wild *Lactococcus lactis* isolated from traditional Pecorino cheeses of Tuscany. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 3558-3563, 2013.

VILLARREAL, M. L. M.; PADILHA, M.; VIEIRA, A. D. S.; FRANCO, B. D. G. M.; MARTINEZ, R. C. R.; SAAD S. M. I. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in petit-suisse cheeses under in vitro gastrointestinal conditions by propidium monoazide - QPCR. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, p. 201-215, 2016.

ZEPPA, G.; CONTERNO, L.; GERBI, V. Determination of Organic Acids, Sugars, Diacetyl, and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2722-2726, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO I

A SYNERGISTIC MIXTURE OF *ORIGANUM VULGARE* L. AND *ROSMARINUS OFFICINALIS* L. ESSENTIAL OILS TO PRESERVE OVERALL QUALITY AND CONTROL *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 IN FRESH CHEESE DURING STORAGE

Artigo publicado no periódico **LWT - Food Science and Technology**
ISSN: 0023-6438, Qualis: A2 (ano base: 2016), Área: Nutrição, Fator de impacto: 3,129

LWT - Food Science and Technology 112 (2019) 107781

Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

A synergistic mixture of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils to preserve overall quality and control *Escherichia coli* O157:H7 in fresh cheese during storage

Helena Taina Diniz-Silva[a], Janaína Batista de Sousa[a], Jessica da Silva Guedes[a], Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga[b], Marta Suely Madruga[c], Josean Fechine Tavares[d], Evandro Leite de Souza[e], Marciane Magnani[a,*]

[a] Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil
[b] Laboratory of Bromatology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil
[c] Laboratory of Flavor, Department of Food Engineering, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil
[d] Nucleus for Characterization and Analysis, Department of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil
[e] Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Synergism
Essential oils
E. coli O157:H7
Lactococcus
Dairy products

ABSTRACT

The effects of *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO) essential oils in combination on the counts of a mesophilic starter co-culture and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese were determined during 21 days of refrigerated storage. Prevalent OVEO and ROEO terpenes, as well as the physicochemical and sensory aspects of cheese, were also determined. OVEO (0.03 μL/g) and ROEO (1.32 μL/g) did not decreased the counts of *Lactococcus* spp. while caused a decrease of approximately 3.0 log CFU/g in counts of *E. coli* O157:H7 in the earlier 12 days of storage. Terpenes of OVEO and/or ROEO decreased during storage in cheese and showed a correlation with decreases in *E. coli* O157:H7 counts. Eucalyptol, camphor, α-pinene and camphene were detected until 18 days of storage, and only eucalyptol, camphor and α-pinene were detected until 21 days of storage. OVEO and ROEO did not affect the physicochemical parameters and characterized the cheese by the refreshing aroma, mint-like flavor and softness. These results show the prevalent terpenes of OVEO and ROEO in fresh cheese during refrigerated storage and suggest their incorporation during manufacture as a strategy to preserve this product, with particular effects on the survival of *E. coli* O157: H7.

1. Introduction

Fresh cheeses are obtained from the enzymatic coagulation of milk with rennet and/or other coagulating enzymes, which can be complemented with specific lactic bacteria (Asensio, Grosso, & Juliani, 2015). *Lactococcus* species are the major lactic acid bacteria responsible for the acidification of milk during cheese production. The presence of *Lactococcus* spp. in cheeses is also associated with increased microbial stability during storage due to the production of antimicrobial substances (e.g., organic acids and bacteriocins) (Souza et al., 2016). The co-culture composed of *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* is largely used to improve the sensory properties (i.e., taste, flavor and texture) of fresh cheeses (Allam, Darwish, Ayad, Shokery, & Darwish, 2017).

Some characteristics of fresh cheeses, such as soft texture, low salt content, high acidity and moisture, favor the growth of spoilage microorganisms in these products, which may cause consumer rejection and economic losses for manufacturers (Carvalho et al., 2015). Additionally, fresh cheeses are considered potential vehicles for *Escherichia coli* O157:H7 (CDC, 2016), a pathogen able to survive and grow at refrigerate temperature (Ioanna et al., 2018; Khorshidian, Yousefi, Khanniri, & Mortazavian, 2018).

In addition to refrigeration storage temperatures, the use of synthetic preservatives, (e.g., potassium and sodium sorbate) ensure the safety of fresh cheeses (Anand & Sati, 2013). Concerns about the toxic effects of synthetic food preservatives and the increasing resistance of microorganisms to these compounds have increased the interest in the use of essential oils (EOs) to preserve cheeses (Khorshidian et al., 2018).

* Corresponding author. Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, Brazil.
E-mail address: magnani@gmail.com (M. Magnani).

https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.039
Received 24 July 2018; Received in revised form 12 December 2018; Accepted 23 January 2019
Available online 08 February 2019
0023-6438/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

EOs from *Origanum vulgare* L. (oregano – OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary – ROEO) are effective in inhibiting a range of cheese-related bacteria in *in vitro* systems (Asensio et al., 2015).

Generally, the required amounts of OVEO and ROEO to achieve the desired antimicrobial effects exceed the sensory threshold due to the strong taste and odor of these substances. One option to reduce the sensory impacts of OVEO and ROEO in food matrices without compromise their antimicrobial efficacy is the combined use of these substances at synergistic doses (Barbosa et al., 2016). A previous study exploiting the synergism of OVEO and ROEO reported their efficacy to inhibit *Staphylococcus aureus* in a cheese model during 72 h of refrigerated storage (Honório et al., 2015). Another study reported that OVEO alone is effective to control pathogenic bacteria in semi-hard cheeses but may have inhibitory effects on the *Lactococcus* starter co-culture (Souza et al., 2016). Despite the claims for OVEO and ROEO as preservatives in cheese, the physicochemical and sensory aspects that characterize fresh cheeses made with these EOs remain unknown. In addition, no previous studies have explored the antimicrobial effects of OVEO and ROEO or their prevalent terpenes during storage in cheese.

This study assessed the physicochemical and sensory aspects that characterized a fresh cheese made with the incorporation of a synergistic mixture of OVEO and ROEO and the prevalent terpenes of these EOs in the cheese during refrigerated storage. The effects of the OVEO and ROEO in combination on the viable counts (counts) of *Lactococcus* spp. and *E. coli* O157:H7 in fresh cheese during storage were also assessed.

2. Materials and methods

2.1. EOs

OVEO (batch 228; density 0.93; refractive index 1.51) and ROEO (batch 165; density 0.92; refractive index 1.46) extracted through steam distillation were purchased from Ferquima (São Paulo, Brazil). OVEO and ROEO emulsions were prepared in sterilized Brain Heart Infusion (BHI) broth (Himedia, India) at a range of concentrations (0.312–40 μL/mL) using Tween 80 (1%, v/v; Sigma–Aldrich, USA) as an emulsifier.

2.2. Microorganisms and growth conditions

The commercial freeze-dried starter co-culture composed of *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* (R-704, batch 3122631) was obtained from Christian Hansen (Valinhos, Minas Gerais, Brazil). A strain of *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7) isolated from food (Laboratory of Quantitative Food Microbiology Collection, State University of Campinas, Brazil) was used as the test pathogen. Stock cultures were maintained in cryovials at −80 °C. Each inoculum was obtained by preparing suspensions in sterile saline solution (NaCl 0.85%, wt/vol) from overnight cultures grown in BHI broth at 37 °C for 18 h. Cells were harvested by centrifugation (4,500 × *g*, 10 min, 4 °C), washed twice with sterile saline (NaCl, 0.85%) and re-suspended in sterile saline to obtain standard cell suspensions corresponding to 7 log CFU/mL (Souza et al., 2016).

2.3. Chemical composition of OVEO and ROEO

Individual constituents in OVEO and ROEO were identified using a gas chromatograph coupled with a mass spectrometer (GC-MS; QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japan) as previously described (Carvalho et al., 2015). The analytical conditions were: RTX-5MS capillary column (30 m by 0.25 mm by 0.25 μm), program temperature, 60–240 °C (3 °C/min); injector temperature, 250 °C; detector temperature, 220 °C; carrier gas, helium adjusted to 0.99 mL/min; ionizing energy, 70 eV; and mass range, 40–500 Da. The spectral bank of GC-MS, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database version 1.7 (National Institute of Standards Technology, Norwalk, CT) was used to identify the individual constituents in OVEO and ROEO. The results were expressed as unit area (area units, AU x 10^6) (Bezerra et al., 2017).

2.4. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and fractional inhibitory concentration index (FICI)

The MIC of OVEO and ROEO against the starter co-culture was determined using a broth microdilution test as described by Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), with minor modifications related to the cultivation media and inoculum size (CLSI, 2012). Ninety-six-well plates were prepared by dispensing 50 μL of the emulsion of each OVEO (40–0.312 μL/mL) and ROEO alone (85–0.66 μL/mL). Next, 50 μL of the starter co-culture suspension (final counts of approximately 6 log CFU/mL) was added to each well. The microplates were wrapped loosely with plastic film and incubated for 24 h at 37 °C. Each plate included controls without OVEO and ROEO. MIC was confirmed as the lowest concentration capable of inhibiting the visual growth of the tested starter co-culture (Carvalho et al., 2015).

The checkerboard method using macrodilution in broth was performed to determine the fractional inhibitory concentration index (FICI) for the combined application of OVEO and ROEO against the starter co-culture. Four milliliters of double strength BHI broth was inoculated with 1 mL of the bacterial inoculum (final counts of approximately 6 log CFU/mL), mixed with 5 mL of the OVEO and ROEO emulsions in different combinations and vigorously mixed for 30 s using a vortex. OVEO and ROEO were assayed at MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC, 1/16 MIC and 1/32 MIC (Barbosa et al., 2016). The systems were statically incubated for 24 h at 37 °C. The FICI was calculated using the following formula:

$$\frac{MIC\ of\ OVEO\ in\ combination}{MIC\ of\ compound\ OVEO\ alone} + \frac{MIC\ of\ ROEO\ in\ combination}{MIC\ of\ compound\ ROEO\ alone}$$

Synergistic interaction was defined as FICI ≤ 0.5; no interaction was defined as FICI > 0.5 to 4; and antagonistic interactions were defined as FICI > 4 (Iten, Saller, Abel, & Reichling, 2009).

2.5. Sampling and manufacture of fresh cheese

2.5.1. Sampling

A total of 40 fresh cheeses units of 100 g were elaborated with OEs and 40 cheeses without EOs were obtained in batch (three independent experiments were performed). All cheeses were elaborated in the Experimental Laboratory of Dairy Products (pilot scale) of the Federal University of Paraíba (João Pessoa, Paraíba, Brazil). Eight units of each cheese (with or without EOs) were used to evaluate the effects of the combined EOs on the counts of the starter co-culture, as well as to quantify the prevalent volatiles at the zero, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 days of refrigerated storage (one cheese unit was randomly selected for the analyses performed in each assessed time point). In parallel, eight units of each cheese were added of an *E. coli* O157:H7 suspension to provide a final population of approximately 5 log CFU/g, homogenized using a Stomacher and packaged separately for use in analysis performed at zero, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 days of storage. These cheese samples were referred as homogenized fresh cheese. Sixteen units of each batch were used in physicochemical analysis (a_w; syneresis, moisture, fat, proteins, acidity, pH, color, texture, determination of acids and sugars) (four units was randomly selected for use in analyses performed in each assessed time point). Finally, eight units of each cheese were used for sensory analyses (and for microbiological analyses to check the compliance to microbiological standard) at 1, 7, 14 and 21 days.

2.5.2. Cheese manufacture

To produce the fresh cheese, heat-treated (70 °C, 30 min) cow milk (20 L) maintained at 37 °C was inoculated with the tested starter co-culture suspension (0.01 g/L; approximately 7 log CFU/mL), followed

by the addition of calcium chloride (0.5 mL/L) and commercial rennet (0.8 mL/L; Ha-La®, Christian Hansen). Once the curd was formed, it was smoothly cut into 1–2 cm cubes using a stainless steel curd cutter (AISI 304), slowly stirred with a sterile glass rod for 5 min and mixed with an emulsion of OVEO and ROEO in combination that was prepared in drained cheese whey. OVEO and ROEO concentrations used to prepare this emulsion corresponded to the lowest combined concentrations that presented FICI corresponding to synergism interaction. The amounts of OVEO and ROEO incorporated in the curd were calculated considering the yield of the cheese batch determined in preliminary assays. The obtained curd was placed in perforated containers (10 cm diameter) for whey removal for 1 h at 7 °C (Kondrotienė et al., 2018). The cheese obtained was vacuum packaged in sterile polyethylene bags (0.12 mm tick) (Evert-Arriagada, Hernández-Herrero, Juan, Guamis, & Trujillo, 2012) and stored for 21 days at refrigerated storage (7 ± 0.5 °C). The manufacture of cheese without OVEO and ROEO was performed similarly.

2.6. Determination of OVEO and ROEO terpenes in cheese

The terpenes identified in the highest amounts in each OVEO (i.e., thymol, carvacrol, ρ-cymene, α-terpinene, linalool and γ-terpinene) and ROEO (i.e., eucalyptol, camphor, α-pinene, caryophyllene and borneol) were monitored in fresh cheese each 3 days during 21 days of refrigerated storage. The initial concentration of each monitored prevalent terpene in OVEO or ROEO in cheese was defined as that measured in cheese samples collected on day zero. The extracts were obtained following procedures described by Jiang, Kempinski, and Chappell (2016) with modifications. Cheese samples (1 g) were homogenized with 5 mL hexane by stirring with a magnetic stirrer for 10 min at room temperature. The mixture was centrifuged (4000 × *g* 15 min, 4 °C) and the supernatant was collected and analyzed by GC-MS using the same procedures described in section 2.3.

2.7. Effects of OVEO and ROEO on the counts of Lactococcus spp. and E. coli O157:H7

To assess the effects of the OVEO and ROEO added in cheese on *Lactococcus* spp. counts at the same storage time points of the quantification of OVEO and ROEO terpenes (i.e., zero, 3, 6, 9, 15, 18 and 21 days), cheese samples (25 g) were mixed with sterile saline solution (1:10 w/v), homogenized using a stomacher and serially diluted (10^{-1}–10^{-5}) in sterile saline. Subsequently, 10 μL aliquots of each dilution were dispensed onto M17 agar (Himedia, India) for enumeration of *Lactococcus* spp. using a microdrop technique (Herigstad, Hamilton, & Heersink, 2001). Cheeses manufactured without OVEO and ROEO were similarly assayed. The plates were incubated at 37 °C for 24 h.

To assess the effects of the OVEO and ROEO added in cheese on *E. coli* O157:H7 counts, on days zero, 3, 6, 9, 15, 18 and 21 days of refrigerated storage, 9 g of the homogenized fresh cheese (experimentally contaminated as described in section 2.5.1) were added of sterile saline (1:10 w/v). The mixture was homogenized using a stomacher and serially diluted (10^{-1}–10^{-5}) in the same diluent (da Costa et al., 2018). Subsequently, 10 μL aliquots of each dilution were dispensed onto M17 agar base to count *Lactococcus* spp. or MacConkey Sorbitol Agar to count *E. coli* O157:H7 (Herigstad et al., 2001). Homogenized fresh cheeses without OVEO and ROEO experimentally contaminated with *E. coli* O157:H7 were similarly assayed. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. The results are expressed as log CFU/g and the detection limit was 2 log CFU/g.

2.8. Physicochemical parameters of cheese

The yield of each cheese batch was expressed as the fresh weight of the cheese obtained from each liter of milk used for production (g of cheese/L of milk) (Meira et al., 2015). The physicochemical parameters of cheeses were evaluated on days 1, 7, 14 and 21 of refrigerated storage. These storage time points to evaluate physicochemical parameters were defined considering the operability of the laboratorial analysis and because data of preliminary physicochemical analyses in shorter storage time points (less than 7 days) did not show any significant differences. The level of syneresis (grams of whey per kilogram of cheese) was calculated as the weight of whey in grams released from each kilogram of cheese in the package after different storage time periods divided by the weight of the cheese in the same package in grams and multiplied by 100 (Meira et al., 2015).

Moisture (925.09), fat (2000.18), protein (939.02), and ash

Table 1
Constituents identified by CG-MS in the essential oil from *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO).

No.	Constituents	RT[a]	Area (AU x 10^6) [b]	
			ROEO	OVEO
1	α-thujene	5.70		12
2	α-pinene	6.01	311	59
3	Camphene	6.45	150	6
4	β-pinene	7.14		12
5	Myrcene	7.57	67	49
6	Pseudo limonene	7.98		1
7	β-Phellandrene	8.03	7	
8	Δ-3-Carene	8.24	3	
9	α-terpinene	8.43		20
10	ρ-cymene	8.72	5	330
11	Eucalyptol	9.16	845	–
12	γ-terpinene	10.06	17	242
13	cis-β-Terpineol	10.35	1	
14	Terpinolene	11.16	6	
15	Linalool	11.82	56	101
16	Camphor	13.97	650	
17	Isoborneol	14.21	21	
18	Borneol	14.66	96	1
19	Terpinen-4-ol	15.01	13	
20	α-terpineol	15.68	62	
21	γ-terpineol	15.89	10	
22	Verbenone	16.38	2	
23	Thymol methyl ether	17.80		4
24	Isobornyl acetate	19.83	48	
25	Carvacrol	20.22		255
26	Thymol	21.28		874
27	Phenol	21.48		302
28	Eugenol	22.92	5	
29	α-Copaene	23.69	3	
30	Caryophyllene	25.80	174	22
31	α-Humulene	27.07	7	
32	Naphthalene	28.43	1	
33	γ-Cadinene	29.58	1	
34	Δ-Cadinene	29.96	2	
35	Caryophyllene oxide	32.52		20

[a] Retention time.
[b] Constituents identified in each essential oil are expressed as the AU, area units.

