



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

GEANY TARGINO DE SOUZA

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. SOBRE O
CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PATOGENICAS E TECNOLÓGICAS EM
QUEIJO DE COALHO**

JOÃO PESSOA - PB

2015

GEANY TARGINO DE SOUZA

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. SOBRE O
CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E TECNOLÓGICAS EM
QUEIJO DE COALHO**

JOÃO PESSOA - PB

2015

GEANY TARGINO DE SOUZA

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. SOBRE O
CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E TECNOLÓGICAS EM
QUEIJO DE COALHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marciane Magnani

JOÃO PESSOA - PB

2015

GEANY TARGINO DE SOUZA

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. SOBRE O
CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E TECNOLÓGICAS EM
QUEIJO DE COALHO**

Dissertação APROVADA em 09/03/2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marciane Magnani - CT/UFPB
Orientadora

Profa. Dra. Juliana Kessia Barbosa Soares - UAS/UFCG
Examinador Interno

Profa. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford - DMT/UFPE
Examinador Externo

JOÃO PESSOA - PB

2015

*Ao meu maravilhoso **Deus**,
Por todas as vitórias alcançadas e
por tudo que representa em minha vida.*

*A melhor mãe do mundo: **Maria Goretti**,
Exemplo de amor, força e fé.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por Seu misericordioso amor, pelas vitórias alcançadas, por me dar força e coragem nos momentos de dificuldades e por ser o Maior Mestre. A Ti Senhor toda honra e toda glória!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, pelo apoio a educação e a ciência.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), na pessoa da coordenadora professora PhD. Marta Suely Madruga, pelo suporte, estrutura e incentivo à pesquisa.

Ao corpo docente do PPGCTA pelos ensinamentos essenciais e, a seus funcionários pela disponibilidade e gentileza.

À professora Dra. Marciane Magnani, por sua orientação e ensinamentos, pelo exemplo de profissional responsável, dedicada e compromissada, pela disponibilidade, amizade, confiança e momentos compartilhados.

Ao professor Dr. Evandro Leite de Souza, por seus valiosos ensinamentos e contribuições, pela disponibilidade, apoio e suporte fornecido durante a realização deste trabalho.

À professora Dra. Janneyre Ferreira Maciel, por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro de Tecnologia (CT) - UFPB, para a realização de algumas análises deste trabalho.

À professora Dra. Maria Lúcia da Conceição, fonte de sabedoria, humildade e gentileza. Obrigada pela amizade e recepção no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro de Ciências da Saúde (CCS) - UFPB.

As professoras Dra. Juliana Kessia Barbosa Soares e Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford, membros da banca examinadora, pelas valiosas contribuições e disponibilidade.

Ao meu pai, Edvaldo Souza (*in memoriam*) por ter me ensinado a sempre acreditar e lutar pelos meus objetivos, por todos os anos vividos nos quais compartilhamos muito amor, respeito e carinho. Hoje apesar da ausência física, sinto-me muito feliz por estar realizando um sonho em comum.

À minha mãe, Maria Goretti Targino, o meu maior tesouro, por ser exemplo de amor, força e fé, por muitas vezes abrir mão dos seus desejos para realizar os meus, por entender a minha ausência pois sei que não é fácil, por todo incentivo, cuidado e orações.

À minha irmã, Neyrijane Targino, pelo carinho, amizade e companheirismo, por sempre me apoiar e tranquilizar nos momentos de dificuldades e por me auxiliar sempre que precisei nas análises deste trabalho.

Ao meu namorado, Lúcio Pedrosa, por seu amor, amizade e compreensão, pelas palavras de incentivo, por sempre estar ao meu lado torcendo pelas minhas conquistas e comemorando a cada etapa vencida.

À minha família, por todo amor, carinho, apoio e dedicação, por sempre torcer pelo meu sucesso.

À Rayssa Carvalho, amiga de todas as horas, companheira desde a graduação, por sua amizade, lealdade e cumplicidade, por dividir todo o trabalho durante os experimentos e pelos momentos vividos e compartilhados.

Às minhas amigas Carine Maciel, Narciza Arcanjo, Renata Maynart e Taliana Bezerra, pela amizade, torcida, conselhos e palavras de encorajamento.

Aos amigos Danilo Xavier, Estefânia Garcia, Jossana Sousa e Nelson Justino pelos conhecimentos compartilhados, apoio e amizade.

Ao Padre Edvaldo Lima e Diácono Lyconl Medeiros, a todos os meus amigos e aos irmãos do Encontro de Jovens com Cristo (EJC), pela amizade, torcida e orações.

Aos colegas dos Laboratórios de Processamento Microbiano em Alimentos CT - UFPB e Microbiologia de Alimentos CCS - UFPB, Adassa Gama, Ana Júlia Athayde, Caroline Junqueira, Daniel Farias, Ingrid Dantas, Isabella Medeiros, Jessica Bezerra, Kataryna Árabe, Rafael Lima, Vanessa Gonçalves e aos demais que fazem parte desse grupo científico, pela amizade, ajuda e bons momentos de convívio.

Sendo impossível citar todos os nomes, agradeço a todos que, de alguma forma, cooperaram para realização deste trabalho e torceram pelo meu sucesso.

“Sei que o meu trabalho é uma gota no oceano.