Table 2
Results of the checkerboard assay for combined concentrations of *Origanum vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. essential oil (ROEO).

OVEO/ROEO	OVEO μg/mL	ROEO μg/mL	FICI[a]	Interaction
-/MIC	0	21.2	1	–
MIC/2 + MIC/16	0.3	1.32	0.56	Additive
MIC/4 + MIC/16	0.15	1.32	0.31	Synergism
MIC/8 + MIC/16	0.07	1.32	0.17	Synergism
MIC/16 + MIC/16	0.03	1.32	0.11	Synergism
MIC/16 + MIC/8	0.03	2.6	0.15	Synergism
MIC/16 + MIC/4	0.03	5.3	0.28	Synergism
MIC/16 + MIC/2	0.03	10.6	0.53	Synergism
MIC/-	0.6	0	1	–

[a] FICI: Fractional Inhibitory Concentration Index.

Table 3
Terpenes of *Origanum vulgare* L. (0.03 μL/g) and *Rosmarinus officinalis* L. (1.32 μL/g) detected in fresh cheese during refrigerate storage.

Terpenes*	Days of storage								p**
	0	3	6	9	12	15	18	21	
α-pinene	126^a	42^b	13^b	9.2^b	8.1^b	6.1^b	6.0^b	2.3^b	0.004
Camphene	38^a	8.4^b	3.6^b	2.7^b	2.5^b	2.5^b	2.2^b	ND^c	0.013
β-pinene	78^a	24^b	9.0^b	5.5^b	4.0^b	4.0^b	3.2^b	2.2^b	0.003
Eucalyptol	436^a	139^b	82^c	55^c	53^c	40^c	36^c	15^c	0.005
Camphor	139^a	50^b	30^b	22^b	20^b	16^b	13^b	7.2^b	0.003
p-cymene	13^a	4.5^a	1.9^b	1.4^b	1.3^b	ND	ND	ND	< 0.001
Borneol	14^a	5.8^b	3.1^b	2.0^b	1.6^b	ND	ND	ND	0.010
Caryophyllene	25^a	12^a	4.4^a	3.7^a	2.6^a	ND	ND	ND	0.033
Myrcene	12^a	4.7^b	1.7^b	ND	ND	ND	ND	ND	< 0.001
Linalool	9.5^a	4.2^a	2.3^b	ND	ND	ND	ND	ND	0.043
Isoborneol	3.1^a	2.4^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< 0.001
α-terpineol	9.9^a	5.6^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.08
Thymol	9.9^a	4.6^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.010
γ-terpinene	59	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NS^b
Carvacrol	62	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NS

* Terpenes identified in each essential oil are expressed as the area units (AU x 10^4).
**probability by ANOVA of a difference among means.
[b]NS: no significant difference between means ($p > 0.05$).
[c]ND: not detected.

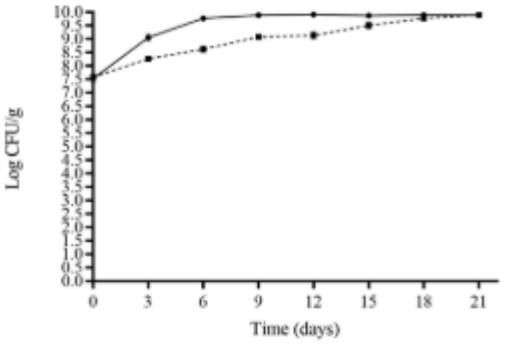

Fig. 1. Cell counts of *Lactococcus* spp. in fresh cheese stored at 7 ± 0.5 °C as function of OVEO-ROEO combined: (●) control: 0 μL/g; (■): 0.03 μl/g + 1.32 μl/g (OVEO and ROEO, respectively).

(930.30) contents in g/100 g, as well as acidity (g/100 g of lactic acid) (920.124) and a_w (978.18) were determined according to AOAC (2016). The pH values was measured using a digital potentiometer (Quimis 021/15) and color parameters L*, a* and b* were measured according the CIE Lab colour scale (L *, a * and b *) with a D65 illuminate (standard daylight) at a 10° angle (CIE, 1996). Parameters were read using a Konica Minolta colorimeter (Model CR-400). The apparatus was calibrated using reference plates, in the reflectance mode, and the specular reflection was excluded. A 10-mm quartz cuvette was used for analysing the inner section of the cheeses immediately after unpacking.

For the instrumental texture profile analysis, at least 0.5 cm of the rind was discarded, and the cheese samples were carefully collected along a line passing from the center to the exterior. Instrumental texture parameters were measured using a TA-XT2 (Stable Micro Systems, UK) Plus Texturometer. A two-bite compression test was applied to the cheese samples by a cylindrical acrylic probe with a 25-mm diameter (P25). The compression ratio was programmed to a speed of 1 mm/s and maximum penetration depth of 10 mm. All the determinations were repeated eight times for each cheese (Meira et al., 2015).

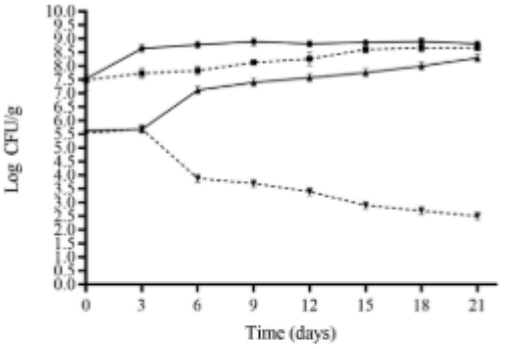

Fig. 2. Viable cell counts of *Lactococcus* spp and *E. coli* O157:H7 in homogenized fresh cheese stored at 7 ± 0.5 °C as function of OVEO-ROEO combined: *Lactococcus* spp. (●): 0 μL/g; (■): 0.03 μl/g + 1.32 μl/g (OVEO and ROEO, respectively); *E. coli* O157:H7 (▲): 0 μL/g; (▼): 0.03 μl/g + 1.32 μl/g (OVEO and ROEO, respectively). The error bars in the figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments.

To determine the organic acids and sugars contents, a 2g-aliquot was homogenized in 10 mL of ultrapure water for 10 min using a mini-Turrax apparatus. The mixture was centrifuged (4000 × g, 15 min, 4 °C) and the collected supernatant was filtered through a 0.45-mm membrane. The obtained extract was subjected to High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis to determine organic acids and sugars contents using a Varian Waters 2690 (California, USA) equipped with a binary solvent system "valve Rheodyne" with a 20-μL loop, at a temperature of 65 °C, coupled with a diode array detector (Varian 330) at wavelengths of 220–275 nm, a pumping system with high pressure gradient setting (VARIAN 230) and processing software GALAXIE Chromatography Data System. The other analytical conditions were as follows: an Agilent Hi-Plex H column (7.7 × 300 mm, 8 μ), mobile phase 0.009 H_2SO_4 and flow rate 0.7 mL/min. HPLC sample peaks were identified by comparing their retention times with those of organic acids and sugars standards (Sigma Aldrich®) (Zeppa, Coterno & Gerbi, 2001).

2.9. Sensory characterization during storage

The sensory characteristics of the cheeses with and without OVEO and ROEO, but not inoculated with the test *E. coli* O157:H7 strain, were studied using quantitative descriptive analysis (QDA) after approval by an Ethics Research Committee (protocol 2.237.293/2017). Prior to assessing the sensory characteristics, the cheese samples were evaluated using methods described elsewhere (APHA, 2001) for compliance to microbiological standards according to the Brazilian Legislation (Technical Regulation on the Microbiological Standards for Food, 2002). The analyses were performed on days 1, 7, 14 and 21 of refrigerated storage with nine panelists trained through eight training sessions. The attributes evaluated included the appearance (whitish and brightness), aroma (cheese, mint-like and refreshing), flavor (cheese, acid, salty and mint-like) and texture (soft and homogenous). An unstructured scale ranging from 0 (poor) to 9 (strong), which anchored the minimal and maximal values, was used to assess the intensity of each described attribute (Sant'Ana et al., 2013). Analyses were performed in individual booths with controlled temperature and lighting. Each panellist was served of approximately 20 g of each cheese sample placed on small white plates coded with three-digit random numbers served immediately after being taken out of refrigerated storage. Panellists were asked to eat low-salt crackers and drink water to clean

Table 4
Physicochemical parameters, sugar and organic acids (n:3, mean values ± standard deviation) of fresh cheese with *Origanum vulgare* L. (OVEO; 0.03 μL/g) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO; 1.32 μL/g) during refrigerate storage.

Parameters	Days of storage	Cheeses	
		CT*	CO**
Yield (g/100g)	1	5,36 (± 0.30)^{A}	5,30 (± 0.20)^{A}
a_w	1	0.99 (± 0.01)^{aA}	0.99 (± 0.01)^{aA}
	7	0.99 (± 0.01)^{aA}	0.99 (± 0.00)^{aA}
	14	0.98 (± 0.00)^{aA}	0.98 (± 0.01)^{aA}
	21	0.98 (± 0.00)^{aA}	0.98 (± 0.00)^{aA}
Syneresis (g/Kg)	1	8.60 (± 0.60)^{dB}	18.48 (± 0.59)^{cA}
	7	14.92 (± 0.97)^{cB}	21.10 (± 0.82)^{bcA}
	14	24.39 (± 1.18)^{bA}	24.61(± 3.11)^{abA}
	21	32.21 (± 1.79)^{aA}	29.53(± 1.91)^{aA}
*Moisture (g/100 g)	1	68.46 (± 0.43)^{abA}	68.39 (± 0.86)^{abA}
	7	67.25 (± 0.24)^{abcA}	66.17 (± 1.04)^{cA}
	14	65.02 (± 0.63)^{abA}	66.09 (± 1.48)^{bA}
	21	61.01 (± 0.09)^{dB}	64.01 (± 0.03)^{bcA}
Ashes (g/100 g)	1	2.62 (± 0.61)^{abA}	2.23 (± 0.13)^{aA}
	7	2.72 (± 0.10)^{abA}	2.61 (± 0.06)^{aA}
	14	2.73 (± 0.03)^{aA}	2.67 (± 0.08)^{abA}
	21	2.82 (± 0.40)^{aA}	2.74 (± 0.33)^{abA}
Total protein (g/100 g)	1	13.23 (± 0.17)^{cA}	13.21 (± 0.15)^{cA}
	7	14.95 (± 0.10)^{bA}	14.19 (± 0.81)^{bA}
	14	16.06 (± 0.06)^{aA}	15.75 (± 0.19)^{aA}
	21	16.95 (± 0.12)^{bcA}	16.76 (± 0.05)^{abA}
Fat (g/100 g)	1	17.57 (± 0.14)^{cB}	18.82 (± 0.11)^{aA}
	7	18.76 (± 0.03)^{bA}	18.87 (± 0.01)^{aA}
	14	19.15 (± 0.04)^{bA}	19.78 (± 0.03)^{aA}
	21	19.86 (± 0.04)^{aA}	20.24 (± 0.17)^{aA}
*pH	1	6.50 (± 0.01)^{aA}	6.08 (± 0.03)^{aA}
	7	5.91 (± 0.02)^{bA}	5.51 (± 0.03)^{cA}
	14	5.14 (± 0.05)^{bcA}	5.09 (± 0.05)^{bcdA}
	21	5.08 (± 0.03)^{cdA}	5.02 (± 0.13)^{dA}
*Titratable acidity (g/100 g)	1	0.27 (± 0.04)^{bA}	0.30 (± 0.02)^{aA}
	7	0.70 (± 0.01)^{cA}	0.88 (± 0.02)^{dA}
	14	1.32 (± 0.02)^{aA}	1.37 (± 0.03)^{bA}
	21	1.37 (± 0.02)^{aA}	1.29 (± 0.01)^{aA}
Sugars (g/100 g)			
Lactose	1	2.79 (± 0.01)^{aA}	2.97 (± 0.03)^{aA}
	7	1.53 (± 0.02)^{bA}	1.63 (± 0.07)^{bA}
	14	1.42 (± 0.03)^{bA}	1.53 (± 0.12)^{bA}
	21	1.35 (± 0.14)^{bB}	1.56 (± 0.02)^{bA}
Galactose	1	0.00 (± 0.00)^{bA}	0.00 (± 0.00)^{cA}
	7	0.78 (± 0.01)^{aA}	0.74 (± 0.05)^{bA}
	14	0.93 (± 0.02)^{aA}	0.76 (± 0.04)^{bA}
	21	1.45 (± 0.17)^{aA}	1.24 (± 0.11)^{aB}
Glucose	1	0.06 (± 0.01)^{cA}	0.08 (± 0.01)^{bA}
	7	0.14 (± 0.02)^{bA}	0.11 (± 0.01)^{abcA}
	14	0.66 (± 0.02)^{aA}	0.65 (± 0.02)^{aA}
	21	0.95 (± 0.00)^{aA}	0.70 (± 0.01)^{abB}
Organic acids (g/100 g)			
Lactic	1	0.10 (± 0.01)^{bA}	0.11 (± 0.01)^{cA}
	7	0.15 (± 0.00)^{bA}	0.12 (± 0.01)^{bA}
	14	0.28 (± 0.02)^{bA}	0.25 (± 0.02)^{bA}
	21	1.50 (± 0.18)^{aA}	1.26 (± 0.03)^{aA}
Formic	1	0.02 (± 0.01)^{cA}	0.02 (± 0.01)^{cA}
	7	0.08 (± 0.01)^{bA}	0.09 (± 0.01)^{bA}
	14	0.11 (± 0.01)^{bA}	0.10 (± 0.01)^{bA}
	21	0.22 (± 0.01)^{aA}	0.19 (± 0.01)^{aA}
Acetic	1	0.03 (± 0.02)^{cA}	0.02 (± 0.02)^{cA}
	7	0.13 (± 0.02)^{bA}	0.15 (± 0.03)^{bA}
	14	0.26 (± 0.01)^{bA}	0.24 (± 0.02)^{bA}
	21	0.65 (± 0.02)^{aA}	0.63 (± 0.02)^{aA}

*CT: fresh cheese without OVEO and ROEO combined.
**CO: fresh cheese with OVEO and ROEO combined.
A – B: different superscript capital letters in the same row denote differences ($p \leq 0.05$) between different treatments, obtained by t-student test.
a – e: different superscript lowercase letters in the same column denote differences ($p \leq 0.05$) in the same treatment during storage, obtained by Tukey test.

their palates between the assessed samples.

2.10. Statistical analysis

Analyses were performed in triplicate in three independent experiments. MIC and FICI results are expressed as modal values because the values were the same in all repetitions. Statistical analysis was performed to determine significant differences ($p < 0.05$) using ANOVA followed by the post-hoc Tukey test. Pearson's linear correlation coefficients (r) between the amounts of terpenes and counts of *E. coli* O157:H7 were calculated in bivariate linear correlations. Principal Component Analysis (PCA) was performed to integrate significant data of the physicochemical and sensory parameters. Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, California) was used for the statistical analyses.

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition, MIC and FICI of OVEO and ROEO

A total of 17 and 26 constituents were identified in OVEO and ROEO, respectively (Table 1). Thymol, ρ-cymene, carvacrol and γ-terpinene were the prevalent terpenes in OVEO and eucalyptol, camphor, α-pinene, caryophyllene and camphene were prevalent in ROEO. Similar results were reported in previous studies (Barbosa et al., 2016; Souza et al., 2016).

The MIC of OVEO and ROEO against the starter co-culture was 0.6 and 21.2 μL/mL, respectively. The difference between the MIC values of OVEO and ROEO has been commonly associated with their prevalent constituents. Thymol, the prevalent constituent in OVEO, is a phenolic terpenoid with stronger antimicrobial activity than the ether terpenoid eucalyptol, which is the prevalent constituent in ROEO (Barbosa et al., 2016).