Mas sem ele, o oceano seria menor.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O queijo de coalho é um queijo semiduro tipicamente produzido na região Nordeste do Brasil, obtido a partir de agentes enzimáticos coagulantes e/ou pelo uso de bactérias ácido lácticas. Algumas características físico-químicas deste produto, como baixa acidez, alta umidade e pH, podem favorecer a sobrevivência e/ou crescimento de bactérias patogênicas associados a surtos alimentares. Crescentes preocupações sobre a conservação de queijos, têm direcionado o desenvolvimento de técnicas de conservação a partir da utilização de ingredientes de origem natural, como óleos essenciais (OEs) para garantir a qualidade microbiológica deste produto. OE de *Origanum vulgare* L. (orégano - OEOV), possui efeito inibitório reconhecido contra diversas bactérias patogênicas associadas a queijos, no entanto, não existem informações sobre o seu efeito frente as bactérias ácido lácticas utilizadas como fermentos no processamento desse produto. Considerando estes aspectos, com o presente estudo objetivou-se avaliar os efeitos do OEOV sobre a viabilidade celular de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, bem como de cepas de *Lactococcus* spp. utilizadas no processamento de queijo de coalho. Estes efeitos foram medidos pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEOV em microdiluição em caldo, avaliação da viabilidade das cepas patogênicas e bactérias ácido lácticas em caldo base queijo contendo OEOV (0,60 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) a 37 °C por 24 h e em queijo de coalho semissólido (0,60 $\mu\text{L.g}^{-1}$, 1,25 $\mu\text{L.g}^{-1}$ e 2,5 $\mu\text{L.g}^{-1}$) a 10 °C ao longo de 72 h. Os constituintes majoritários do OEOV identificados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-MS), foram carvacrol (69,0%) e timol (14,12%). A CIM do OEOV foi de 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ frente *S. aureus* e *L. monocytogenes* e de 0,6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ frente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris* em co-cultura. Nos ensaios em caldo base queijo contendo OEOV a 0,60 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, não ocorreu redução na contagem de células viáveis das bactérias patogênicas. Enquanto que observou-se uma diminuição de 1,0 log UFC.mL⁻¹, nas contagens de células viáveis da co-cultura láctica em comparação ao inóculo inicial, após 24 h de exposição. O OEOV a 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ causou redução de até 2,0 log UFC.mL⁻¹ e 2,5 log UFC.mL⁻¹ para *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente. Nas mesmas concentrações, após um curto período de exposição o OEOV causou redução brusca na contagem de células viáveis da co-cultura láctica. Elevadas concentrações do OEOV foram requeridas para a redução na contagem de células viáveis de todas as bactérias no queijo de coalho semissólido comparado com o caldo base queijo. Ao longo dos tempos avaliados, as contagens de células viáveis de *Lactococcus* spp. no queijo de coalho contendo OEOV foram menores que as contagens de células viáveis de *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Os resultados sugerem que concentrações de OEOV usado para controlar bactérias patogênicas em queijo de coalho, devem ser cuidadosamente avaliadas, devido aos seus possíveis efeitos inibitórios sobre o crescimento e sobrevivência das bactérias ácido lácticas utilizadas no processamento deste produto.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, *Origanum vulgare* L., bactérias patogênicas, bactérias ácido lácticas, queijo de coalho.

ABSTRACT

Coalho cheese is a semi-hard cheese typically produced in the Northeast region of Brazil using an enzymatic coagulating agent and mesophilic lactic acid starter cultures. Some physicochemical characteristics of this product, such as low acidity, high moisture and pH, may favor the survival and growth of pathogenic bacteria frequently associated to food outbreaks. Increasing concerns about the safety of cheeses, have led to the development of alternative preservation techniques using naturally derived ingredients as essential oils (EOs) to ensure the microbiological quality of these products. EO from *Origanum vulgare* L. (oregano – OVEO) has recognized inhibitory effects against pathogenic bacteria associated to cheeses, however, there is a lack of information regarding the effects of OVEO toward lactic acid bacteria used as starter cultures in processing of these products. Considering these aspects, with the present study aimed to evaluate the effects of OVEO on the cell viabilities of strains *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, well as of strains *Lactococcus* spp. used in the processing of *coalho* cheese. These effects were measured by determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of OVEO in microdilution in broth and assessing the viability of pathogenic and starter strains in cheese based broth containing OVEO (0.60 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1.25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 2.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) at 37 °C, 24 h and in semi-solid *coalho* cheese (0.60 $\mu\text{L.g}^{-1}$, 1.25 $\mu\text{L.g}^{-1}$ e 2.5 $\mu\text{L.g}^{-1}$) at 10 °C during 72 h. The major constituents of OVEO, identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry GC-MS were carvacrol (69,0%) and thymol (14.12%). MIC of OVEO was 2.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ against both *S. aureus* and *L. monocytogenes* and 0.6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ against the tested starter co-culture. Assays in cheese-based broth containing OVEO at 0.6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ revealed no decrease in viable cell counts of both pathogenic bacteria, while the starter co-culture decreased 1.0 CFU.mL⁻¹ after 24 h of exposure compared with the initial viable counts. OVEO at 1.25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ and 2.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ caused reductions of up to 2.0 log CFU.mL⁻¹ and 2.5 log CFU.mL⁻¹ in *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively. At these same concentrations, OVEO severely affected the cell viability of the starter co-culture following a short period of exposure. Higher concentrations of OVEO were required to decrease the viable cell counts of all target bacteria in the semi-solid *coalho* cheese model compared to cheese-based broth. Over the assessed time points, viable cell counts of *Lactococcus* spp. in *coalho* cheese containing OVEO were lower than those of *S. aureus* and *L. monocytogenes*. These results suggest that the concentrations of OVEO used to control pathogenic bacteria in semi-hard cheese could be carefully evaluated because of their possible inhibitory effects on the growth and survival of starter lactic acid culture used during the production of this product.

Keywords: Antimicrobial activity, *Origanum vulgare* L., food pathogens, lactic yeast, *coalho* cheese.

LISTA DE FIGURAS

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1 - Esquema da microdiluição seriada realizada em microplaca de 96 poços para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente as cepas teste.....29

ARTIGO

Figure 1 - Viable cell counts of *S. aureus* (A), *L. monocytogenes* (B) and mesophilic starter co-culture (C) in *coalho* cheese based-broth at 37 °C as a function of the *Origanum vulgare* L. essential oil concentration: (●): 0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (○) 0.6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (▲): 1.25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (▽): 2.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (◆): 5.0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Detection limit of the test: 2.0 log CFU.mL⁻¹66

Figure 2 - Viable cell counts of *S. aureus* (A), *L. monocytogenes* (B) and *Lactococcus* spp. (C) in semi-solid *coalho* cheese model at 10 °C as a function of the *Origanum vulgare* L. essential oil concentration: (●): 0 $\mu\text{L.g}^{-1}$; (○) 0.6 $\mu\text{L.g}^{-1}$; (▲): 1.25 $\mu\text{L.g}^{-1}$; (▽): 2.5 $\mu\text{L.g}^{-1}$. Detection limit of the test: 2.0 log CFU.g⁻¹ 67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos que relatam a eficácia antimicrobiana do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. frente <i>S. aureus</i> e <i>L. monocytogenes</i>	25
---	----

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1 - Análises microbiológicas do queijo de coalho	29
Tabela 2 - Caracterização do caldo base queijo e do queijo de coalho	30