The results of the FICI assays showed synergistic interaction for all combined concentrations of OVEO and ROEO, with the exception of the mixture containing MIC/2 of OVEO and MIC/16 of ROEO, which showed an additive interaction (Table 2). The observed synergism between OVEO and ROEO is probably the result of an initial disturbance in the bacterial membrane structures due to the high hydrophobicity of constituents (e.g., eucalyptol, camphor and α-pinene) that helps others constituents (e.g., thymol, ρ-cymene and carvacrol) to cross the bacterial membranes and act directly into the cells. These effects may cause loss of ions and reduction of the membrane potential, loss of the proton

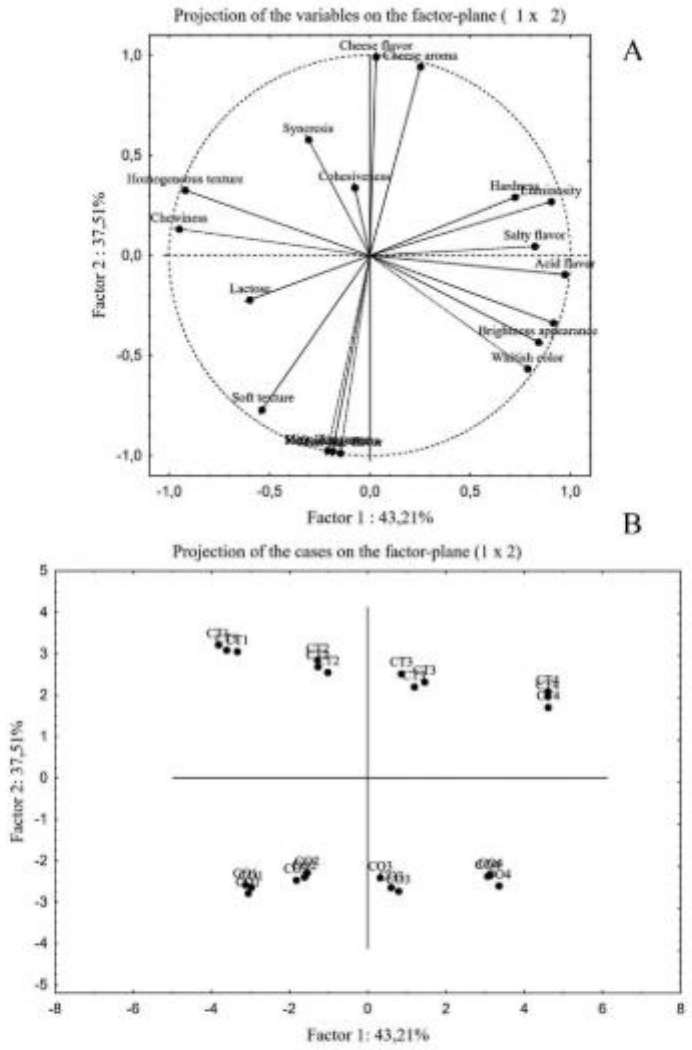

Fig. 3. (A) Principal Component Analysis (PCA) graph of physicochemical and sensory aspects of fresh cheese without and with OVEO and ROEO combined; (B) distribution of fresh cheese samples according to the PCA. CT: fresh cheese without OVEO and ROEO combined; CO: fresh cheese with OVEO and ROEO combined.

pumps function and ATP depletion (Di Pasqua, Hoskins, Betts, & Mauriello, 2006; Honório et al., 2015; Santiesteban-López, Palou, & López-Malo, 2007). Then, lower amounts of each OVEO and ROEO should be required to exert the same inhibitory effects of those exerted by amounts equivalent to the MIC of each of these EOs acting alone. Based on these results, the synergistic mixture of MIC/16 of OVEO (0.03 μL/mL) and MIC/16 of ROEO (1.32 μL/mL) were selected for incorporation in fresh cheese.

3.2. Prevalent OVEO and ROEO terpenes and effects on the counts of *Lactococcus spp.* and *E. coli O157:H7*

A total of 15 terpenes found in OVEO and/or ROEO were detected in cheese made with these EOs immediately after manufacture (day zero), and none of these compounds were identified in cheese without EOs (Table 3). The contents of all terpenes decreased during storage. Prevalent terpenes in cheese with OVEO and ROE during the 21 days of refrigerated storage were eucalyptol, camphor and α-pinene. Compared to these terpenes, camphene and β-pinene were present in cheese with EOs in lower concentrations over the measured storage period; ρ-cymene, borneol and caryophyllene were detected until 12 days of

storage, and myrcene and linalool were detected until 6 days of storage. Isoborneol, α-terpineol and thymol were detected only up to 3 days of storage, and γ-terpinene and carvacrol were detected only immediately after manufacture (day zero) (Table 3). The non-detection of γ-terpinene and carvacrol after 3 days of storage could be related to the specific characteristics of volatility and solubility of these terpenes, as well as their ability to react with the distinct components (e.g., proteins and fat) present in the cheese matrix. Furthermore, the packaging conditions may have affected the volatilization of terpenes because the increase in the water content inside the package (resulting from the syneresis, which was higher up to 7 days of storage in cheese with EOs) might affect the permeability of the package, increasing the loss of the terpenes by volatilization. Hydrophobic polymers (such as, the polyethylene material used to pack the cheeses used in this study) exhibit a strong reduction of their barrier properties as a consequence of the accumulation of liquids in the package (Siracusa, 2012).

In cheese without EOs, the initial counts of *Lactococcus* spp. showed an increase ($p < 0.05$) of 1.5 log CFU/g and 2 log CFU/g after 3 and 6 days of storage, respectively (Fig. 1). No changes were observed in counts of *Lactococcus* spp. in cheese without EOs in the further storage time points assessed. In fresh cheese with OVEO and ROEO, initial counts of *Lactococcus* spp. increased ($p < 0.05$) by 1.5 log CFU/g after 9 days of storage (Fig. 1). Only after 15 days of storage, counts of *Lactococcus* spp. increased ($p < 0.05$) by 2 log CFU/g in cheese with OVEO and ROEO.

The delay of *Lactococcus* spp. growth in cheese with EOs was mainly observed when most of the prevalent OVEO and ROEO terpenes were detected in fresh cheese. Terpenoids, such as thymol, carvacrol and eucalyptol, even at sub-inhibitory concentrations may affect the growth rate in a variety of bacteria (Pei, Zhou, Ji, & Xu, 2009). In addition, synergism interaction is not established only by the major constituents present in EOs tested in combination. Constituents present in smaller amounts in these EOs may also play a critical role for achieving these antimicrobial effects, and, consequently, contribute to modulate the antimicrobial efficacy of the major constituents present in these substances (Hossain et al., 2016). Most likely, after 9 days of storage, the amounts of terpenes (e.g., eucalyptol, camphor and α-pinene) in cheese were not sufficient to cause growth inhibition of the *Lactococcus* spp. population. However, the application of EOS in cheese made with *Lactococcus* starter cultures should be carefully considered because the growth delay of these bacteria could negatively affect the sensory and textural characteristics of the final product (Fernández, Alegría, Delgado, Martín, & Mayo, 2011).

In the homogenized fresh cheese without EOs, the initial counts of *E. coli* O157:H7 increased approximately 1.5 log CFU/g after 6 days of storage and an increase of approximately 2.8 log CFU/g was observed after 21 days of storage. In homogenized fresh cheese with OVEO and ROEO, the counts of *E. coli* O157:H7 decreased approximately 1.5 log CFU/g after 6 days of storage. A decrease of 3 log CFU/g in counts of *E. coli* O157:H7 was observed after 15 days of storage and no changes were observed in the further storage time points evaluated (Fig. 2). Considering that the combined OVEO and ROEO amounts incorporated in fresh cheese were based on the data of FICI assays against the starter co-culture and that after the drainage of the whey probably the concentrations were even lower, these results are noteworthy because the inhibition of pathogens overall requires concentrations higher than those effective in inhibiting *Lactococcus* starter cultures (Carvalho et al., 2015; Souza et al., 2016).

According to the Pearson's correlation analysis, the amounts of α-pinene ($r = 0.76$), β-pinene ($r = 0.75$), eucalyptol ($r = 0.73$), camphor ($r = 0.75$) and camphene ($r = 0.68$) detected in cheese with ROEO and OVEO up to 15 days of storage, as well as the amounts of ρ-cymene ($r = 0.74$), borneol ($r = 0.78$) and caryophyllene ($r = 0.83$) detected up to 12 days of storage presented a positive correlation with decreases in counts of *E. coli* O157:H7. The amounts of myrcene ($r = 0.64$) and linalool ($r = 0.62$) detected up to 6 days of storage also presented a positive correlation with the decreases in counts of *E. coli* O157:H7. In addition, the amounts of isoborneol, α – terpineol and thymol ($r = -1$) detected up to 3 days of storage presented a negative correlation with the counts of *E. coli* O157:H7. The amounts of carvacrol and γ-terpinene detected only after 24 h of manufacture presented no correlation with the counts of *E. coli* O157: H7 (Supplementary Table 1).

Nevertheless, despite the correlation observed between counts of *E. coli* O157:H7 and amounts of α-pinene and β-pinene in cheese, these terpene hydrocarbons present weaker antimicrobial activity compared to phenolic terpenes (e.g., thymol), which were detected only in the beginning of the storage period (Hyldgaard, Mygind, & Meyer, 2012). However, the fact that some terpenes were not detected in cheese may be due to their interaction with cheese matrix components. Phenols, alcohols, ketones and ethers may interact through hydrogen bonds with hydroxyl groups and receptor groups of proteins (e.g., NH and CO) in cheese (Moro, Librán, Berruga, Carmona, & Zalacain, 2015).

Curiously, counts of *Lactococcus* spp. over time were approximately 1 log CFU/g lower ($p < 0.05$) in homogenized fresh cheese contaminated with *E. coli* O157:H7 (Fig. 2) compared to those found in fresh cheese (Fig. 1.) regardless the addition of OVEO and ROEO. These results could be related to changes in the metabolism of *Lactococcus* spp. to survive in the same environment with *E. coli* O157:H7, such as the activation of specific metabolic routes to produce substances that exert inhibitory effects on this pathogen. Overall, antimicrobial substances (e.g., nisin and enterocins) produced by *Lactococcus* spp. could have acted synergistically with terpenes, such as eucalyptol and camphor (Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2008; Rodríguez et al., 2005), participating in the inhibition on *E. coli* O157:H7 observed in cheeses.

3.3. Physicochemical parameters and sensory characterization of cheese

The yield of cheese with and without OVEO and ROEO was around 20%. The similar yield of cheese with and without OVEO and ROEO could be explained by the fact that these EOs were incorporated after the curd formation, i.e., when the coagulation of milk proteins had already been reached (Sant'Ana et al., 2013). The a_w values was also similar for cheese with and without OVEO and ROEO during the storage (Table 4). No differences between cheese with and without OVEO and ROEO were observed for protein content, pH, acidity or ash content during storage (Table 4). Syneresis and lipid content were higher in fresh cheese with EOs than in cheese without EOs at the beginning of the storage, while moisture was higher in fresh cheese with EOs only at 21 days of storage (Table 4). During the storage of cheeses, a gradual reduction in moisture content and pH and an increase in total acidity is typically observed. This is explained by the curd shrinkage, as a consequence of the acid production by starter culture, which helps to drain the whey from the cheese mass (Hassanien, Mahgoub, & El-Zahar, 2014). The addition of the EOs in the curd could probably interfere on the physical organization of the cheese matrix, and, consequently, on the whey draining and related parameters.

After 14 days of storage contents of lactose were higher in cheese with OVEO and ROEO, while contents of glucose and galactose were higher in cheese without OVEO and ROEO. This could be related to the delay in growth of the starter co-culture in cheese with OVEO and ROEO, reflecting a lower cleavage of lactose for further fermentation. Curiously, no differences were observed regarding the contents of organic acids (lactic, formic and acetic acid) detected in cheese with and without OVEO and ROEO during the storage. Further investigation of the effects of OVEO and ROEO toward the metabolism of *Lactococcus* spp. could help to understand these results since the organic acids are the main products generated from the lactose fermentation by starter cultures (Fernández et al., 2011; Cavanagh, Fitzgerald, & McAuliffe, 2015).

The instrumental textural profile characterized the fresh cheeses with or without OVEO and ROEO as soft in texture, non-elastic, easily deformable, cohesive and having a fragile structure (Supplementary

Table 2). Fresh cheese with OVEO and ROEO showed lower hardness than cheese without EOs on day 14 of storage (Supplementary Table 2), despite their higher syneresis in the beginning of the storage. The addition of OEs in the curd could have promoted changes in the interaction between the casein micelles and the capacity of water retention, resulting in possible changes in the textural properties of cheeses. This could also explain the greater softness and chewiness observed in fresh cheese with EOs compared to cheese without EOs on day 7 of storage (Supplementary Table 3). These characteristics could be related to a greater emulsification of the curd promoted by incorporation of EOs in these matrices because their small droplets can fill the spaces into the protein structure more than milk fat globules (Lobato-Calleros et al., 2007).

L* (brightness) and b* (yellow color) values were similar for cheese with or without OVEO and ROEO during storage. Lower a* values (green color) were observed in cheese with OVEO and ROEO up to 7 days of storage compared to cheese without EOs (Supplementary Table 2). In sensory characterization by panelists, cheeses with and without EOs were considered as having great brightness appearance; however, cheese with EOs received the highest scores for brightness appearance and whitish color during the measured storage period. Interestingly, this difference was not detected in the instrumental values of L* b*. The different results of sensory and instrumental data may be related to distinct aspects, such as the use of the a numerical scale created by the panelist for scoring attribute intensities, which is based on the reference standard used in training sessions and defined as a consensus (Martens, Risvik, & Martens, 1994; Meulleneti & Carpenter, 1998).

Cheese with OVEO and ROEO received the highest scores for mint-like flavor and refreshing aroma, while cheese without EOs received the highest scores for cheese aroma and flavor (Supplementary Table 3). The flavor and aroma characteristics were probably related to ROEO major constituents, which were also prevalent in cheese during storage. Eucalyptol produces a changeable "distinctive but pleasant mint-like flavor" in food matrices (Barbosa et al., 2016), while camphor produces a light "refreshing astringent flavor". Reinforcing these established sensory characteristics, the scores for both "mint-like and refreshing aroma" and "mint-like flavor" decreased over time, which occurred in parallel to decreases in amounts of terpenes in cheese.

PCA analysis was used to assess the effects of the incorporation of OVEO and ROEO in fresh cheese based on the principal components that defined these products during the refrigerated storage. The parameters of cheese that contributed most to PC1 were lactose content, cohesiveness, homogeneous texture, lactic acid content, hardness, salty flavor, acid flavor and brightness appearance (Fig. 3-A). PC1, which explained 43.21% of the variance among the samples, clearly separated the attributes acidity, lactic acid content, homogeneous texture and salty from the lactose content. Most of the variability related to the characteristics of cheese without OVEO and ROEO could be explained by these variables. PC2, which explained 37.51% of the variance among the samples, was defined by the cheese flavor, cheese aroma, luminosity, chewiness, mint-like flavor, refreshing aroma and mint-like aroma. Variability not explained by PC1 was explained by these variables. In the case of PC2, the mint-like flavor, and refreshing aroma together with a mint-like aroma were found to be the most important variables that separated the cheese with EOs from cheese without OVEO and ROEOs on days 1, 7, 14 and 21 of storage (Fig. 3-B).

4. Conclusion

The results of this study demonstrated that the incorporation of a synergistic mixture of OVEO and ROEO in fresh cheese delays the growth, but did not compromise the survival of *Lactococcus* spp., while decreases the survival of *E. coli* O157:H7 in this product during refrigerated storage. The synergistic amounts of OVEO and ROEO incorporated in fresh cheese attributed specific sensory characteristics to this product and represents an innovative strategy to preserve overall fresh cheese quality during refrigerated storage. However, the use of a synergistic mixture of OVEO and ROEO in fresh cheese made with *Lactococcus* starter cultures should be carefully evaluated considering the changes in original characteristics of this product to achieve the desired antimicrobial effects toward *E. coli* O157:H7.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil Grant Number 401100/2014-6) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES-Brazil Finance Code 001).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.039.

References

Allam, M. G. M., Darwish, A. M. G., Ayad, E. H. E., Shokery, E. S., & Darwish, S. M. (2017). Lactococcus species for conventional Karish cheese conservation. *LWT - Food Science and Technology, 79*, 625–631.

Anand, S. P., & Sati, N. (2013). Artificial preservatives and their harmful effects: Looking toward nature for safer alternatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 4*, 2496–2501.

AOAC (2016). *Official methods of analysis* (20th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC Intl.

APHA. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (4th ed.). (Washington, USA).

Asensio, C. M., Grosso, N. R., & Juliani, H. R. (2015). Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oil. *LWT - Food Science and Technology, 60*, 664–671.

Barbosa, L. M., Medeiros, J. A. C., Oliveira, K. A. R., Gomes-Neto, N. J., Tavares, J. F., Magnani, M., et al. (2016). Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli, Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. *Food Control, 59*, 468–477.

Bezerra, T. K. A., Arcanjo, N. M. O., Araújo, A. R. R., Queiroz, A. L. M., Oliveira, M. E. G., Gomes, A. M. P., et al. (2017). Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology, 76*, 209–215.

Brazilian Legislation. Ministry of health. National health surveillance agency. RDC resolution No. 12 of 02/01/2001. Technical regulation on the microbiological standards for foods, Accessed 12 maio 2018.

Carvalho, R. J., Souza, G. T., Honório, V. G., Sousa, J. P., Conceição, M. L., Magnani, M., et al. (2015). Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiology, 52*, 59–65.

Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F., & McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation: The origins of Lactococcus lactis and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology, 47*, 45–61.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2016). *Reports of selected E. coli outbreak investigation*https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html/, Accessed date: 2 January 2018.

CIE. (1996). *Colourimetry* (2nd ed.). Vienna: Commission Internationale de l'Éclairage Publication.

CLSI. (2012). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational supplement. CLSI document M100-S22.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

da Costa, W. K. A., Souza, G. T., Brandão, L. R., Lima, R. C., Garcia, E. F., Lima, M. S., et al. (2018). Exploiting antagonistic activity of fruit-derived Lactobacillus to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Research International, 108*, 172–182.

Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., & Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*, 2745–2748.

Evert-Arriagada, K., Hernández-Herrero, M. M., Juan, B., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2012). Effect of high pressure on fresh cheese shelf-life. *Journal of Food Engineering, 110*, 248–253.

Fernández, E., Alegría, Á., Delgado, S., Martín, M. C., & Mayo, B. (2011). Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* genotypes, isolated from starter-free cheeses made of raw milk. *Applied and Environmental Microbiology, 77*, 5324–5335.

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.

Hassanien, M. F. R., Mahgoub, S. A., & El-Zahar, K. M. (2014). Soft cheese supplemented with black cumin oil: Impact on food borne pathogens and quality during storage. *Saudi Journal of Biological Sciences, 21*, 280–288.

Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods, 44*, 121–129.

Honório, V. G., Rodrigues, J. B. S., Souza, G. T., Carvalho, R. J., Gomes-Neto, N. J., Figueiredo, R. C. B. Q., et al. (2015). Inhibition of *Staphylococcus aureus* cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1,8-cineole. *Frontiers in Microbiology, 6*, 1–10.

Hossain, F., Follett, P., Dang Vu, K., Harich, M., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. *Food Microbiology, 53*, 24–30.

Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology, 3*, 1–24.

Ioanna, F., Quaglia, N. C., Storelli, M. M., Castiglia, D., Goffredo, E., Storelli, A., et al. (2018). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of Caciocricota goat Cheese. *Food Microbiology, 70*, 200–205.

Iten, F., Saller, R., Abel, G., & Reichling, J. (2009). Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris* –chemotype carvacrol. *Planta Medica, 75*, 1231–1236.

Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and analysis of terpenes/terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology, 1*, 345–358.

Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, E., & Mortazavian, A. M. (2018). Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 45*, 62–72.

Kondrotienė, K., Kasėtienė, N., Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Kaškonas, P., Šernienė, L., et al. (2018). Evaluation of fresh cheese quality prepared with newly isolated nisin Z-producing *Lactococcus lactis* bacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9450-7.

Lobato-Calleros, C., Reyes-Hernández, J., Beristain, C. I., Hornelas-Uribe, Y., Sánchez-García, J. E., & Vernon-Carter, E. J. (2007). Microstructure and texture of white fresh cheese made with canola oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat. *Food Research International, 40*, 529–537.

Martens, M., Rivik, E., & Martens, H. (1994). Matching sensory and instrumental analyses. In J. R. Piggott, & A. Paterson (Eds.). *Understanding natural flavors*. Boston, MA: Springer.

Meira, Q. G. S., Magnani, M., Medeiros Júnior, F. C., Queiroga, R. C. R. E., Madruga, M. S., Gullón, B., et al. (2015). Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International, 76*, 828–838.

Meullenet, J. F., & Carpenter, J. A. (1998). Relationship between sensory and instrumental texture profile attributes. *Journal of Sensory Studies, 13*, 77–93.

Moro, A., Librán, C. M., Berruga, M. I., Carmona, M., & Zalacain, A. (2015). Dairy matrix effect on the transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 95*, 1507–1513.

Pei, R. S., Zhou, F., Ji, B. P., & Xu, J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against E. coli with an improved method. *Journal of Food Science, 74*, 379–383.

Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J. L., Rodríguez, J. M., Nuñez, M., & Medina, M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal, 15*, 51–57.

Santiesteban-López, A., Palou, E., & López-Malo, A. (2007). Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a (w) and pH. *Journal of Applied Microbiology, 102*, 486–497.

Sant'Ana, A. M. S., Bezerril, F. F., Madruga, M. S., Batista, A. S. M., Magnani, M., Souza, E. L., et al. (2013). Nutritional and sensory characteristics of minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. *Journal of Dairy Science, 96*, 7442–7453.

Siracusa, V. (2012). Food packaging permeability behaviour: A report. *International Journal of Polymer Science*. https://doi.org/10.1155/2012/302029 ID 302029.

Souza, G. T., Carvalho, R. J., Sousa, J. P., Tavares, J. F., Schaffner, D., Souza, E. L., et al. (2016). Effects of the essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semi hard cheese broth and slurry. *Journal of Food Protection, 79*, 246–252.

Zeppa, G., Conterno, L., & Gerbi, V. (2001). Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 6*, 2722–2726.

APÊNDICE B - ARTIGO II

SURVIVAL OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* LA-5 AND *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 IN MINAS FRESCAL CHEESE MADE WITH OREGANO AND ROSEMARY ESSENTIAL OILS

Artigo submetido ao periódico **Food Microbiology**
ISSN: 0740-0020, Qualis: A1 (ano base: 2016), Área: Nutrição, Fator de impacto: 4,384

Abstract

The effects of the incorporation of the essential oil from *Origanum vulgare* L. (OVEO; 0.07 μL/g) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO; 2.65 μL/g) in combination in Minas Frescal cheese on the counts of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Escherichia coli* O157:H7 were evaluated during refrigerated storage (7 ± 0.5 °C). The terpenes of OVEO and ROEO, survival of the probiotic strain during *in vitro* digestion, as well as the physicochemical and sensory aspects were also monitored in Minas Frescal cheese. All terpenes decreased in cheese when the storage time increased. The incorporation of OVEO and ROEO delayed the increase in *L. acidophilus* LA-5 counts in cheese, but did not affect its ability to survive in cheese under simulated gastrointestinal conditions. The decreases in counts of *E. coli* O157:H7 observed in the first 15 days of refrigerated storage were strongly correlated ($r \geq 0.82$) with the terpenes detected in cheese. Scores attributed for aroma, flavor, overall impression and purchase intention of cheese with OVEO and ROEO increased with the increase of the storage time. The incorporation of OVEO and ROEO in combination could be a strategy to control *E. coli* O157:H7 in probiotic Minas cheese during storage; however, the amounts of these substances should be cautiously selected considering possible negative sensory impacts in this product.

Keywords: *E. coli* O157:H7, *Lactobacillus acidophilus*, dairy products, phenolics.

1. Introduction

The awareness of consumers about the benefits related to healthy food consumption has increased the demand for functional foods, particularly those containing probiotics (Sarkar et al., 2016). Probiotics are microorganisms that confer health benefits to the host when consumed in adequate amounts (FAO/WHO, 2001; Hill et al., 2014). In the gut, probiotics can help the maintenance of the mucosal homeostasis and protect the mucosa from injurious factors (Krishna Rao and Samak, 2013). Species belonging to the genus *Lactobacillus* are the most studied probiotics for incorporation in foods and have been widely used as active ingredients in functional dairy products (Meira et al., 2015, Amiri et al., 2019).

Fresh cheeses are considered one of the most suitable dairy matrices for survival of probiotics (Madureira et al., 2011). The lower titratable acidity, good buffering ability, dense texture and higher protein and fat contents allow the survival of probiotics during storage and their efficient delivery through the gastrointestinal tract (Cruz et al., 2009; Karimi et al.,

2011). Minas Frescal cheese is a typical Brazilian minimally ripened cheese made with the starter mesophilic culture or by direct acidification with lactic acid (Sant'Ana et al., 2013). It is a minimally ripened cheese stored under cold temperatures (7 ± 2 °C) and characterized for presenting high water activity, pH above 5 and low salt content (Campagnollo et al., 2018).

The physicochemical characteristics of fresh cheeses provide favorable conditions for survival of foodborne pathogens, such as *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7), which can grow at temperatures between 7 and 50 °C with an optimum growth temperature of 37 °C (Ioanna et al., 2018). *E. coli* O157:H7 causes hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura in humans (Karmali et al., 2010). Some of the major food outbreaks involving *E. coli* O157:H7 have been associated with the consumption of dairy products, including minimally ripened cheeses (CDC, 2016).

Essential oils from *Origanum vulgare* L. (oregano; OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary; ROEO) have been proposed as agents to preserve cheeses because of their efficacy to inhibit spoilage and pathogenic bacteria typically associated with these products (Olmedo, Nepote, and Grosso, 2013; Asensio et al., 2015; Souza et al., 2016). However, the main limitation for the use of OVEO and ROEO in foods is the strong flavor of these terpene-rich substances, since the amounts of these essential oils required to ensure their antimicrobial efficacy commonly exceed the sensory threshold for consumers (Azeredo et al., 2011; Diniz-Silva et al., 2019). Studies have demonstrated that OVEO and ROEO act in synergism against a range of food-related bacteria (Honório et al., 2015, Barbosa et al., 2016). Consequently, low doses of OVEO and ROEO could be an strategy to potentiate their antimicrobial effects in foods without affecting the sensory acceptability by consumers (Azeredo et al., 2011).

A previous study reported that the incorporation of a synergistic mixture of OVEO and ROEO in fresh cheese did not compromise the survival of a starter culture during refrigerated storage, while decreased the survival of *E. coli* O157:H7 counts and these effects were associated with the presence of terpenes in cheese during the measured storage period (Diniz-Silva et al., 2019). However, the effects of the incorporation of OVEO and ROEO in synergistic combination on the survival of probiotics in cheese during storage remains unknown. Therefore, this study was performed to i) manufacture a Minas Frescal cheese (Minas cheese) with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (*L. acidophilus* LA-5) and OVEO and ROEO combined in synergistic doses; ii) quantify the terpenes of OVEO and ROEO in the manufactured cheese and their effects on the counts of the probiotic strain and *E. coli* O157:H7 during refrigerate storage (7 ± 0.5 °C); iii) assess the survival of the probiotic strain in cheese with OVEO and ROEO under simulated gastrointestinal conditions in

different refrigerated storage time intervals; and iv) determine the physicochemical and sensory characteristics of the probiotic cheese with OVEO and ROEO during refrigerate storage (7 ± 0.5 °C).

2. Materials and Methods

2.1 Essential oils, test strains and growth conditions

OVEO (batch 228) and ROEO (batch 165) extracted by steam distillation were obtained from Ferquima Ind. Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brazil). The major constituents in OVEO and ROEO, previously identified by GC-MS, were thymol (34.8%) and eucalyptol (27.9%), respectively (Diniz-Silva et al., 2019). The commercial freeze-dried probiotic culture of *L. acidophilus* LA-5 (batch 3196076) supplied by Christian Hansen (Valinhos, Minas Gerais, Brazil) and an *E. coli* O157:H7 strain (SISGEN A1802CF) isolated from foods involved in outbreak (LACEN, Curitiba, Paraná State, Brazil) were used as probiotic and pathogen test strain, respectively.

The inoculum of each strain was obtained after preparing suspensions in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL, w/v) from overnight culture grown for 18 - 20 h (late exponential growth phase) in de Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS, HiMedia, India) for *L. acidophilus* LA-5 at 37 °C under anaerobic conditions (using the Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) and brain heart infusion (BHI) broth (HiMedia, India) at 37 °C for *E. coli* O157:H7. Cells of the probiotic or pathogen strain were harvested through centrifugation (4,500 × *g*, 15 min, 4 °C), washed and re-suspended in sterile saline solution to obtain standard cell suspensions (Souza et al., 2016). Optical density (OD) readings at 660 nm (OD_{660}) of 0.1 and 0.09 provided viable counts of approximately 8 and 7 log CFU/mL for the probiotic and pathogen strain, respectively. Each strain was used as single inoculum.

2.2 Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and fractional inhibitory concentration Index (FICI)

The MIC of OVEO and ROEO against *L. acidophilus* LA-5 was determined using a microdilution in broth method (CLSI, 2012), with minor adaptations. Stock emulsions of OVEO (80 μL/mL) and ROEO (170 μL/mL) were prepared in MRS broth using Tween 80 (1%, v/v; Sigma–Aldrich, USA) as an emulsifier. Two-fold serial dilutions from the stock-emulsions were added to the wells of a 96-well microtiter plate. Then, 50 μL of the suspension of the *L. acidophilus* LA-5 prepared in MRS broth were dispensed to each well (final counts of approximately 6 log CFU/mL). Each microplate included positive (MRS

broth without OVEO or ROEO inoculated with the test strain) and negative (MRS broth not inoculated with the test strain) controls. The systems were incubated anaerobically (Anaerogen, Oxoid) at 37 °C for 24 h. Afterwards, a 30-µL aliquot of resazurin (0.01%, w/v) (Inlab, Brazil) prepared in aqueous solution was added to each well. The color changes promoted by resazurin were visually assessed after 20 min at 37 °C. Bacterial growth was indicated by color changes from purple to pink (or colorless). The MIC of OVEO or ROEO was defined as the lowest concentration capable of inhibiting bacterial growth (Carvalho et al., 2015).

The fractional inhibitory concentration index (FICI) of OVEO and ROEO against *L. acidophilus* LA-5 was determined using the checkerboard method (Zuo et al., 2018). For this, 1 mL of the bacterial inoculum was mixed with 10 mL of the emulsions of OVEO and ROEO in combination in different concentrations (prepared in MRS broth as described above) to provide final counts of approximately 6 log CFU/mL. The mixture was vigorously mixed for 30 s using a vortex. OVEO and ROEO were assayed at MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC, 1/16 MIC and 1/32 MIC. The systems were statically incubated anaerobically (Anaerogen, Oxoid) for 24 h at 37 ºC. The FICI was calculated as follows: (MIC of OVEO in combination with ROEO/MIC of OVEO alone) + (MIC of ROEO in combination with OVEO/MIC of ROEO alone). Synergy was defined as FICI ≤ 0.5; additive as 0.5 < FICI ≤ 1; indifference (no interaction) was defined as 1< FICI < 4; and antagonism was defined as FICI ≥ 4 (Elion, Singer and Hitchings, 1954).

2.3 Manufacture and sampling of Minas cheese

The Minas cheese was manufactured using heat-treated (70 °C, 30 min) cow milk and the probiotic *L. acidophilus* LA-5 as a starter strain (Vinderola et al., 2000). The milk (20 L) at 37 °C was inoculated with the probiotic/starter culture (final counts of approximately 8 log CFU/mL) followed by the addition of calcium chloride (0.5 mL/L) and commercial rennet (0.8 mL/L; Ha-La®, Christian Hansen). The formed soft curd was cut into 1-2 cm cubes using a AISI 304 cutter, slowly stirred with a sterile glass (5 min) and homogenized with an emulsion of OVEO and ROEO (prepared in drained cheese whey) in combined concentrations that showed synergistic interactions against *L. acidophilus* LA-5. The amounts of OVEO and ROEO incorporated in the curd were selected based on the yield of the cheese batch observed in preliminary experiments. Afterwards, the curd was maintained in perforated containers (10 cm diameter) during 24 h at 7 ± 0.5 °C for whey removal. Cheeses were vacuum packaged in

sterile polyethylene bags and stored for 21 days at refrigerate storage (7 ± 0.5 °C). The manufacture of cheese without OVEO and ROEO was performed similarly.

A total of 60 units (200 g) of each cheese were manufactured with and without OVEO and ROEO (three independent batches were prepared). Sixteen units of each cheese (with or without OVEO and ROEO) were used for microbiological assays (enumeration of *L. acidophilus* LA-5 and *E. coli* O157:H7) and quantification of terpenes. From this sixteen units, eight cheese units (with or without OVEO and ROEO) were inoculated with an *E. coli* O157:H7 suspension (final counts of approximately 6 log CFU/g), homogenized using stomacher, packaged in sterile polyethylene bags and stored for 21 days at refrigerate storage (7 ± 0.5 °C). Four units of each cheese (with or without OVEO and ROEO) were used for enumeration of *L. acidophilus* LA-5 after simulated gastrointestinal conditions and physicochemical analyses during storage. Forty units of each cheese (with or without OVEO and ROEO) were used in sensory analyses with previous monitoring of their microbiological quality (Figure 1).

2.4 Determination of terpenes in Minas cheese during storage

Terpenes previously described as prevalent in OVEO (i.e., thymol, carvacrol, ρ-cymene, α-terpinene, linalool and γ-terpinene) and ROEO (i.e., eucalyptol, camphor, α-pinene, caryophyllene and borneol) were monitored in cheese (inoculated or not with *E. coli* O157:H7 with or without EOs) every 3 days during 21 days of refrigerate storage (7 ± 0.5 °C), following a previously described procedure (Abilleira et al., 2010).

The initial concentration of each monitored terpene in cheese was defined as that measured in cheese just after the 24 h-draining time, defined as day zero of storage. For determination of terpenes, 1 g-cheese sample was placed in a 20 mL amber vial sealed with polytetrafluoroethylene/silicone septa. Terpenes were extracted with an SPME device (Supelco) fiber containing 50/30 μm Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane. After equilibration of temperature at 40 °C for 10 min, the fiber was exposed to the headspace for 30 min. The stainless steel needle housing the fiber penetrated the septum and after equilibration at 45 °C for 20 min the fiber was exposed to the headspace above the cheese sample for 40 min. After extraction, the SPME device was inserted directly into the injection port of the GC-MS.

Separation of the compounds was performed on a 7890B gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (Agilent Technologies 5977B, Little Falls, DE, USA). The column used was VF-5 ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm). The furnace was initially heated at 40 °C for

10 min, increasing to 110 °C at a rate of 5 °C/min, followed by another increase of 10 °C/min, totaling 37 min running up to 240 °C. The transfer line between the chromatograph and mass spectrum was equilibrated at 230 °C. The mass spectrometer operated in a mass range of 35 to 350 m/z. Terpenes were identified by comparing their mass spectra with those of authentic standards and the National Institute of Standards Technology, NIST/EPA/NIH, Mass Spectral Database version 1.7. The results were expressed as unit area (area units, AU x 10^5) (Bezerra et al., 2016).

2.5 Enumeration of L. acidophilus LA-5 *and E. coli* O157:H7 *in Minas cheese during storage*

At the same time intervals of the terpene determination, samples of cheese contaminated or not with *E. coli* O157:H7 were mixed with sterile saline solution (1:10 w/v), homogenized using a stomacher and serially diluted (10^{-1}-10^{-5}) in the same diluent. Subsequently, 10 µL- aliquots of each dilution were dispensed using a microdrop technique (Herigstad et al., 2001) onto MRS Bile (MRSB) agar (Gebara et al., 2015) or Sorbitol MacConkey agar (HiMedia, Mumbai) for enumeration of *L. acidophilus* LA-5 and *E. coli* O157:H7, respectively, . The plates were incubated for 48 h at 37 ºC under anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid) for counting *L. acidophilus* LA-5 or for 24 h at 37 °C for counting *E. coli* O157:H7. Cheeses manufactured without OVEO and ROEO were similarly assayed. At the end of the incubation period, the visible colonies were enumerated and the results were expressed as log CFU/g. The detection limit of the test was 2 log CFU/g.

2.6 Enumeration of L. acidophilus LA-5 in Minas cheese under simulated gastrointestinal conditions during storage

Viable cells of *L. acidophilus* LA-5 were enumerated in cheeses (not contaminated with *E. coli* O157:H7) with and without OVEO and ROEO during exposure to simulated gastrointestinal conditions on day zero and after 7, 14 and 21 days of storage at 7 ± 0.5 °C. Cheese samples (25 g) were subjected to a multi-step simulation process performed at 37 ºC using an incubator with mechanical agitation (Thoth 6420) to simulate the peristaltic movements with rotation speed adjusted to each phase (esophagus-stomach, duodenum and ileum) (Luciano et al., 2018) (Supplementary Table 1) . The simulation was continuous with increase of the total working volume at each stage (as occurs during real digestion). The esophagus-stomach was simulated using 25 mg of pepsin diluted in 1 mL of 0.1 M HCl, added at a rate of 0.05 mL/mL, pH with gradual decrease using 1 M HCl (pH 5.5/10 min; pH

4.6/10 min; pH 3.8/10 min; pH 2.8/20 min; pH 2.3/20 min and pH 2.0/20 min) under stirring (130 rpm). Duodenal conditions were simulated with 2 g pancreatin/L of 0.1 M $NaHCO_3$ and 12 g bovine bile salts/L of 0.1 M $NaHCO_3$, pH adjusted to 5.0 with 0.1 M $NaHCO_3$ and exposure time of 30 min under stirring (45 rpm); and ileal conditions were simulated with pH adjusted to 6.5 using 0.1 M $NaHCO_3$, exposure time of 60 min under stirring (45 rpm). At each digestive step, 100 µL aliquots of the mixtures were serially diluted sterile saline solution (1:10 v/v), plated onto MRSB agar using a microdrop technique (Herigstad et al., 2001) and incubated for 48 h at 37 °C under anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid). All the enzymes and bovine bile salts were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). At the end of the incubation period, the visible colonies were enumerated and the results were expressed as log CFU/g. The detection limit of the test was 2 log CFU/g.

2.7 Yield, physicochemical parameters, organic acid and sugar contents of Minas cheese

The yield of each cheese was expressed as the weight of the cheese obtained from each liter of milk used for production (g cheese/L of milk). Syneresis, physicochemical parameters (moisture, fat, protein, and ash content, titratable acidity (TA) and a_w) and organic acids and sugars contents were evaluated on days zero, 7, 14 and 21 of storage at 7 ± 0.5 °C. These storage time intervals were selected because preliminary experiments in shorter storage time points did not show any significant differences in measured physicochemical parameters of manufactured cheeses. The syneresis was calculated as the weight of whey released from each kg of cheese (g whey/kg cheese) in the package in each time evaluated (Meira et al., 2015). Moisture (925.09), fat (2000.18), protein (939.02) and ash (930.30) contents (g/100 g), as well as TA (g/100 g of lactic acid) (920.124), a_w (978.18) and pH values (measured using a digital potentiometer) were determined following standard procedures (AOAC, 2016).

To determine the organic acids and sugars contents, a 2-g aliquot of manufactured cheeses was homogenized in 10 mL of ultrapure water for 10 min using a mini-Turrax apparatus. The mixture was centrifuged (4000 x *g*, 5 min, 4 °C) and the collected supernatant was filtered through a 0.45-mm membrane. The extract was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis using a chromatograph (Varian Waters 2690, California, USA) equipped with a binary solvent system valve Rheodyne (loop of 20 µL). The analytical conditions for sugars detection were an Agilent Hi-Plex H column (7.7 x 300 mm, 8 µm) at 85 °C, refractive index detector (RID) (Varian Prostar 356) and ultrapure water as mobile phase. Organic acids were detected using the same column (Agilent Hi-Plex H column; 7.7 x 300 mm, 8 µm), a 200 nm UV (Varian Prostar 330) detector and 0.009 M

H_2SO_4 as mobile phase. The flow rate for both, sugars and organic acids was 0.7 mL/min for a period of 30 min. HPLC sample peaks were identified by comparing their retention times with those of organic acids and sugars standards (Sigma Aldrich®) (Zeppa et al., 2001). The precision of the detection presented a coefficient of variation ≤ 0.5 (R^2 0.99). The detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ) sugars were 0.007 and 0.02 g/L, respectively. For organic acids the LOD and LOQ were in a range of 0.001-0.04 and 0.003-0.13 g/L, respectively.

2.8 Sensory acceptance of Minas cheese during storage

The sensory characteristics of the cheeses with and without OVEO and ROEO were evaluated on zero, 7, 14 and 21 days of storage at 7°C ± 0.5 after approval by a Research Ethics Committee – Human Subjects (protocol number 2.237.293/2017). Before the sensory analyses, all cheese samples were assessed for ensuring their microbiological quality following the Brazilian Legislation standards (Brazilian Legislation, Technical Regulation on the Microbiological Standards for Food, 2002). The sensory tests were performed using 100 untrained panelists (men and women) with age ranging from 18-40 years. Evaluation of cheese samples was performed in individual booths with controlled temperature and lighting (natural daylight, led 5500 K). For the acceptance test, the consumers evaluated color, appearance, aroma, flavor, texture and overall impression of the samples using a hedonic scale of nine points (one "disliked it very much" to nine "liked it a lot") (Meilgaard, Civille and Carr 2007). Purchase intention was evaluated using a scale of five points (one "certainly would not purchase" to five "certainly would purchase").

2.9 Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate in three independent experiments. MIC and FICI results are expressed as modal values because the values were the same in all repetitions. Statistical analyses of physicochemical and sensory parameters were performed using Student's t-test to determine significant differences between the determined parameters for experimental and the control sample during the measured storage time periods, considering $p < 0.05$. Changes in these parameters over the storage in the same sample (experimental or control) were evaluated using ANOVA followed by Tukey's test, considering $p < 0.05$. Pearson's linear correlation coefficients (r) between the amounts of terpenes and counts of *E. coli* O157:H7 were calculated in bivariate linear correlations ($p < 0.01$). Sigma Stat 3.5

(Jandel Scientific Software, San Jose, California) was used for performing the statistical analyses.

3. Results and discussion

3.1 MIC and FICI of OVEO and ROEO

The MIC of OVEO and ROEO against *L. acidophilus* LA-5 was 0.6 and 10.6 µL/mL, respectively. The different MIC values displayed by these OVEO and ROEO should be mostly related to the activity of their major constituents. The phenolic terpenoid thymol, major constituent in the assayed OVEO, possesses stronger antimicrobial activity than the ether terpenoid eucalyptol, the major constituent in the assayed ROEO (Barbosa et al., 2016; Diniz-Silva et al., 2019).

FICI assays of OVEO and ROEO against *L. acidophilus* LA-5 showed an additive interaction for all combined concentrations, with the exception of the combination MIC/8 of OVEO + MIC/4 of ROEO that displayed a synergistic interaction (Supplementary Table 2). Based on these results, the synergistic combination of 0.07 µL/mL of OVEO + 2.65 µL/mL of ROEO was selected for incorporation in Minas cheese, as described in the section 2.3. The synergistic antibacterial effects of OVEO and ROEO has been described as a sequential inhibition of common biochemical pathways and protective enzymes, as well as a result of the combined action of OVEO and ROEO constituents able to cause damage to bacterial membranes (Santiesteban-López et al., 2007). Overall, the additive interaction between OVEO and ROEO may be also due to the action of constituents with similar targets in bacterial cells (Souza, 2016).

3.2 Terpenes and counts of L. acidophilus LA-5 and *E. coli O157:H7 in Minas cheese during refrigerated storage*

A total of 14 terpenes were detected in cheese manufactured with OVEO and ROEO on day zero (Table 1). All terpenes decreased when the length of storage time increased. Terpenes detected in the highest amounts in cheese with OVEO and ROEO over the measured storage period were eucalyptol, camphor, α-pinene, β-pinene, myrcene, ρ-cymene, α-ocimene, isoborneol, α-terpinenol and caryophyllene. Camphene was detected up to 15 days of storage, while thymol and *cis*-ocimene were detected only on day zero (Table 1). None of these terpenes were detected in cheese without OVEO and ROEO. The reduction of terpenes in cheese during the storage could be probably related to their volatility, solubility or ability to

react with cheese components (e.g., proteins and fat) (Diniz-Silva et al., 2019). Meanwhile, it is important to consider that hydroxyl groups of phenolic terpenoids can join to protein groups (e.g., NH and CO) trough hydrogen bonds (Moro et al., 2015) and, consequently, become not detectable by HPLC analysis of cheese samples.

In cheese without OVEO and ROEO, the initial counts of *L. acidophilus* LA-5 increased ($p < 0.05$) 1.5 and 1.8 log CFU/g after 9 and 18 days of storage, respectively (Fig. 2A). No changes were observed in counts of *L. acidophilus* LA-5 in cheese without OVEO and ROEO after 18 days of storage. In cheese with OVEO and ROEO, initial counts of *L. acidophilus* LA-5 increased ($p < 0.05$) 1 and 1.8 log CFU/g after 12 and 21 days of storage, respectively (Fig. 2A). The observed delay in growth of *L. acidophilus* LA-5 in cheese with OVEO and ROEO at the beginning of the measured storage period could be probably caused by the presence of higher amounts of EOs terpenes in cheese. Even at subinhibitory concentrations, terpenoids that typically exert low antimicrobial activity when acting alone, such as eucalyptol and camphor, can show enhanced antimicrobial activity when acting in combination with other EOs constituents (Bassolé and Juliani, 2012, Pei et al., 2009). In our previous study, the growth of *Lactococcus* ssp. in fresh cheese with OVEO and ROEO was delayed during the earlier 9 days of refrigerated storage (Diniz-Silva et al., 2019).

In cheese without OVEO and ROEO and contaminated with *E. coli* O157:H7, the initial counts of *L. acidophilus* LA-5 increased 0.8 log CFU/g after 6 days of storage. Over the measured storage period (21 days), an increase of 1.2 log CFU/g in initial counts of *L. acidophilus* LA-5 was observed in cheese without OVEO and ROEO and contaminated with *E. coli* O157:H7 (Fig. 2B). In cheese with OVEO and ROEO and contaminated with *E. coli* O157:H7, *L. acidophilus* LA-5 counts increased 1 log CFU/g only after 18 days of storage and no changes in counts were observed from this storage time onward (Fig. 2B). Interestingly, regardless of the incorporation of OVEO and ROEO, the counts of *L. acidophilus* LA-5 were approximately 1 log CFU/g lower ($p < 0.05$) in cheese contaminated with *E. coli* O157:H7 (Fig. 2B) than in uncontaminated cheese (Fig. 2A) over the storage. These results may be related to changes in the metabolism of *L. acidophilus* LA-5 as a consequence of the competition with *E. coli* O157:H7 in the same substrate, which could activate the production of substances with inhibitory effects on this pathogen, such as organic acids, diacetyl, hydrogen peroxide and bacteriocins (Ioanna et al., 2018). These changes would help to explain the inhibition of *E. coli* O157:H7 even when terpenes with strong antimicrobial activities were not detected in cheese with OVEO and ROEO. Further studies focusing on the detection of end-products from *L. acidophilus* LA-5 metabolism in cheese

contaminated with *E. coli* O157:H7 with and without EOs should help to clarify the occurrence of possible synergism between terpenes and other antimicrobial substances produced in these matrices. Overall, the counts of *L. acidophilus* LA-5 were higher or close to 8 log CFU/g in Minas cheese during the measured storage period regardless the addition of OVEO and ROEO, which is considered an optimal count of viable probiotics in food during the time of consumption (Mousavi et al., 2019).

The counts of *E. coli* O157:H7 increased ($p < 0.05$) 1 and 1.8 log CFU/g after 3 and 9 days of storage in cheese without OVEO and ROEO, respectively. No changes in the counts of *E. coli* O157:H7 were observed after this storage time interval onward (Fig. 2B). Initial counts of *E. coli* O157:H7 decreased ($p < 0.05$) 1.0 log CFU/g in cheese with OVEO and ROEO after 3 days of storage and did not change up to 9 days of storage. After 15 and 21 days of storage, initial counts of *E. coli* O157:H7 decreased 2.3 and 2.9 log CFU/g in cheese with OVEO and ROEO, respectively (Fig. 2B). Gram-negative bacteria are commonly considered less susceptible to EOs than Gram-positive bacteria (Sakkas and Papadopoulou, 2017) because the complexity of their outer membrane, which provides an hydrophilic surface able to act as a barrier to the partition of EOs constituents (Burt, 2004; Smith-Palmer, Stewart, and Fyfe, 1998). In the present study the opposite was observed since *E. coli* O157:H7 displayed higher susceptibility to OVEO and ROEO compared to *L. acidophilus* LA-5. However, the stronger inhibitory effects of OVEO and ROEO against *E. coli* O157:H7 when compared to *L. acidophilus* LA-5 in cheese may be influenced by the intrinsic characteristics of these bacteria. These results are interesting because demonstrate the potential use of OVEO and ROEO in combination for inhibition of pathogens in the same food matrix where the survival of probiotic lactic bacteria is desired.

According to the Pearson's correlation analysis, the amounts of eucalyptol ($r=0.90$), camphor ($r=0.89$), α-pinene ($r=0.0.89$), β-pinene ($r=0.90$), myrcene ($r=0.95$), ρ-cymene ($r=0.87$), α-ocimene ($r=0.82$), isoborneol ($r=0.86$), α-terpinenol ($r=0.82$) and caryophyllene ($r=0.90$) detected in cheese with ROEO and OVEO up to 21 days of storage, as well as the amounts of camphene ($r=0.95$) detected up to 15 days of storage presented a strong positive correlation with the decreases in counts of *E. coli* O157:H7 (Table 2).

Interestingly, camphene and myrcene, which are monoterpenes with weak antimicrobial activities (Hyldgaard et al., 2012), showed the strongest correlation with the counts of *E. coli* O157:H7. Otherwise, components well-known by their strong antimicrobial activity (e.g., thymol) detected only at day zero of storage were not correlated with the counts of this pathogen. These findings show that the antimicrobial activity of OVEO and ROEO

against *E. coli* O157:H7 in cheese during storage was not achieved by the action of only the major constituents present in these EOs.

3.3 Enumeration of L. acidophilus LA-5 in Minas cheese under simulated gastrointestinal conditions during storage

Despite the variation on initial counts of *L. acidophilus* LA-5, related to increases or decreases in cheese during storage, no changes in counts of *L. acidophilus* LA-5 were observed up to exposure to the 3th digestive step in cheese with or without OVEO and ROEO. Otherwise, the exposure to the 4th digestive step decreased ($p < 0.05$) the counts of *L. acidophilus* LA-5 in approximately 1 log CFU/g in cheese with or without OVEO and ROEO regardless the storage time (Fig 3A-D). No changes were observed in counts of *L. acidophilus* LA-5 in cheese with or without OVEO and ROEO after this step (Fig 3A-D).

At day zero, *L. acidophilus* LA-5 counts in cheese with or without OVEO and ROEO were similar up to the end of the *in vitro* digestion (Fig 3A). After 7 days of storage, the counts of *L. acidophilus* LA-5 were 1.2 log CFU/g higher in cheese without EOs when compared to cheese with EOs (Fig 3B). After 14 and 21 days of storage, the counts of *L. acidophilus* LA-5 in cheeses with and without OVEO and ROEO were similar (Fig 3C-D).

At the end of the *in vitro* digestion (after the 8th digestive step; pH 6.5, 60 min), counts of *L. acidophilus* LA-5 in cheese with OVEO and ROEO were 7.5 log CFU/g at day zero, 6.8 log CFU/g after 7 days of storage, 8 log CFU/g after 14 days and 8.8 log CFU/g after 21 days of storage (Fig 3A-D). In cheese without OVEO and ROEO, the counts of *L. acidophilus* LA-5 were 7.4 log CFU/g at day zero, 8.3 log CFU/g after 7 days of storage, and 8.7 and 8.8 log CFU/g after 14 and 21 days of storage, respectively (Fig 3A-D).

The similar behavior of *L. acidophilus* LA-5 in cheese with and without OVEO and ROEO during exposure to simulated gastrointestinal conditions is an important finding. The injuries caused by exposure to OVEO and/or ROEO terpenes in Minas cheese could have decreased the tolerance of this probiotic strain to low pH or bile salts and compromised its survival during the gastrointestinal digestion. Studies have reported that the exposure to subinhibitory concentrations of OVEO and ROEO can increase the susceptibility of bacteria to low pH (Luz et al., 2014; Melo et al., 2017). One of the most important characteristics for probiotics when incorporated into foods is the maintenance of their capability of tolerating digestive conditions and reaches the gut in counts enough to confer beneficial effects on the host (Meira et al., 2015). Probably, the availability of nutrients and higher a_w in the Minas cheese helped the probiotic cells to repair the damage caused by the gastrointestinal

conditions (Souza et al., 2016). Overall, despite the delay caused in the growth of *L. acidophilus* LA-5, the counts of this probiotic in cheese with OVEO and ROEO at the end of the *in vitro* digestion are within the minimum count range (6 to 7 log CFU/g) accepted in probiotic foods to provide therapeutic effect in the host (Madureira et al., 2011).