ARTIGO

Table 1 - GC-MS analysis of the essential oil from <i>Origanum vulgare</i> L.....	65
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABHI	ágar infusão de cérebro e coração
BAL	bactérias ácido lácticas
CIM	concentração inibitória mínima
CBHI	caldo infusão de cérebro e coração
DO	densidade óptica
OE	óleo essencial
OEOV	óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L.
UFC	unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 QUEIJO	17
3.2 BACTÉRIAS LÁTICAS	18
3.3 <i>Staphylococcus aureus</i> E <i>Listeria monocytogenes</i> EM QUEIJO DE COALHO.....	20
3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Origanum vulgare</i> L. (OEOV).....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 MATERIAIS	26
4.1.1 Óleo essencial <i>Origanum vulgare</i> L. e queijo de coalho	26
4.1.2 Micro-organismos teste	26
4.2 MÉTODOS	26
4.2.1 Análise da composição do óleo OEOV	26
4.2.2 Preparação do inóculo	27
4.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	28
4.2.4 Avaliação da qualidade microbiológica do queijo de coalho	29
4.2.5 Elaboração do caldo base queijo	30
4.2.6 Efeitos do OEOV sobre a viabilidade bacteriana em caldo base queijo	30
4.2.7 Efeitos do OEOV sobre a viabilidade bacteriana em queijo de coalho	31
4.2.8 Análise estatística.....	31
REFERÊNCIAS	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 ARTIGO - Effects of essential oil from <i>Origanum vulgare</i> L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semi-hard cheese-mimicking models.....	42
ANEXO.....	68

1 INTRODUÇÃO

O queijo de coalho é um alimento típico do Nordeste brasileiro, que apresenta ampla aceitação e consumo em todas as classes sociais, o que o torna um produto de importância social, econômica e cultural (SILVA et al., 2010; QUEIROGA et al., 2013). De acordo com a Legislação Brasileira “o queijo de coalho é um produto obtido a partir do processo de coagulação do leite, por meio da utilização do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementado ou não por bactérias lácticas selecionadas, podendo apresentar massa semi-cozida ou cozida com médio a alto teor de umidade, textura compacta ou macia, devendo ser comercializado em até 10 dias de fabricação” (BRASIL, 1997).

Na elaboração de queijo de coalho a coagulação do leite pode ser realizada a partir de enzimas, fermentos ou culturas de bactérias lácticas, que se trata de um preparo microbiano contendo números elevados de células de um ou mais gêneros e espécies de bactérias ácido lácticas (BAL) (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). As espécies de BAL mais utilizadas na fabricação de queijos pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*. Entretanto, na fabricação de queijo de coalho a espécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris* é a mais utilizada. Algumas características físico-químicas do queijo de coalho, como baixa acidez, elevado teor de pH e umidade podem favorecer o desenvolvimento de bactérias patogênicas frequentemente associadas a surtos alimentares (TURCHI et al., 2013).

Dentre as bactérias patogênicas isoladas com frequência a partir de queijo de coalho destaca-se, *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva, reconhecida como agente etiológico de surtos alimentares em todo o mundo devido a ingestão de alimentos contaminados com suas enterotoxinas (BORGES et al., 2008; LV et al., 2014). Outra importante bactéria patogênica relacionada ao queijo de coalho é *Listeria monocytogenes*. Causadora da listeriose uma doença conhecida pela elevada morbidade e comprometimento neurológico do paciente, *L. monocytogenes* possui a capacidade de sobreviver e se multiplicar sob refrigeração, uma condição comum do armazenamento de queijo de coalho (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; GILLISS et al., 2013).

Para controle do crescimento microbiano em queijo de coalho aditivos químicos podem ser adicionados ao produto, garantindo sua inocuidade. Entretanto, a crescente demanda dos consumidores por alimentos frescos, livres ou com baixos teores de aditivos químicos, com ampla vida útil e seguros ao consumidor tem direcionado a indústria de alimentos na busca de alternativas para garantir a qualidade microbiológica dos alimentos (SOUZA et al., 2007;

GARCÍA et al., 2010). Óleos essenciais de plantas têm sido sugeridos como candidatos para uso em alimentos, devido à atividade antimicrobiana que apresentam contra bactérias patogênicas de origem alimentar. Diversos estudos relatam a eficácia destes compostos, e particularmente o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano - OEOV) no controle do crescimento de bactérias patogênicas e/ou deteriorantes quando ensaiados em caldos laboratoriais e base-alimento (BARROS et al., 2009; AZERÊDO et al., 2012; SOUZA, et al., 2013; LUZ et al., 2014; MAZZARRIN et al., 2015). Sua atividade antimicrobiana geralmente é relacionada a seu constituinte majoritário, o carvacrol (HOLLEY; PATEL, 2005; MIGUEL, 2010).

Embora OEOV apresente atividade antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes, para que possa ser utilizado em sistemas de conservação de alimentos, deve também ser considerada a possibilidade de seus efeitos sobre os micro-organismos de interesse tecnológico, a exemplo de BAL em queijos, uma vez que estas bactérias estão relacionadas a aspectos sensoriais que caracterizam o produto.

Considerando estes aspectos, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos do OEOV sobre a viabilidade celular das cepas de bactérias ácido lácticas *L. lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris* utilizadas no processamento de queijo de coalho e das cepas de bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do OEOV sobre a viabilidade celular das cepas de bactérias ácido lácticas *L. lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris* e das cepas de bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição química do OEOV;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEOV frente as bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e as bactérias tecnológicas *L. lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris*;
- Estudar os efeitos de diferentes concentrações de OEOV no crescimento e sobrevivência das bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e das bactérias tecnológicas *L. lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris* em caldo base queijo;
- Verificar os efeitos de diferentes concentrações de OEOV no crescimento e sobrevivência das bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e das bactérias tecnológicas *L. lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris*, no queijo de coalho refrigerado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 QUEIJO

A produção de queijos tem sido um dos principais fatores que influenciam mundialmente a indústria de laticínios (USDA, 2012). A produção brasileira de queijos, em laticínios sob o Serviço de Inspeção Federal (SIF), foi em torno de 745 mil toneladas em 2010 (SOARES, 2013). De acordo com os dados publicados pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ, 2011), o consumo de queijos no Brasil passou de 2,6 Kg por habitantes/ano para 4 Kg e, entre os anos de 2000 à 2008, ocorreu um aumento de 30,8 % no consumo per capita do produto.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o queijo é “o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes” (BRASIL, 1996).