3.4 Physicochemical parameters, organic acid and sugar contents in Minas cheese

The yield (approximately 200g/L) and a_w values of the cheese with or without OVEO and ROEO were similar. No differences in these parameters were expected because the same procedures were used to obtain the curd. However, it is interesting to highlight these results because the incorporation of OVEO and ROEO in the curd could have interfered in the matrix by changing the structural organization and, consequently, the cheese yield. The syneresis increased ($p < 0.05$) and pH and moisture decreased ($p < 0.05$) regardless the incorporation of OVEO and ROEO.

No differences between cheese with and without OVEO and ROEO were observed for protein and ash content during storage (Table 3). In all cheeses, the protein content increased ($p < 0.05$) during storage probably because the release of the whey and concentration of casein in the micelles aggregates (Hassanien, Mahgoub, and El-Zahar, 2014).

Lipid contents were slightly higher ($p < 0.05$) in cheese with OVEO and ROEO up to 7 days of storage. TA was higher ($p < 0.05$) in cheese without EOs than in cheese with EOs up to 14 days of storage, while pH was slightly higher ($p < 0.05$) in cheese with EOs up to 14 days of storage (Table 3). The acidity could increase as a result of the gradual increase of the degradation products in the resulting cheese (Hassanien et al., 2014), but most probably due to the continuous degradation of sugars to organic acids by lactic acid bacteria (Buriti et al., 2005). The effects of OVEO and ROEO on metabolism of *L. acidophilus* LA-5 may explain the higher pH and lower TA in cheese with EOs than in cheese without EOs up to 14 days of storage. In cheese with or without OVEO and ROEO, lactose and lactic acid was the sugar and organic acid detected in the highest amounts during storage, respectively. Contents of lactose were higher ($p < 0.05$) in cheese with EOs, while glucose and galactose contents were significantly higher ($p < 0.05$) in cheese without EOs up to 14 days of storage (Table 3). Lactic and acetic acid contents were higher ($p < 0.05$) in cheese without EOs up to 7 days of storage (Table 3). The metabolic activity of *L. acidophilus* LA-5 in cheeses can be monitored by estimating the amounts of end-products, including lactic and acetic acids (Ong, Henriksson, and Shah, 2007). These results show that the subinhibitory concentrations of

OVEO and ROEO incorporated in Minas cheese caused a delay on the fermentative metabolism of *L. acidophilus* LA-5, resulting in a lower degradation of lactose and, consequently, lower production of lactic and acetic acids in cheese at the beginning of the storage.

Citric acid contents were higher ($p < 0.05$) in cheese without OVEO and ROEO on day zero, while contents of succinic acid were higher ($p < 0.05$) in cheese with EOs up to 14 days of storage (Table 3). These organic acids can be metabolized by *Lactobacillus* species, forming a variety of aromatic compounds (Cuffia et al., 2017). Probably, the distinct amounts of these organic acids observed in Minas cheese with and without OVEO and ROEO are related to the inhibitory effects of these substances on the metabolism of *L. acidophilus* LA-5.

3.5 Sensory aspects of Minas cheese during storage

Minas cheese with and without OVEO and ROEO received similar scores ($p \geq 0.05$) for color, appearance and texture at the different measured storage time intervals (Supplementary Table 3). For all attributes, the scores attributed to cheese without EOs were between “liked very much” and “liked moderately” at days zero, 7, 14 and 21 of storage (Supplementary Table 3). After 7 days of storage, the scores attributed for aroma, flavor and overall impression of cheese with OVEO and ROEO (“liked it slightly”) increased ($p < 0.05$) in comparison to day zero (“not liked/disliked or” and “disliked slightly”), reaching similar values (“liked moderately”) to the cheese without EOs after 14 days of storage (Supplementary Table 3). A previous study reported gradual increase of the scores attributed for sensory characteristics of soft cheese with black cumin EO when the length of the storage time increased (Hassanien et al., 2014) as well as for sensory characteristics of Iranian white-brined cheese with *Zataria multiflora* EO, a thyme-like plant (Mehdizadeh et al., 2018). Probably, these results are directly related to the gradual reduction of the OVEO and ROEO terpenes in the cheese during storage.

Regarding the purchase intention, in all measured storage intervals, cheese without OVEO and ROEO received scores corresponding to "probably purchase" and cheese with OVEO and ROEO received scores corresponding to "maybe purchase, maybe not purchase" on day zero, with increase after 14 days of storage corresponding to "probably purchase" (Supplementary Table 3). Similarly to acceptance tests, it seems that the reduction of terpenes in Minas cheese and, consequently, a softer flavor and aroma characteristic of OVEO and ROEO during the storage rendered the cheese in a more attractive product.

Conclusions

The incorporation of OVEO and ROEO in synergistic amounts in Minas cheese caused a delay in the growth of *L. acidophilus* LA-5, but did not decrease the counts of this probiotic during refrigerated storage or its ability to survive the gastrointestinal conditions in the cheese matrix over time. In addition, at the tested concentrations, OVEO and ROEO did not change appreciably the physicochemical characteristics of the cheese, with the exception of a decrease in organic acids contents probably as a consequence of the delayed growth of *L. acidophilus* LA-5. At the tested synergistic concentrations, OVEO and ROEO terpenes incorporated in cheese decreased the counts of *E. coli* O157:H7 up to 21 days of refrigerated storage and controlled the growth of this pathogen during 21 days of storage. The incorporation of OVEO and ROEO at synergistic concentrations in Minas cheese should be a promising strategy for its preservation; however, the amounts of these EOs should be carefully selected considering their possible impacts on the acceptance and purchase intention of this product.

Acknowledgements

The authors are grateful to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil Grant Number 401100/2014-6) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES-Brazil Finance Code 001).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Abilleira, E., de Renobales, M., Nájera, A.I., Virto, M., Gordoa, J.C.R. de, Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Barron, L.J.R., 2010. An accurate quantitative method for the analysis of terpenes in milk fat by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. Food Chem. 120, 1162–1169.

AOAC, 2016. Official Methods of Analysis. (20th ed.). AOAC Intl., Gaithersburg, MD.

Amiri, S., Rezaei Mokarram, R., Sowti Khiabani, M., Rezazadeh Bari, M., Alizadeh Khaledabad, M., 2019. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12: Optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. Int. J. Biol. Macromol. 123, 752–765.

Asensio, C.M., Grosso, N.R., Juliani, H.R., 2015. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. LWT - Food Sci. Technol. 60, 664–671.

Azeredo, G.A, Lúcia, T., Stamford, M., Campos, P., Justino, N., Neto, G., Elieidy, M., Oliveira, G. De, Leite, E., Souza, D., 2011. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L . and *Rosmarinus officinalis* L to inhibit bacteria and autochthonous micro flora associated with minimally processed vegetables. Food Res. Int. 44, 1541–1548.

Barbosa, I.M., da Costa Medeiros, J.A., de Oliveira, K.Á.R., Gomes-Neto, N.J., Tavares, J.F., Magnani, M., de Souza, E.L., 2016. Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. Food Control 59, 468–477.

Bassolé,I., H., N., Juliani, H.R., 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties 17, 3989–4006.

Bezerra, T.K.A., De Araujo, A.R.R., Do Nascimento, E.S., De Matos Paz, J.E., Gadelha, C.A., Gadelha, T.S., Pacheco, M.T.B., Do Egypto Queiroga, R.D.C.R., De Oliveira, M.E.G., Madruga, M.S., 2016. Proteolysis in goat "coalho" cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. Food Chem. 196, 359–366.

Brazilian Legislation. Ministry of Health. National Health Surveillance Agency. RDC Resolution No. 12 of 02/01/2001. Technical Regulation on the Microbiological Standards for Foods, Accessed 12 maio 2018.

Buriti, F.C.A., Da Rocha, J.S., Saad, S.M.I., 2005. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. Int. Dairy J. 15, 1279–1288.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int. J. Food Microbiol. 94, 223–253.

Campagnollo, F.B., Margalho, L.P., Kamimura, B.A., Feliciano, M.D., Freire, L., Lopes, L.S., Alvarenga, V.O., Cadavez, V.A.P., Gonzales-Barron, U., Schaffner, D.W., Sant'Ana, A.S., 2018. Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. Food Microbiol. 73, 288–297.

Carvalho, R.J., de Souza, G.T., Honório, V.G., de Sousa, J.P., da Conceição, M.L., Magnani, M., de Souza, E.L., 2015. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and

mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. Food Microbiol. 52, 59–65.

CLSI (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement. CLSI Document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Cruz, A. G., Buriti, F. C. A., de Souza, C. H. B., Faria, J. A. F., Saad, S. M. I., 2009. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects.Trends in FoodScience & Technology, 8, 344-354.

Cuffia, F., George, G., Renzulli, P., Reinheimer, J., Meinardi, C., Burns, P., 2017. Technological challenges in the production of a probiotic pasta filata soft cheese. LWT - Food Sci. Technol. 81, 111–117.

Souza, E. L., 2016. The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: A review. Trends Food Sci. Technol. 56, 1–12.

Diniz-Silva, H.T., Batista de Sousa, J., da Silva Guedes, J., Ramos do Egypto Queiroga, R. de C., Madruga, M.S., Tavares, J.F., Leite de Souza, E., Magnani, M., 2019. A synergistic mixture of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils to preserve overall quality and control *Escherichia coli* O157:H7 in fresh cheese during storage. LWT - Food Sci. Technol. 112, 77-81.

Elion GB, Singer S, Hitchings GH., 1954. Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabo- lites. J Biol. Chem. 208, 477–488.

Gebara, C., Ribeiro, M.C.E., Chaves, K.S., Gandara, A.L.N., Gigante, M.L., 2015. Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. LWT - Food Sci. Technol. 64, 508–513.

Hassanien, M.F.R., Mahgoub, S. A., El-Zahar, K.M., 2014. Soft cheese supplemented with black cumin oil: Impact on food borne pathogens and quality during storage. Saudi J. Biol. Sci.

Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J., 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. J. Microbiol. Meth. 44, 121–129.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat. Rev.

Gastroenterol. Hepatol. 11, 506–514.

Honório, V.G., Bezerra, J., Souza, G.T., Carvalho, R.J., Gomes-Neto, N.J., Figueiredo, R.C.B.Q., Melo, J. V., Souza, E.L., Magnani, M., 2015. Inhibition of *Staphylococcus aureus* cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1,8-cineole. Front. Microbiol. 6, 1–10.

Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L., Debabov, D., 2012. Essential oils in food preservation : mode of action , synergies , and interactions with food matrix components. Front. microbiol. 3, 1–24.

Ioanna, F., Quaglia, N.C., Storelli, M.M., Castiglia, D., Goffredo, E., Storelli, A., De Rosa, M., Normanno, G., Jambrenghi, A.C., Dambrosio, A., 2018. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of Cacioricotta goat cheese. Food Microbiol. 70, 200–205.

Karimi, R., Mortazavian, A.M., Da Cruz, A.G., 2011. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: A review. Dairy Sci. Technol. 91, 283–308.

Karmali, M.A., Gannon, V., Sargeant, J.M., 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). Vet. Microbiol. 140, 360–370.

Krishna Rao, R., Samak, G., 2013. Protection and restitution of gut barrier by probiotics: Nutritional and clinical implications. Curr. Nutr. Food Sci. 9, 99–107.

Luciano, W.A., Matte, T.C., Portela, I.A., de Medeiros, L.L., dos Santos Lima, M., Maciel, J.F., de Souza, E.L., Garcia, E.F., Magnani, M., 2018. Effects of L*actobacillus acidophilus* LA-3 on physicochemical and sensory parameters of açaí and mango based smoothies and its survival following simulated gastrointestinal conditions. Food Res. Int. 114, 159–168.

Luz, I. da S., Melo, A.N.F., Madruga, M.S., Bezerra, T.K.A., de Souza, E.L., Magnani, M., 2014. Sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol cause injury and changes in membrane fatty acid of *Salmonella* Typhimurium cultivated in a meat broth . Foodborne Pathog. Dis. 11, 357–361.

Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A.M., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2011. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. Food Res. Int. 44, 465–470.

Mehdizadeh, T., Narimani, R., Mojaddar, A., Moghaddas, E., Moslem, K., 2018. Antimicrobial effects of *Zataria multiflora* essential oil and *Lactobacillus acidophilus* on *Escherichia coli* O157 stability in the Iranian probiotic white-brined cheese 1–8. J. Food Saf. e12476.

Meilgaard, M.C., Civille, G.V., Carr, B.T., 2007. Sensory Evaluation Techniques, Fourth edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.

Meira, Q.G.S., Magnani, M., de Medeiros Júnior, F.C., Queiroga, R. de C.R. do E., Madruga, M.S., Gullón, B., Gomes, A.M.P., Pintado, M.M.E., de Souza, E.L., 2015. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. Food Res. Int. 76, 828–838.

Melo, A.N.F. de, Souza, G.T. de, Schaffner, D., Oliveira, T.C.M. de, Maciel, J.F., Souza, E.L. de, Magnani, M., 2017. Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Typhimurium PT4 in chicken breast meat after exposure to sequential stresses. Int. J. Food Microbiol. 251, 15–23.

Moro, A., Librán, C.M., Berruga, M.I., Carmona, M., Zalacain, A., 2015. Dairy matrix effect on the transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making. Sci. Food Agric. 95, 1507–1513.

Mousavi, M., Heshmati, A., Garmakhany, A.D., Vahidinia, A., Taheri, M., 2019. Optimization of the viability of *Lactobacillus acidophilus* and physico-chemical, textural and sensorial characteristics of flaxseed-enriched stirred probiotic yogurt by using response surface methodology. LWT - Food Sci. Technol. 102, 80–88.

Olmedo, R.H., Nepote, V., Grosso, N.R., 2013. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. LWT - Food Sci. Technol. 53, 409–417.

Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P., 2007. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. Int. Dairy J. 17, 67–78.

Pei, R. S., Zhou, F., Ji, B. P., Xu, J., 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. J. Food Sci., 74, 379-383.

Sarkar, S., Sur, A., Sarkar, K., Majhi, R., Basu, S., Chatterjee, K., Sikder, B., 2016. Probiotics: a way of value addition in functional food. Int. J. Food Sci. Nutr. Diet. 1, 290–293.

Sakkas, H., Papadopoulou, C., 2017. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. J. Microbiol. Biotechnol. 27, 429–438.

Sant'Ana, A. M.S., Bezerril, F.F., Madruga, M.S., Batista, a S.M., Magnani, M., Souza, E.L.,

Queiroga, R.C.R.E., 2013. Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. J. Dairy Sci. 96, 7442–7453.

Santiesteban-López, A., Palou, E., López-Malo, A., 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected awand pH. J. Appl. Microbiol. 102, 486–497. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03092.x

Souza, G.T., de Carvalho, R.J., de Sousa, J.P., Tavares, J.F., Schaffner, D., de Souza, E.L., Magnani, M., 2016. Effects of the Essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semihard cheese broth and slurry. J. Food Prot. 79, 246–252.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett. Food Microbiol. 26, 118–122.

Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A., 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian Fresco cheese. J. Dairy Sci. 83, 1905–1911.

Zeppa, G., Conterno, L., Gerbi, V., 2001. Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chemistry, 6, 2722-2726.

Zuo, G.Y., Yang, C.X., Han, J., Li, Y.Q., Wang, G.C., 2018. Synergism of prenylflavonoids from *Morus alba* root bark against clinical MRSA isolates. Phytomedicine 39, 93–99.

Table 1. Terpenes of *Origanum vulgare* L. (0.07 µL/mL) and *Rosmarinus officinalis* L. (2.65 µL/mL) detected in Minas cheese with *L. acidophilus* LA-5 during 21 days of refrigerated storage.

Terpene[A]	**IR**[B]	**Days of storage**							
		0	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**	**18**	**21**
α-pinene	929	111^{a}	36.4^{b}	35.5^{b}	31.2^{b}	22.6^{c}	16.7^{c}	13.5^{c}	12.9^{c}
β-pinene	979	65.1^{a}	26.1^{b}	24.9^{b}	19.4^{bc}	15.2^{c}	12.9^{c}	9.74^{cd}	9.66^{cd}
myrcene	991	23.2^{a}	12.1^{b}	12^{b}	8.77^{b}	7.49^{b}	6.26^{b}	0.02^{c}	0.01^{c}
ρ-cymene	1022	25.6^{a}	24.5^{a}	21.8^{a}	17.1^{ab}	14.5^{b}	14.3^{b}	10^{b}	8.3^{b}
Eucalyptol	1090	1032^{a}	826^{b}	538^{c}	533^{c}	494^{d}	469^{d}	421^{e}	347^{f}
Camphor	1147	329^{a}	257^{b}	187^{c}	148^{d}	146^{d}	128^{e}	125^{e}	106^{f}
α-ocimene	1047	22.5^{a}	21^{a}	20^{a}	11.9^{b}	8.65^{b}	7.94^{b}	7.76^{b}	5.17^{c}
Isoborneol	1157	15.6^{a}	13.7^{ab}	8.78^{b}	7.35^{bc}	6.49^{c}	6.04^{c}	5.39^{d}	4.67^{d}
α-terpinenol	1189	18.5^{a}	18.2^{a}	15.4^{b}	8.34^{c}	8.29^{c}	6.01^{d}	5.76^{d}	3.79^{e}
Caryophyllene	1419	64.2^{a}	56.8^{ab}	50.7^{b}	37.7^{c}	34.6^{c}	15.4^{d}	8.3^{e}	7.24^{e}
Camphene	952	24.2^{a}	10.5^{b}	8.76^{bc}	7.28^{c}	6.34^{c}	3.82^{d}	T	T

Thymol	1298	6.81	T	T	T	T	T	T	T
cis-ocimene	1038	8.94	T	T	T	T	T	T	T
Carvacrol	1301	T[D]	Nd[E]	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

[A]Terpenes identified in each essential oil are expressed as the area units (AU x 10^5); [B]Retention index; [e-f]probability by ANOVA of a difference among means, based on Tukey test; [D]Traces; [E]Not detected.