Os queijos são classificados em três categorias, baseadas no conteúdo de matéria gorda e no extrato seco. Com relação ao teor de gordura, os queijos são subdivididos em extragordo ou duplo creme (mínimo de 60%), gordo (45% a 59,9%), semigordo (25% a 44,9%), magro (10% a 24,9%) e desnatado (menos de 10%). De acordo com o conteúdo de umidade, em percentagem, os queijos são classificados em: queijo de baixa umidade (queijo de massa dura), com umidade de até 35,9%, queijos de média umidade (queijo de massa semidura), com umidade entre 36-45,9%, queijos de alta umidade (queijo de massa branda ou “macios”), cuja umidade pode variar entre 46,0-54,9% e queijos de muita umidade (queijo de massa branda ou “mole”), cuja umidade não seja inferior a 55,0% (BRASIL, 1996). Embora o processamento básico de fabricação seja comum a todos os tipos de queijo, etapas específicas definem cada tipo, particularidades que dependem da origem e tipo de leite utilizado, tipo de coagulação, técnicas de processamento, teor de gordura, consistência da coalhada e tempo de maturação (CHALITA et al., 2009).

No Brasil, os queijos de maior produção e consumo são o queijo mussarela, parmesão, requeijão, prato, minas frescal, minas padrão e queijo de coalho, este último produzido e consumido em larga escala na região Nordeste. De acordo com a *Food Agriculture and Organization* (FAO, 1990) o queijo de coalho é um queijo semiduro, produzido no Nordeste

brasileiro, principalmente nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Entretanto, destaca-se entre os queijos artesanais brasileiros comprovadamente incorporados à cultura regional, e vem ampliando o mercado de consumo nas outras regiões do país.

Segundo a Legislação Brasileira vigente (BRASIL, 1997), entende-se por queijo de coalho, “o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação”. Constitui-se em um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida, apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0%. Ainda, a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, Instrução Normativa nº 30 de 26/06/2001, define este produto como um queijo de textura compacta e macia, consistência semidura e elástica, podendo apresentar olhaduras. Apresenta elevado valor nutritivo devido as elevadas concentrações de vitaminas, proteínas, sais minerais, cálcio e fósforo, sabor brando, ligeiramente ácido, cor branco amarelado uniforme, com aroma, forma retangular ou cilíndrica, com peso entre 0,5 a 1,5 Kg, podendo ser consumido curado ou fresco (BASTOS et al., 2001).

Embora a coagulação enzimática possa ser empregada na elaboração do queijo de coalho, geralmente o produto é elaborado utilizando fermento láctico, que compreende uma mistura de um ou mais gêneros e espécies de bactérias lácticas (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). As BAL desempenham papel importante no processamento do queijo, pois promovem 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).

3.2 BACTÉRIAS LÁTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) formam um grupo de micro-organismos com características metabólicas, fisiológicas e morfológicas comuns. A definição comumente encontrada para BAL descreve este grupo 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 láctico o principal produto da fermentação de carboidratos (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007; TODOROV; FRANCO, 2010).

As BAL são amplamente distribuídas na natureza, podem ser encontradas na água, solo, esgoto, esterco e silagem. Ainda, podem ser isolados do trato digestório, cavidade oral e vagina

de mamíferos, onde exercem influência benéfica nos ecossistemas microbianos de seres humanos e animais (HOLZAPFEL et al., 2001). Predominam na microbiota de alimentos ricos em proteínas, carboidratos e vitaminas, particularmente, leite, queijo, carne e vegetais (LOPEZ-DÍAZ, 2000). BAL são encontradas de forma natural, como no leite cru, ou de forma industrializada, quando são adicionadas intencionalmente aos produtos lácticos. Os principais gêneros de BAL incluem *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Trichococcus*, *Isobacillum*, *Weissella* e *Paralactobacillus* (MOHANIA et al., 2008).

A classificação em diferentes gêneros é baseada na morfologia, ácido láctico produzido, multiplicação em diferentes temperaturas, capacidade de multiplicação em altas concentrações salinas, modo de fermentação da glicose e tolerância a condições ácidas e básicas (HOLZAPFEL et al., 2001; AXELSSON, 2004). De acordo com os produtos resultantes da fermentação, as bactérias lácticas podem ser classificadas como homofermentativas que produzem apenas ácido láctico e as heterofermentativas que além de ácido láctico, produzem também, etanol, ácido acético, dióxido de carbono, entre outros (CARR et al., 2002). Assim, BAL heterofermentativas, são responsáveis pelo desenvolvimento de compostos específicos de sabor e aroma na matriz alimentar, além de contribuir com o desenvolvimento da acidez do produto (HASSAN; FRANK, 2001; PARADA et al., 2007).

Devido a sua capacidade de produzir compostos aromáticos, as bactérias lácticas são bastante utilizadas, na forma de fermento láctico ou 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 (ROUSE et al., 2007; SCHROETER; KLAENHAMMER, 2009). Culturas iniciadoras de BAL, ou fermento láctico trata-se de uma preparação bacteriana composta por um elevado número de células de um ou mais gêneros e espécies de BAL. Sua principal função tecnológica é promover uma acidificação rápida durante o processo fermentativo garantindo a segurança do alimento. Ainda, contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais do produto e podem oferecer benefícios à saúde do consumidor enquanto probióticos. Os fermentos lácticos reproduzem a microbiota láctica de queijos e são formados por BAL iniciadoras e micro-organismos secundários. As BAL iniciadoras são responsáveis pela produção de ácido durante o processamento do queijo e contribuem no processo de cura. Os micro-organismos secundários geralmente são responsáveis pela definição das características sensoriais do queijo (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Os gêneros de BAL mais utilizados na fabricação de queijos são *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*. Entretanto, na fabricação de queijo de coalho a espécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* é a mais utilizada (FOX et al., 2000). Esta espécie se destaca devido a sua capacidade de converter rapidamente a lactose em ácido láctico, além de formar o diacetil, dióxido de carbono e outros compostos de aroma que são característicos do produto (TEUBER, 1995; LOPEZ-DÍAZ et al., 2000).

3.3 *Staphylococcus aureus* E *Listeria monocytogenes* EM QUEIJO DE COALHO

A Legislação Brasileira vigente (BRASIL, 1996) preconiza que o leite utilizado na produção de queijo de coalho deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente, pois leite cru pode ser fonte de micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Entretanto, a contaminação pós-pasteurização e ambiental também deve ser considerada, pois é favorecida pela elevada disponibilidade de nutrientes do leite, bem como pela umidade elevada em ambientes de processamento (PERRY, 2004).

O queijo de coalho pode ser considerado um alimento susceptível a contaminação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, pois seu processamento geralmente é realizado de forma artesanal e envolve manipulação constante (NERO et al., 2007). A possibilidade de contaminação é favorecida pelo uso de temperaturas ligeiramente elevadas e as características físico-químicas do produto, tais como, baixa acidez, médio a alto teor de umidade e elevado valor de pH (FREITAS et al., 2009; EL-BAKRY; SHEEHAN, 2014).