Table 2. Correlation matrix of terpenes detected in Minas cheese with *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils over the 21 days of refrigerated storage with the counts of *E. coli* O157:H7 in log scale.

Variables*	Log counts	α-pinene	β-pinene	myrcene	ρ-cymene	Eucalyptol	Camphor	α-ocimene	Isoborneol	α-terpinenol	Caryophyllene	Camphene
Log counts	1											
α-pinene	0.89*	1										
β-pinene	0.90*	1*	1									
myrcene	0.95*	0.92*	0.94*	1								
ρ-cymene	0.87*	0.75*	0.79*	0.92*	1							
Eucalyptol	0.89*	0.90*	0.92*	0.92*	0.89*	1						
Camphor	0.89*	0.91*	0.93*	0.93*	0.90*	0.99*	1					
α-ocimene	0.82*	0.75*	0.79*	0.89*	0.97*	0.86*	0.91*	1				
Isoborneol	0.86*	0.85*	0.88*	0.90*	0.92*	0.99*	0.99*	0.92*	1			
α-terpinenol	0.82*	0.74*	0.79*	0.88*	0.97*	0.89*	0.93*	0.99*	0.94*	1		
Caryophyllene	0.90*	0.76*	0.79*	0.92*	0.97*	0.86*	0.89*	0.95*	0.90*	0.95*	1	
Camphene	0.95*	0.99*	1*	0.99*	0.79*	0.93*	0.94*	0.75*	0.88*	0.75*	0.80*	1

*Significant at $p \leq 0.01$.

Table 3. Values (n=3, mean values ± standard deviation) of technological and physiochemical parameters of Minas cheese with or without *Origanum vulgare* L. (OVEO; 0.07 μL/g) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO; 2.65 μL/g) during 21 days of refrigerated storage.

Parameters	**Days of storage**	**CT***	**CO****
a_w	**0**	**0.99**	**0.99**
Yield (g/L)	**0**	53.6 (±0.30)^{A}	53.7 (±0.20)^{A}
Syneresis (g/Kg)	0	7.99 (±0.30) ^{Ad}	8.10 (±0.90)^{Ad}
	7	15.42 (±0.17) ^{Ac}	15.10 (±0.62)^{Ac}
	14	23.91 (±0.78) ^{Ab}	24.11(±0.11)^{Ab}
	21	26.02 (±0.90) ^{Aa}	25.93 (±0.41)^{Aa}
Moisture (g/100 g)	0	66.56 (±0.33) ^{Aa}	66.69 (±0.92)^{Aa}
	7	65.05 (±0.48)^{Ab}	65.17 (±1.04)^{Aab}
	14	64.72 (±0.39)^{Ab}	64.99 (±0.46)^{Ab}
	21	62.04 (±0.09)^{Ac}	62.36 (±0.23)^{Ac}
Ash (g/100 g)	0	2.47 (±0.39)^{Ab}	2.41 (±0.21)^{Ac}
	7	2.61 (±0.28)^{Ab}	2.65 (±0.19)^{Abc}
	14	2.69 (±0.05)^{Ab}	2.71 (±0.48)^{Ab}
	21	2.79 (±0.80)^{Aa}	2.80 (±0.36)^{Aa}
Total proteins (g/100 g)	0	13.12 (±0.13)^{Ad}	13.31 (±0.24)^{Ad}
	7	13.86 (±0.08)^{Ac}	13.65 (±0.11)^{Ac}
	14	13.94 (±0.05)^{Ab}	13.85 (±0.13)^{Ab}
	21	14.05 (±0.02)^{Aa}	14.31 (±0.14)^{Aa}
Lipids (g/100 g)	0	19.44 (±0.44)^{Bc}	20.27 (±0.31)^{Ab}
	7	20.02 (±0.03)^{Bb}	20.86 (±0.02)^{Aab}
	14	21.31 (±0.05)^{Aa}	20.94 (±0.03)^{Aa}
	21	21.02 (±0.02)^{Aa}	20.98 (±0.03)^{Aa}
pH	0	6.69 (±0.03) ^{Ba}	6.84 (±0.10)^{Aa}
	7	6.40 (±0.04)^{Bb}	6.76 (±0.05)^{Aa}
	14	6.16 (±0.02)^{Bc}	6.49 (±0.05)^{Ab}
	21	6.05 (±0.03)^{Ad}	6.05 (± 0.06)^{Ac}
Titratable acidity (g/100 g)	0	0.44 (±0.02)^{Ac}	0.37 (±0.02)^{Bc}
	7	0.49 (±0.02)^{Ab}	0.45 (±0.02)^{Bb}
	14	0.57 (±0.01)^{Aa}	0.48 (±0.03)^{Bb}
	21	0.65 (±0.01)^{Aa}	0.63 (±0.01)^{Aa}
Sugar (g/100 g)			
Lactose	0	2.85 (±0.02)^{Ba}	3.42 (±0.01)^{Aa}
	7	2.76 (±0.06)^{Bb}	2.89 (±0.01)^{Ab}
	14	2.68 (±0.07)^{Bc}	2.73 (±0.03)^{Ac}
	21	2.37 (±0.14)^{Ad}	2.27 (±0.28)^{Ad}
Galactose	0	0.06 (±0.01)^{Ad}	0.01 (±0.01)^{Bc}
	7	0.17 (±0.02)^{Ac}	0.02 (±0.01)^{Bc}
	14	0.25 (±0.01)^{Ab}	0.18 (±0.01)^{Bb}
	21	0.47 (±0.01)^{Aa}	0.43 (±0.02)^{Aa}
Glucose	0	0.05 (±0.01)^{Ad}	0.01 (±0.01)^{Bc}

	7	0.82 (±0.08)^{Ac}	0.03 (±0.01)^{Bc}
	14	1.90 (±0.19)^{Ab}	0.18 (±0.02)^{Bb}
	21	2.61 (±0.26)^{Aa}	2.52 (±0.25)^{Aa}
Organic acids (g/100 g)			
Latic acid	0	0.54 (±0.01)^{Ad}	0.51 (±0.01)^{Bc}
	7	0.76 (±0.03)^{Ac}	0.58 (±0.08)^{Bc}
	14	0.85 (±0.02)^{Ab}	0.78 (±0.02)^{Bb}
	21	0.94 (±0.04)^{Aa}	0.93 (±0.01)^{Aa}
Acetic acid	0	0.11 (±0.03)^{Ac}	0.10 (±0.01)^{Bd}
	7	0.12 (±0.01)^{Ab}	0.10 (±0.01)^{Bc}
	14	0.14 (±0.05)^{Ab}	0.13 (±0.03)^{Ab}
	21	0.15 (±0.02)^{Aa}	0.15 (±0.02)^{Aa}
Citric acid	0	0.19 (±0.02)^{Aa}	0.11 (±0.01)^{Ba}
	7	0.05 (±0.01)^{Ab}	0.09 (±0.01)^{Aa}
	14	0.02 (±0.01)^{Ac}	0.02 (±0.00)^{Ab}
	21	0.01 (±0.00)^{Ad}	0.01 (±0.00)^{Ac}
Succinic acid	0	0.45 (±0.01)^{Ac}	0.49 (±0.01)^{Ad}
	7	0.52 (±0.01)^{Bb}	0.83 (±0.01)^{Ab}
	14	0.54 (±0.01)^{Bb}	0.93 (±0.01)^{Aa}
	21	0.61 (±0.00)^{Aa}	0.66 (±0.02)^{Ac}

*CT: fresh cheese without addition of OVEO and ROEO; **CO: fresh cheese with combined addition of OVEO and ROEO
A – B: for each tested parameter, different superscript capital letters in the same row denote differences ($p < 0.05$) between different treatments, based on Students' t-test.
a – d: for each tested parameter, different superscript lowercase letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) within the same treatment during storage, based on Tukey's test.

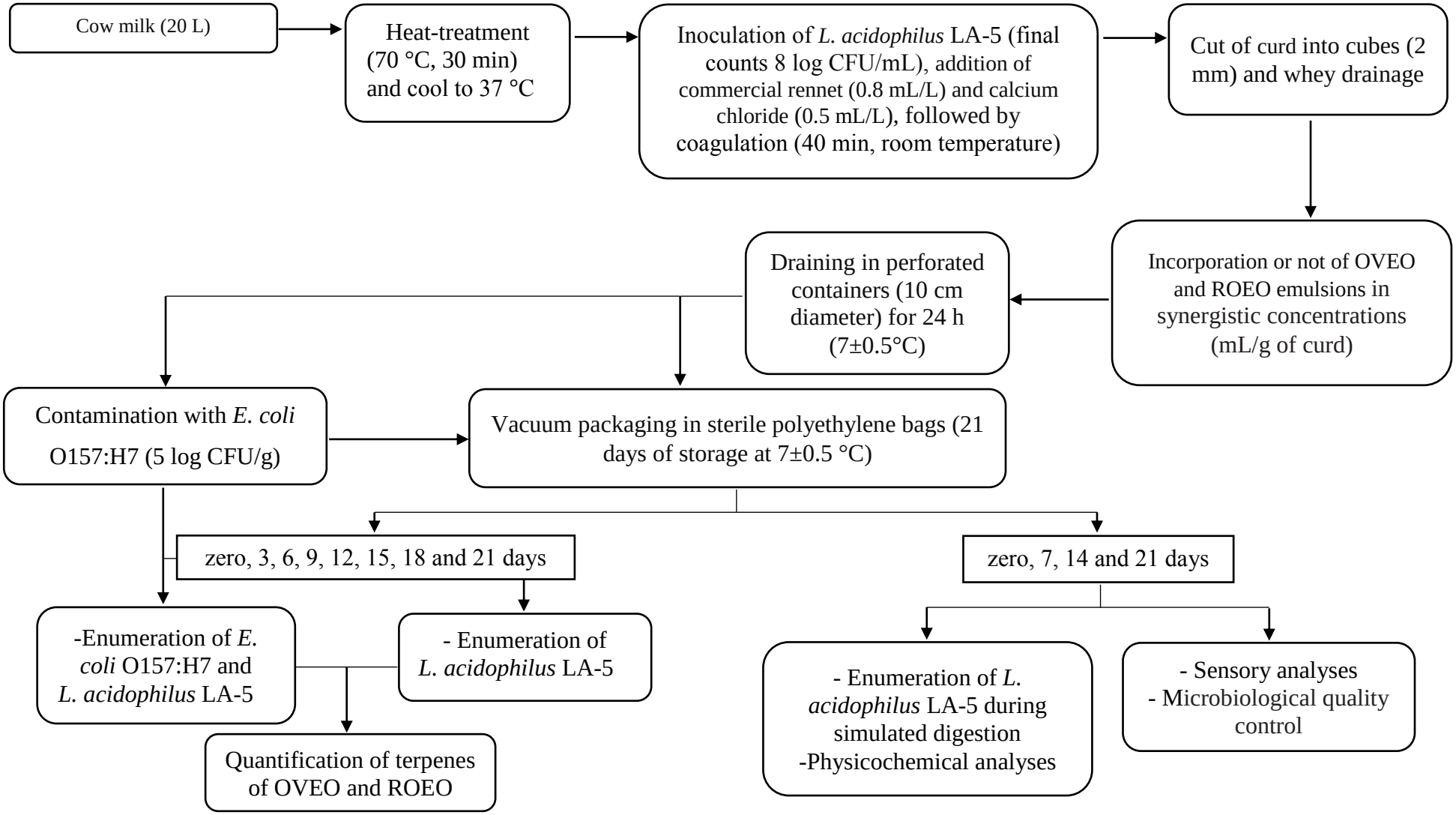

Figure 1. Flowchart of the processes for the production of Minas cheese with or without *Origanum vulgare* L. (OVEO; 0.07 μL/g) and *Rosmarinus officinalis* L. (ROEO; 2.65 μL/g).

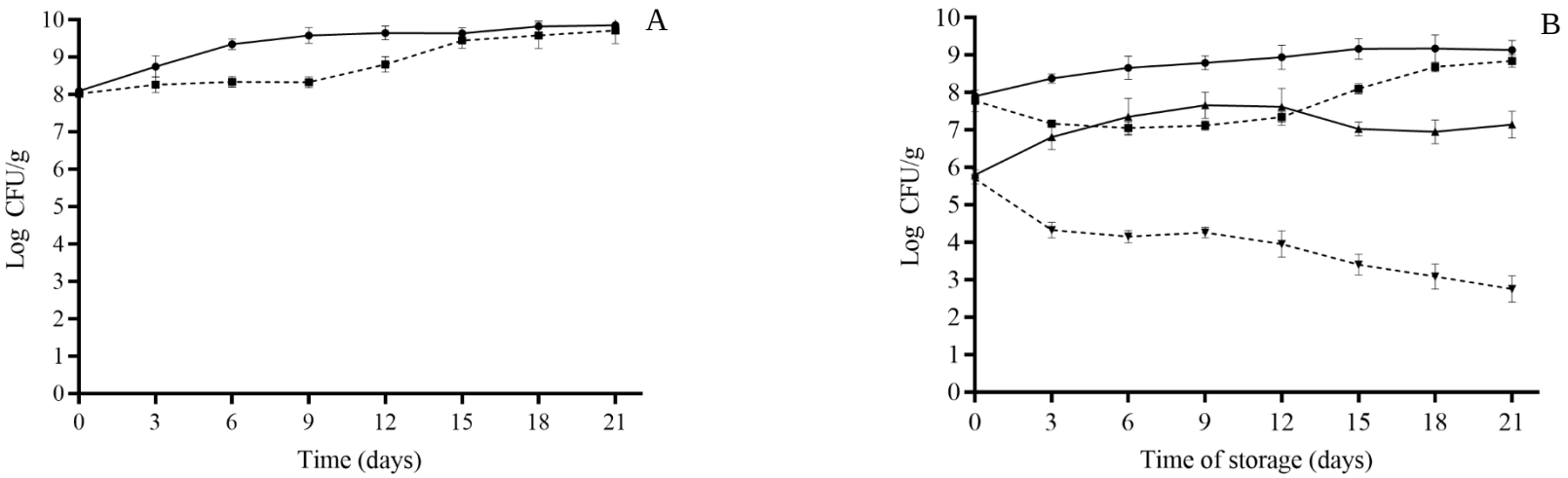

Figure 2. (A) Viable counts of *L. acidophilus* LA-5 and B n Minas cheese stored at 7 ± 0.5 °C as function of OVEO and ROEO combined concentrations: (●) control: 0 µL/g; (■): 0.07 µL/g + 2.65 µl/g (OVEO and ROEO, respectively). (B) Viable cell counts of *L. acidophilus* LA-5 and *E. coli* O157:H7 in cheese stored at 7 ± 0.5 °C as function of OVEO-ROEO combined: *L. acidophilus* LA-5 (●): 0 µL/g; (■): 0.07 µL/g + 2.65 µL/g (OVEO and ROEO, respectively); *E. coli* O157:H7 (▲): 0 µL/g; (▼): 0.07 µL/g + 2.65 µL/g (OVEO and ROEO, respectively). The error bars in the figures indicate the standard deviations of the average of three independent experiments.

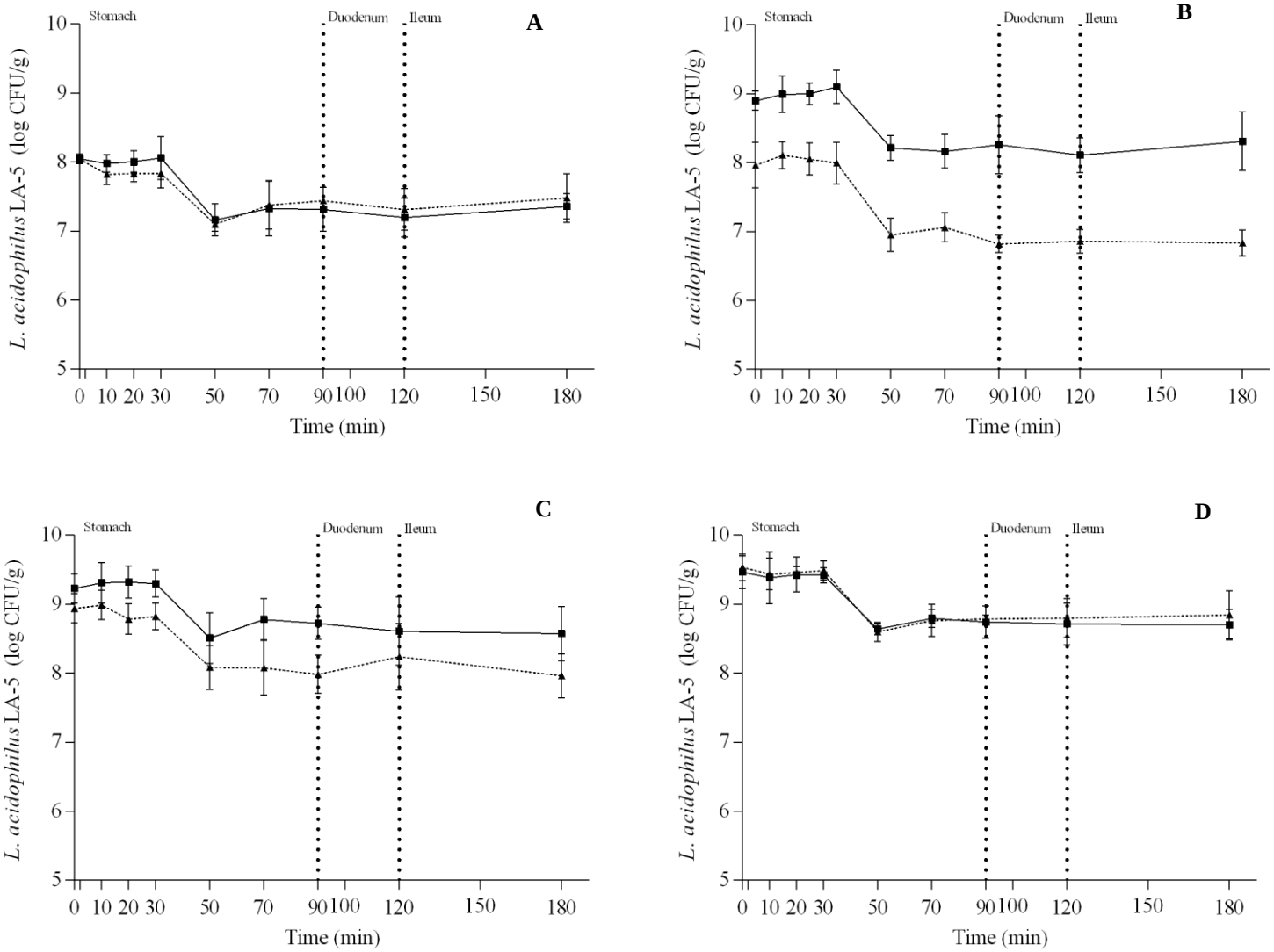

Figure 3. Survival (log CFU/g) of *L. acidophilus* LA-5 in Minas cheese with (▲) or without OVEO (0.07 μL/g) and ROEO (2.65 μL/g) (■) during exposure to simulated gastrointestinal conditions after day zero(A), 7 (B), 14 (C) and 21 (D) of refrigerate storage. The error bars represent the standard derivations.

Supplementary Table 1. The conditions used during each step of the simulated gastrointestinal.

Steps	Compartment	Conditions	pH*	Stirring (rpm)	Time of exposure (min)
Before exposure	-	-	-	-	-
1	Esophagus - Stomach	Pepsin	5.5	130	10
2			4.6	130	10
3			3.8	130	10
4			2.8	130	20
5			2.3	130	20
6			2.0	130	20
7	Duodenum	Pancreatin/bovine bile salts	5.0	45	30
8	Ileum		6.5	45	60

*The pH of each step was adjusted to the target value using 1 M HCl solution (Step 1 to 6) 0.1 M $NaHCO_3$ solution (Steps 7 and 8)

Supplementary Table 2. Results of the checkerboard assay for combined concentration of *Origanun vulgare* L. (OVEO) and *Rosmarinus officinalis* L. essential oil (ROEO) against *L. acidophilus* LA-5.

OVEO/ROEO	OVEO μg/mL	ROEO μg/mL	FICI*	Interaction
-/MIC	0	10.6	-	-
MIC/2 + MIC/2	0.3	5.3	1	-
MIC/4 + MIC/2	0.15	5.3	0.8	Additive
MIC/8 + MIC/4	0.07	2.65	0.4	Synergism
MIC/-	0.6	0	-	-

*FICI: Fractional Inhibitory Concentration Index;

Supplementary Table 3. Parameters of sensory acceptability and purchase intention (n:100, mean values, ± standard deviation) of Minas cheese with or without OVEO (0.07 μL/g) and ROEO (2.65 μL/g) on day zero, 7, 14 and 21 of refrigerated storage.

Attributes	**Days of storage**	**Cheeses**	
		CT*	**CO****
Color	1	8 (±0.18)[a]	8 (±0.33)[a]
	7	8 (±0.15)[a]	8 (±0.33)[a]
	14	8 (±0.12)[a]	8 (±0.61)[a]
	21	8 (±0.04)[a]	8 (±0.11)[a]
Appearance	1	8 (±0.23)[a]	7 (±0.11)[a]
	7	8 (±0.18)[a]	7 (±0.04)[a]
	14	8 (±0.12)[a]	7 (±0.22)[a]
	21	8 (±0.09)[a]	8 (±0.76)[a]
Aroma	1	8 (±0.25)[a]	5 (±0.58)[b]
	7	7 (±0.47)[b]	6.5 (±0.98)[a]
	14	7 (±0.41)[b]	7 (±0.71)[a]
	21	7 (±0.23)[b]	7 (±0.66)[a]
Flavor	1	7 (±0.30)[a]	4 (±0.17)[c]
	7	7 (±0.33)[a]	6 (±0.16)[b]
	14	7 (±0.42)[a]	7 (±0.19)[a]
	21	7 (±0.19)[a]	7 (±0.60)[a]
Texture	1	8 (±0.58)[a]	7 (±0.46)[a]
	7	7 (±0.52)[a]	7 (±0.46)[a]
	14	7 (±0.61)[b]	7 (±0.72)[a]
	21	7.5 (±0.43)[a]	7 (±0.22)[a]
Overall impression	1	8 (±0.28)[a]	5 (±0.46)[b]
	7	8 (±0.20)[a]	6.5 (±0.61)[a]
	14	8 (±0.23)[a]	7 (±0.69)[a]
	21	8 (±0.15)[a]	7 (±0.63)[a]
Purchase intetion	1	4 (±0.80)[a]	3 (±0.33)[b]
	7	4 (±0.69)[a]	3 (±0.28)[b]
	14	4 (±0.65)[a]	4 (±0.39)[a]
	21	4 (±0.61)[a]	4 (±0.45)[a]

*CT: fresh cheese without OVEO and ROEO combined; **CO: fresh cheese with OVEO and ROEO combined
a – b: different superscript lowercase letters in the same column denote differences ($p \leq 0.05$) by Tukey test.

APÊNDICE C - Questionário de recrutamento e seleção do painel treinado.

Prezado participante, convido você a responder este questionário cujo objetivo de sua aplicação é recrutar pessoas que possua interesse e disponibilidade de tempo em participar de sensações de análise sensorial de queijo adicionado de óleo essencial.

Nome:_____Telefones:_____

E-mail:_____

Perguntas:

1. **Faixa etária:**
   ( ) 21-30 ( ) 31-40 ( ) 41-50 ( ) 51-60 ( ) acima de 61
2. **Gênero:**
   ( ) Feminino ( ) Masculino
3. **Grau de escolaridade:**
   ( ) Ensino Fundamental ( ) Ensino Médio
   ( ) Ensino Superior ( ) Pós-Graduação
4. **Você é fumante?**
   ( ) Sim ( ) Não
5. **Apresenta alguma alergia ou intolerância relacionada a alimentos? Se sim, qual?**
   ( ) Não ( ) Sim. _____
6. **Você consome queijo? Se sim, qual tipo de queijo?**
   ( ) Não ( ) Sim. Tipo de queijo consumido:_____
7. **Com que frequência você consome?**
   ( ) todos os dias ( ) 2 a 3 vezes por semana ( ) 1 vez por semana ( )Não consumo
   ( ) 1 a 2 vezes por mês ( ) menos de 1 vez por mês ( )Ocasionalmente
8. **De que forma você consome queijo?**
   ( ) Natural sem acompanhamento ( ) Em conjunto com outros alimentos
   ( ) Adicionado em algumas preparações
9. **Qual atributo você mais aprecia em queijo?**
   ( ) Sabor ( ) Aroma ( ) Textura ( ) Acidez
10. **Você já consumiu queijo fresco?**
    ( ) Sim ( ) Não
11. **Você toma alguma medicação que afete seus sentidos, especialmente o paladar e o olfato? Se positivo, qual sentido?_____**
12. **Cite um alimento que você considera:**
    Ácido_____
    Pouco ácido _____

Desde já agradeço sua participação!

APÊNDICE D - Fichas de Teste Threshold de Reconhecimento.

RECONHECIMENTO DE AROMA

Nome:_____Data___/___/___

Os frascos cobertos contêm substâncias aromáticas. Aproxime o frasco de seu nariz tire a tampa cheire 3 vezes brevemente e tente identificar o aroma. Se não lhe vier a memória o nome exato da substância tente descobrir alguma coisa com a qual você associe esse aroma.

Código	**Aroma de:**

Obrigado por sua colaboração!

FICHA DE RECONHECIMENTO DE SABORES BÁSICOS E INTENSIDADE

Nome:_____Data: ____/____/_____

Você está recebendo uma série de amostras apresentando os sabores básicos: doce, salgado, amargo, ácido e umami. Prove cada solução na ordem em que estão apresentadas. Descreva o gosto percebido, registrando a intensidade do sabor no quadro abaixo. Enxágue a boca após cada avaliação e aguarde alguns segundos para provar a próxima solução.

Código	**Gosto**	**Fraco**	**Médio**	**Forte**

Obrigado por sua colaboração!

APÊNDICE E – Termos de consentimento livre e esclarecido.

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), do estudo intitulado EFEITOS DA ADIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE ASPECTOS DE QUALIDADE DE QUEIJO DE BAIXA MATURAÇÃO, conduzida por Helena Taina Diniz Silva. Este estudo tem por objetivo investigar os efeitos da adição de óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. sobre atributos sensoriais e outros aspectos de qualidade de queijo de baixa maturação.

Você foi selecionado(a) por apresentar idade de consumo do produto foco desta pesquisa. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa, desistência ou retirada de consentimento não acarretará prejuízo.

Esta pesquisa pode representar riscos aos portadores de intolerância à lactose ou alergia à proteína do leite. A participação nesta pesquisa não é remunerada nem implicará em gastos para os participantes.

Sua participação nesta pesquisa consistirá na composição de um painel treinado para avaliação dos atributos sensoriais de queijo de baixa maturação adicionado de óleos essenciais, realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição, situado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Os dados obtidos por meio desta pesquisa serão confidenciais e não serão divulgados em nível individual, visando assegurar o sigilo de sua participação.

O pesquisador responsável se compromete a tornar públicos nos meios acadêmicos e científicos os resultados obtidos de forma consolidada sem qualquer identificação de indivíduos participantes.

Caso você concorde em participar desta pesquisa, assine ao final deste documento, que possui duas vias, sendo uma delas sua, e a outra, do pesquisador responsável/coordenador da pesquisa. Seguem os telefones e o endereço institucional do pesquisador responsável e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, onde você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação nele, agora ou a qualquer momento.

Contatos do pesquisador responsável: Helena Taina Diniz Silva, discente do Doutorado em Ciências da Nutrição(PPGCN/UFPB), R. Tab. José Ramalho Leite, nº 1233, Cabo Branco, helena_gba@hotmail.com, (83) 98818-5951.

Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da UFPB: Centro de Ciências da Saúde - 1º andar/ Campus I / Cidade Universitária CEP: 58.051-900 - João Pessoa-PB Tel. (83) 3216 7791 email: eticaccsufpb@hotmail.com

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa, e que concordo em participar.

João Pessoa, ____ de _____ de _____.

Assinatura do(a) pesquisador(a): _____

Assinatura do(a) participante:_____

Rubrica do participante Rubrica do pesquisador

APÊNDICE F - Ficha de Análise Descritiva Quantitativa não estruturada

Nome: _____ **Data:** ____/____/____

Instruções: Você está recebendo uma amostra de queijo fresco bovino, marque nas escalas abaixo o que você achou da intensidade dos seguintes atributos:

Amostra: _____

Cor branca
fraca — forte

Aparência úmida
fraca — forte

AROMA

Característico de queijo
fraca — forte

Óleo essencial
nenhum — forte

Refrescante
nenhum — forte

TEXTURA

Maciez
fraca — forte

Coesividade
fraca — forte

Mastigbilidade
fraca — forte

SABOR

Queijo fresco
fraca — forte

Acidez
nenhum — forte

Gosto salgado
fraca — forte

Óleo essencial
nenhum — forte

Obrigada pela sua participação!

APÊNDICE G – Fichas de Teste Afetivo: Aceitação e intenção de compra.

TESTE DE ACEITABILIDADE E INTENÇÃO DE COMPRA

Nome:_____Data:___/___/___

ACEITABILIDADE

Instruções: Você está recebendo uma amostra de queijo probiótico com adição de óleos essenciais de orégano e alecrim. Por favor, avalie a amostra utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou de cada atributo do produto. Anote o código da amostra e a pontuação da escala que melhor reflita seu julgamento.

1- Desgostei muitíssimo
2- Desgostei muito
3- Desgostei moderadamente
4- Desgostei ligeiramente
5- Indiferente
6- Gostei ligeiramente
7- Gostei moderadamente
8- Gostei muito
9- Gostei muitíssimo

ATRIBUTO	CÓDIGO	
Cor		
Aparência		
Aroma		
Sabor		
Textura		
Impressão Global		

INTENÇÃO DE COMPRA

Instruções: Após ter avaliado o queijo probiótico com adição de óleos essenciais de orégano e alecrim, indique na escala abaixo o grau de certeza no qual você estaria disposto a comprar este produto, se o encontrasse à venda:

1- Certamente não compraria
2- Provavelmente não compraria
3- Talvez comprasse, talvez não comprasse
4- Provavelmente compraria
5- Certamente compraria

AMOSTRAS	

Justifique sua avaliação e intenção de compra dizendo:

O que mais gostou no queijo probiótico com adição de óleos essenciais:

_____

_____

E o que menos gostou:

_____

_____

ANEXOS

ANEXO A - Parecer consubstanciado do Conselho de Ética em Pesquisa

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DA ADIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE Origanum vulgare L. E DE Rosmarinus officinalis L. SOBRE ASPECTOS DE QUALIDADE DE QUEIJO DE BAIXA MATURAÇÃO

Pesquisador: HELENA TAINA DINIZ SILVA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 67379617.1.0000.5188

Instituição Proponente: Universidade Federal da Paraíba

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.237.937

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa intitulado " EFEITOS DA ADIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE Origanum vulgare L. E DE Rosmarinus officinalis L. SOBRE ASPECTOS DE QUALIDADE DE QUEIJO DE BAIXA MATURAÇÃO" da pesquisadora HELENA TAINA DINIZ SILVA.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Principal:

Avaliar os efeitos da adição de óleos essenciais de Oriagnum vulagare L. e de Rosmarinus officinalis L. isolados ou em combinação sobre aspectos de qualidade de queijo de baixa maturação.

Objetivo Específico:

Verificar a influência da aplicação dos OEs, sobre aspectos de qualidade do queijo ao longo do armazenamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** eticaccsufpb@hotmail.com

-Indivíduos que apresentem intolerância a lactose podem apresentar reações adversar após consumo do queijo;

-Indivíduos que apresentem alergia à proteína do leite podem apresentar reações adversas após o consumo do queijo.

Benefícios:

A inserção do OEOV e OERO em matrizes alimentares de alto consumo, como queijos frescos, representa alternativas para a indústria de queijos destinados ao consumo interno e/ou externo, contribuindo no incremento do agronegócio na região Nordeste, em consonância ao atendimento das exigências dos consumidores por alimentos seguros, porém nutritivos, contendo baixos níveis ou ausência de conservantes sintéticos e possuidores de longa vida de prateleira.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto na área de microbiologia dos alimentos, tendo em sua metodologia realizar análise Sensorial,envolvendo seres humanos.

Os provadores passarão por uma pré-seleção e seleção a partir de testes de avaliação (sabores básicos e aroma) usando como critério de inclusão acerto mínimo de 80%. A seleção partirá de 24 voluntários, ao final dos testes preliminares serão selecionados no mínimo 14 painelistas que demonstrarem capacidade depercepção requerida. Seguido de treinamento como descrito por Ellendersen e Wosiacki (2010).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto em tela se encontra de acordo com as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que rege as pesquisas envolvendo seres humanos.

Recomendações:

Recomenda-se manter a metodologia proposta.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto se encontra sem nenhuma pendência sendo então aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Continuação do Parecer: 2.237.937

Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_895673.pdf	28/07/2017 11:22:43		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Laticas.docx	28/07/2017 11:21:17	HELENA TAINA DINIZ SILVA	Aceito
Outros	Certidao.pdf	14/07/2017 10:08:18	HELENA TAINA DINIZ SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declacao.pdf	13/07/2017 10:43:18	HELENA TAINA DINIZ SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	13/07/2017 10:28:24	HELENA TAINA DINIZ SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	11/04/2017 13:09:12	HELENA TAINA DINIZ SILVA	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

JOAO PESSOA, 24 de Agosto de 2017

Assinado por:
Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador)

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** eticaccsufpb@hotmail.com

ANEXO B - Comprovante de depósito de patente de inovação ao INOVA-UFPB/INPI

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

06/12/2018 870180159621 17:32

29409161812020405

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 075330 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social:	UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
Tipo de Pessoa:	Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ:	24098477000110
Nacionalidade:	Brasileira
Qualificação Jurídica:	Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço:	Cidade Universitária
Cidade:	João Pessoa
Estado:	PB
CEP:	58059-900
País:	Brasil
Telefone:	(83) 32167558
Fax:	
Email:	inova@reitoria.ufpb.br