Dentre os diversos micro-organismos já isolados a partir de queijo de coalho, tais como *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., bolores e leveduras, destacam-se as bactérias patogênicas *Staphylococcus* sp. e *Listeria* sp., (GUEDES NETO et al., 2005) relatadas mundialmente como causadoras de surtos alimentares. Estas bactérias têm sido, mencionadas como prevalentes em ambientes de queijarias e recebem especial atenção por serem capazes de se reproduzir em temperaturas de refrigeração, que são tradicionalmente aplicadas para o armazenamento de queijo de coalho (ALVES, 2010).

Devido a ameaça potencial à saúde pública representada por *L. monocytogenes*, a *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) e a *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceram políticas de "tolerância zero" para esta bactéria em alimentos prontos para consumo (SHEEN; HWANG; JUNEJA, 2011). De acordo com a Legislação Brasileira vigente (BRASIL, 2001), *L. monocytogenes* deve estar ausente em queijo de coalho e *S. aureus* tem limite de 10^3 UFC.g⁻¹. Entretanto diversos estudos relatam o isolamento de *L. monocytogenes* e de *S. aureus* em

limites acima dos estabelecidos em queijo de coalho artesanal e industrializado (BRUNO, 2005; FREITAS et al., 2009).

S. aureus caracteriza-se como uma bactéria Gram-positiva, não-esporulada, aeróbia ou anaeróbia facultativa, imóvel e catalase-positiva. Na coloração de Gram esta bactéria é visualizada agrupada em “cachos de uva” (SANTOS et al., 2007). Amplamente disseminada no meio ambiente, *S. aureus* pode ser encontrado no ar, solo, água, fezes, esgotos e, principalmente, na mucosa nasal e trato gastrointestinal do homem e de animais, o que favorece sua transmissão aos alimentos por meio dos manipuladores ou gado leiteiro com mastite (STAMFORD et al., 2006).

A temperatura ótima de crescimento de *S. aureus*, varia entre 35-41 °C, sendo classificado assim como um micro-organismo mesófilo, porém, podem crescer em uma faixa ampla, que varia de 6,0-48,5 °C. Devido a capacidade de se manter viável em baixa atividade de água (A_w - 0,83 a 0,86), em uma faixa de pH de 4,0-10, com ótimo crescimento entre 6-7 e, elevadas concentrações de cloreto de sódio (até 20%), *S. aureus* é capaz de se desenvolver em uma ampla variedade de alimentos (RODRIGUEZ-CATURLA et al., 2012).

S. aureus é produtor de enterotoxinas principalmente entre 40-45 °C, mas pode crescer entre 10-46 °C (SOUZA et al., 2010). A intoxicação estafilocócica ocorre após a ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas (SEs) pré-formadas, que podem provocar vômitos e diarreia em aproximadamente quatro horas (ARGUDÍN et al., 2012). A duração do quadro clínico é geralmente curta, terminando entre 24 a 48 horas após o início dos sintomas e a completa recuperação ocorre entre um a três dias. A quantidade necessária de SEs para causar intoxicação é cerca de 100-200 ng (WALLIN-CARLQUIST et al., 2010). Esta bactéria é mundialmente considerada como uma das mais importantes causas de surtos alimentares (PULIDO, 2012). Os alimentos frequentemente envolvidos em intoxicação alimentar estafilocócica incluem produtos cárneos, aves, ovos, leite e produtos lácteos (HAMADI et al., 2014), surtos de intoxicação alimentar atribuídos ao consumo de produtos lácteos, principalmente queijos, são anualmente relatados em vários países (INPPAZ/OPS/OMS, 2006).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2013), no período de 2000 a 2013 foram registrados 763 casos de intoxicação alimentar por *S. aureus*, dentre estes, 337 casos foram provenientes do consumo de produtos lácteos. Vários estudos têm relatado a ocorrência de altos níveis de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase positiva, em queijo de coalho (FEITOSA et al., 2003; BORGES et al., 2008). Na maioria desses estudos, os queijos foram classificados como impróprio para consumo. Borges et al. (2008), analisaram 43

amostras de queijo de coalho e verificaram que 91% das amostras apresentaram contagens de células de *S. aureus* em níveis superiores ao permitido pela legislação 10^3 UFC.g⁻¹ (BRASIL, 2001). Resultado semelhante foi encontrado por Bruno (2005), onde 50% do total de amostras avaliadas de queijos de coalho artesanais e industriais apresentaram contaminação por este patógeno.

L. monocytogenes é a espécie do gênero *Listeria* de maior importância em alimentos. Difundida em diversos ambientes, *L. monocytogenes* pode ser encontrada na água, solo, vegetação e fezes de animais, além de já ter sido isolada de equipamentos industriais de refrigeração e congelamento. É uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, móvel, não esporulada, catalase positiva, oxidase negativa de forma bacilar, (bacilos curtos de 0,5 x 1-2 µm) que ocorrem isoladamente ou em cadeias (BARANCELLI et al., 2014; DALMASSO; JORDAN, 2014).

O crescimento ótimo de *L. monocytogenes* ocorre a 37 °C, porém pode se desenvolver em temperaturas na faixa de 0 a 45 °C. Existem relatos sobre o crescimento desta bactéria a 0 °C e sobrevivência mesmo após congelamento e descongelamento, secagem e em elevadas concentrações de sal. A atividade de água ótima para o crescimento de *L. monocytogenes* é próxima a 0,97, porém pode se multiplicar em torno de 0,92 e o pH ótimo está entre 6 e 8, mas pode multiplicar-se entre 4 à 9,5 (FRANCO; LANDGRAF, 2008; CARPENTIER; CERF, 2011; LINO; KOUTSOUMANIS, 2013). Devido à elevada resistência fisiológica, é difícil prevenir ou controlar a contaminação com *L. monocytogenes* em alimentos, principalmente naqueles que não sofrem tratamento térmico durante o processamento, como o queijo de coalho (RØRVIK et al., 2003).

A ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* causa a listeriose, seu período de incubação é de 1 a 7 dias, o que dificulta a identificação do alimento contaminado. Os principais sintomas são semelhantes aos da gripe, podendo ocorrer diarreias e dores abdominais, entretanto a taxa de letalidade de pessoas que desenvolvem a doença é muito alta cerca de 20-30% (WARRINER; NAMVAR, 2009; NEWELL et al., 2010; TODD; NOTERMANS, 2011). A dose infectante para o estabelecimento da doença depende da virulência e patogenicidade da cepa de *L. monocytogenes*, bem como o estado de saúde do hospedeiro, sendo particularmente perigosa para gestantes, recém-nascidos, indivíduos com cirrose carcinomas, síndrome de imunodeficiência adquirida e outras doenças que comprometem o sistema imunológico (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Dentre os alimentos relacionados a surtos de listeriose, têm-se carnes em geral, frutos do mar, produtos vegetais, crus ou processados, leite cru e pasteurizado, queijos e refeições

preparadas (NAKAMURA et al., 2012; WANG et al., 2013). Surtos de listeriose relacionados ao consumo de queijo foram registrados nos Estados Unidos em 2000, 2003 e 2007 (CDCP, 2002; HC, 2002; FDA, 2003; ProMED, 2008), Japão em 2001, Canadá em 2002, 2007 e 2008 (HC, 2002; ProMED, 2007) na Suíça em 2005 (ProMED, 2005), e em outros países, ilustram a incidência de produtos lácteos em surtos de listeriose (WARRINER; NAMVAR, 2009).

Segundo Pintado et al. (2005), a principal causa de contaminação de queijos com *L. monocytogenes* é a utilização do leite cru no processamento dos alimentos e/ou a contaminação pós-processamento. No Brasil, entre o período de 2000 e 2009, foram analisadas 3428 amostras de queijos quanto à presença de *L. monocytogenes*, onde foi verificado que 111 (3,24%) amostras foram positivas para este micro-organismo (SILVA et al., 2010).

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS E ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (OEOV)

Dentre as tecnologias emergentes de conservação de alimentos, o uso de compostos antimicrobianos naturais, seja de forma isolada ou combinada com outros métodos de preservação, está se tornando uma medida de controle reconhecida mundialmente (SILVA-ANGULO, 2014). A utilização de conservantes naturais com o objetivo de prolongar a vida útil dos alimentos é considerada uma alternativa promissora devido principalmente as propriedades antimicrobianas e antioxidantes, que além de reduzir o surgimento de micro-organismos resistentes, diminui os custos do processamento (SOUZA et al., 2007; GYAWALI; IBRAHIM, 2012).

Os óleos essenciais são compostos voláteis extraídos de plantas, caracterizado por forte odor, líquidos, raramente coloridos, solúveis em solventes orgânicos, lipossolúveis e com densidade geralmente menor que a da água. É constituído por metabólitos secundários de plantas aromáticas, podem ser sintetizados em diversas regiões da planta, como por exemplo, nos frutos, brotos, galhos, flores, folhas, cascas, madeiras e raízes, e são armazenados em cavidades ou células epidérmicas e secretoras (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008; BAJPAI; BAEK; KANG, 2012).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser influenciada por vários fatores, tais como, composição, tipo, concentração, processamento e estocagem (BERTINI et al., 2005), sua composição química pode variar conforme a espécie vegetal, origem, parte da planta, clima, época de colheita, região, estação do ano e condições climáticas (GALES et al., 2010; BARANAUSKIENĖ et al., 2013). Constituídos de uma mistura complexa de compostos orgânicos de baixo peso molecular com diferentes potenciais de atividade antimicrobiana (AIT-OUAZZOU et al., 2011) os óleos essenciais são compostos principalmente por, aldeídos,

álcoois, cetonas, ésteres, monoterpenos, fenilpropanóides, que em sua maioria, são voláteis (SIQUI et al., 2000). De acordo com a sua estrutura química esses compostos podem ser divididos em quatro grupos, tais como, terpenos, terpenóides, fenilpropenos e outros (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

O potencial antimicrobiano dos óleos essenciais tem sido atribuído aos componentes presentes de maior quantidade, porém os integrantes em menor quantidade têm mostrado exercer efeito sinérgico e/ou aditivo com os constituintes majoritários (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). Tendo em vista que essas substâncias consistem em uma mistura de componentes que irão agir em diferentes regiões da célula microbiana, a eficácia antimicrobiana não pode ser relacionada em um mecanismo de ação específico (BURT, 2004).

Devido as suas propriedades antimicrobianas, os óleos essenciais são promissores para uso na conservação de alimentos (BURT, 2004; BOUHDID et al., 2010). Neste contexto, diversos óleos essenciais e seus componentes têm sido aprovados pela FDA para uso em alimentos e bebidas (FDA, 2009). Dentre os diversos óleos essenciais que apresentam potencialidade antimicrobiana, destaca-se àquele obtido da espécie vegetal *Origanum vulgare* L., conhecido como uma fonte de compostos antimicrobianos alternativos para serem aplicados na conservação de alimentos (CHUN et al., 2005; SOUZA et al., 2007). Este composto tem mostrado destacáveis resultados na inibição de diferentes micro-organismos de interesse em alimentos, embora os resultados tenham sido variados de acordo com os micro-organismos ensaiados, origem do óleo essencial e técnica utilizada (MARINO; BERSANI; COMI, 2001; SOUZA et al., 2007; LUZ et al., 2012; GOMES-NETO et al., 2014).

O OEOV é uma mistura de monoterpenos lipofílicos, onde os isômeros carvacrol e o timol são os principais compostos que desempenham maior efeito antimicrobiano (ŞAHIN et al., 2004; HOLLEY; PATEL, 2005; SILVA et al., 2010). Alguns desses constituintes têm sido considerados como não possuidores de qualquer risco (denominado como GRAS-*Generally Recognized as Safe* ou aditivos alimentares aprovados) para a saúde dos consumidores e seu uso como aromas alimentares tem sido permitido nos Estados Unidos e em alguns países europeus (BURT, 2004). A ação do OEOV ocorre principalmente pela sensibilização da dupla camada fosfolipídica, com perturbação na função e na composição da membrana plasmática, a inativação do mecanismo enzimático, a inibição do transporte de elétrons para produção de energia e da síntese de componentes celulares, assim como o extravasamento de material citoplasmático, lise e eventual morte celular (BURT, 2004; DI PASQUA et al., 2010).

Na última década, diversos estudos têm relatado inibição do crescimento e/ou sobrevivência de micro-organismos de interesse em alimentos pela ação do OEOV, particularmente *S. aureus* e *L. monocytogenes*, como apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 - Estudos que relatam a eficácia antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Micro-organismos teste	Estudo/Referência
<i>Staphylococcus aureus</i>	HAMMER; CARSON; RILEY, 1999
	ÖZCAN; ERKMEN, 2001
	MARINO; BERSANI; COMI, 2001
	BAYDAR et al., 2004
	BARROS et al., 2009
	SOUZA, et al., 2010
	BARROS et al., 2012
	LUZ et al., 2013
<i>Listeria monocytogenes</i>	DIMITRIJEVIC et al., 2009
	AZERÊDO et al., 2011
	AZERÊDO et al., 2012
	LUZ et al., 2012
	MAZZARRIN et al., 2015

Além da forte inibição do crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, sabe-se que a exposição ao OEOV também é capaz de alterar o metabolismo (atividade enzimática e ou de produção de toxinas) de *S. aureus* (BARROS et al., 2009; SOUZA et al., 2013) e causar a morte celular de *L. monocytogenes* devido a liberação de material intracelular e deslocamento da parede celular a partir da membrana plasmática (AZERÊDO et al., 2012). Entretanto, há uma carência de informações sobre os efeitos do OEOV na sobrevivência e o crescimento de estas bactérias patogênicas em meio base queijo, ou mesmo quando aplicado na matriz durante o armazenamento. Ainda, não existem relatos científicos, até o presente momento, sobre a influência do OEOV na sobrevivência de BAL utilizadas como ferramentas tecnológicas na produção de queijo de coalho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e queijo de coalho

O óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (OEOV) foi obtido através da empresa nacional fornecedora de óleos essenciais, Laszlo Aromaterapia Indústria e Comércio Ltda (Minas Gerais, Brasil). Os dados relacionados ao óleo essencial, tais como nome comercial, nomenclatura botânica, origem, lote, método de extração, método de cultivo, órgão da planta do qual foi extraído foram informados através de ficha técnica emitido pelo fornecedor (ANEXO). As soluções do OEOV foram preparadas em caldo infusão de cérebro e coração (CBHI, Himedia, Índia) ou em caldo base queijo, com concentrações variando de 40 a 0,312 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Para a solubilização do OEOV foi utilizado o Tween 80 (1% v/v, Sigma-Aldrich, EUA) (MONTE et al., 2014).

As amostras de queijo de coalho foram adquiridas no comércio local de João Pessoa (Paraíba, Brasil). Utilizou-se quatro unidades de 500 g do mesmo lote, pasteurizado e produzido por coagulação enzimática - quimosina 0,9 mL/L sem adição de cultura ácido láctica.

4.1.2 Micro-organismos teste

As cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foram obtidas da Coleção de Micro-organismos de Referência, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). A cultura láctica liofilizada composta pelos micro-organismos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, (R-704, lote 3122631) foi obtida a partir de Christian Hansen Brazil® (Valinhos, MG, Brasil). Culturas estoques de todas as bactérias ensaiadas foram mantidas em criotubos contendo BHI e glicerol (20%) a -80 °C.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Análise da composição do OEOV

A análise da composição do OEOV foi realizada no Laboratório de Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL/UFPB). A identificação dos compostos foi determinada em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu). Os compostos foram separados em uma coluna RTX capilar ®-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 μm). O volume de injeção foi de 1 mL de OEOV diluído em hexano (1:10). A programação da

temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi iniciada a 60 °C, com acréscimo de 3 °C por minuto até atingir 240 °C, concluindo o tempo de corrida equivalente a 60 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e o gás hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 0,99 mL/minuto. O espectrômetro de massa foi operado por impacto de elétrons com uma temperatura da fonte de 200 °C, e com energia de ionização de 70V, variação de scan de m/z 40 a m/z 500.

Para a identificação dos compostos voláteis, utilizou-se o banco de espectros da própria biblioteca do CG/MS, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database (Version 1.7). A quantificação dos voláteis foi obtida através da normalização das áreas dos voláteis e expressos em percentual de área (%).

4.2.2 Preparação do inóculo

A padronização do inóculo bacteriano foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por MacMahon et al. (2008) e Wiegand, Hilpert, Hancock (2008). As cepas bacterianas foram cultivadas em placas de ágar infusão de cérebro e coração (ABHI, Himedia) e incubadas a 37 °C, *overnight* (18-20h). Cada cepa foi previamente cultivada em 5 mL de caldo infusão de cérebro e coração (CBHI, Himedia) a 37 °C, *overnight* (18-20h). Em seguida, a massa celular dos cultivos foi coletada por centrifugação (4500 g por 15 min a 4 °C), lavada duas vezes utilizando CBHI e ressuspendida em 10 mL de CBHI. As suspensões microbianas foram submetidas à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) em CBHI. Cada diluição foi padronizada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 660 nm mediante o valor de Densidade Óptica (DO).

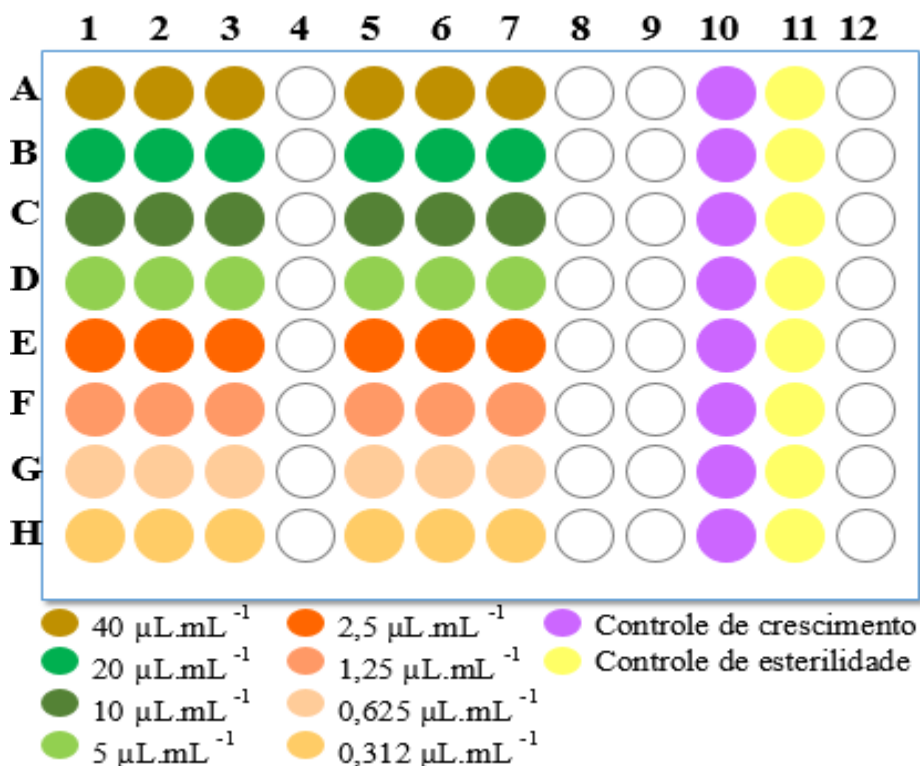
Para a determinação do número de unidades formadora de colônias (UFC) de cada diluição, foram semeados na superfície de placas de Petri contendo ABHI um volume de 0,1 mL de cada diluição da suspensão de micro-organismos e, espalhados com auxílio de alça de Drigalsky. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após incubação, as placas contendo o crescimento bacteriano foram submetidas à contagem do número de colônias formadas. Com o número de colônias obtido e corrigindo-se a respectiva diluição, foi determinado o número de células contidas no tubo, para o comprimento de onda 660 nm, o valor da DO foi de 0,1 para *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e de 0,8 para *L. lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris*, ambos correspondendo a, aproximadamente, 1×10^8 UFC.mL⁻¹.

4.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEOV foi determinada através do método de microdiluição em caldo em microplaca de 96 poços de acordo com a padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2006; WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

Inicialmente, um volume de 50 μL do inóculo (10^6 UFC.mL⁻¹) foi adicionado a cada poço contendo 50 μL de CBHI adicionado de diferentes concentrações do OEOV, variando de 40 a 0,312 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Simultaneamente, foi preparado o controle de crescimento (positivo) e de esterilidade (negativo) (Figura 1). O sistema foi agitado suavemente por 30 segundos, após a agitação o sistema foi coberto com filme plástico para evitar a desidratação microbiana e garantir que o OEOV não volatilizasse, em seguida, incubou a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 30 μL de resazurina (Inlab), preparada em solução aquosa (0,01%), em todos os poços e reincubadas a 37 °C por 20 minutos, quando então foi realizada a leitura visual (MONTE et al., 2014). A resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado para avaliar a viabilidade e contaminação bacteriana e para testar a atividade antimicrobiana. A permanência da cor azul nos poços foi interpretada como ausência do crescimento bacteriano, enquanto o desenvolvimento de cor rosa ou incolor, presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento das cepas, ou seja, a menor concentração de óleo essencial capaz de impedir a mudança da cor azul para rosa. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 1 - Esquema da microdiluição seriada realizada em microplaca de 96 poços para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente as cepas teste.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4 Avaliação da qualidade microbiológica do queijo de coalho

A qualidade microbiológica do queijo de coalho utilizado no estudo foi avaliada seguindo os padrões sanitários estabelecidos pela Resolução RDC nº 12 de 02/01/2001 (BRASIL, 2001), onde estabelece a pesquisa de Coliformes totais e termotolerantes (45 °C), *Staphylococcus coagulase positiva* (*S. aureus*), *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. As análises microbiológicas foram realizadas segundo metodologias descritas pela *American Public Health Association* (APHA, 2001). Os dados obtidos (Tabela 1) revelaram uma satisfatória qualidade sanitária do produto avaliado paralelo a não detecção das bactérias patogênicas avaliadas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) no estudo.

Tabela 1 - Análises microbiológicas do queijo de coalho.

Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes a 45 °C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp./25g	<i>S. coagulase-positiva</i> (UFC/g)	<i>L. monocytogenes</i> /25g
2,4 x 10 ²	< 3	Ausência	< 1 x 10 ¹	Ausência

4.2.5 Elaboração do caldo base queijo

O estudo do efeito do OEOV sobre a viabilidade bacteriana foi realizado em caldo base queijo com o objetivo de simular as condições ambientais que o micro-organismo encontra na matriz alimentar. O caldo base queijo foi obtido a partir da utilização de 160 g de queijo de coalho, previamente macerado, e adicionado em 1000 mL de água destilada. Após homogeneização manual por 5 minutos a mistura foi submetida ao banho-maria termostatizado durante 50 minutos a 42 °C. Posteriormente, procedeu-se a filtração a vácuo e o filtrado obtido (caldo base queijo) foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C e 1 atm. O caldo base queijo foi armazenado a -20 °C em alíquotas de 50 mL e, quando necessário uma alíquota foi descongelada sob refrigeração (7 ± 1 °C) e utilizada para os ensaios (NEVIANI et al., 2009). A caracterização físico-química do caldo base queijo e queijo de coalho, foi realizada conforme os métodos padrão AOAC (2012). Os valores dos parâmetros avaliados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização do caldo base queijo e do queijo de coalho.

Amostras	Umidade (g/100g)	Minerais (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Lipídios (g/100g)	Carboidratos (g/100g)
Caldo base queijo	98,36±0,09	0,37±0,00	0,64±0,03	0,39±0,01	0,23±0,07
Queijo de coalho	46,52±0,16	4,57±0,11	22,17±0,02	6,35±0,10	20,40±0,21

4.2.6 Efeitos do OEOV sobre a viabilidade bacteriana em caldo base queijo

Um total de 150 µL da suspensão bacteriana (10^8 UFC.mL⁻¹) de cada cepa foi inoculado em 2850 µL do caldo base queijo estéril contendo quantidades apropriadas para a obtenção da concentração final desejada de (0,6 µL.mL⁻¹, 1,25 µL.mL⁻¹, 2,5 µL.mL⁻¹ e 5 µL.mL⁻¹) do OEOV e de modo que a concentração final do inóculo foi de 10^6 UFC.mL⁻¹. Os sistemas foram agitados suavemente por 30 segundos e incubados a 37 °C por 24 horas. Nos intervalos de 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas pós-incubação, uma alíquota de 100 µL de cada sistema foi submetida a diluição seriada em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) e, em seguida 20 µL de cada diluição foram inoculados pelo uso da técnica da micro-gota, em placas com ágar seletivo (M17 Ágar - Himedia, Índia; Baird Parker Ágar suplementado com 50 mL/L de emulsão de gema de ovo com telurito de potássio, Himedia, Índia; Listeria Ágar suplementado - Listeria II Himedia, Índia) a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, realizou-se a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC.mL⁻¹, pela técnica da micro-gota

(HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Sistemas controle, sem a adição do OEOV, foram ensaiados similarmente.

4.2.7 Efeitos do OEOV sobre a viabilidade bacteriana em queijo de coalho

A viabilidade das cepas teste artificialmente inoculadas em queijo de coalho frente a diferentes concentrações ($0,6 \mu\text{L.g}^{-1}$, $1,25 \mu\text{L.g}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L.g}^{-1}$) de OEOV ao longo de 72 horas de armazenamento em temperatura de refrigeração, foram avaliados através da contagem de células viáveis ($\log \text{UFC.g}^{-1}$). Para isto, 20 g de queijo de coalho (previamente macerado), 10 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v), 1 mL de suspensão bacteriana (10^8UFC.g^{-1}) e OEOV nas concentrações finais desejadas foram preparados, homogeneizados manualmente por 1 minutos de modo que a concentração final do inóculo foi de 10^6UFC.g^{-1} . Após homogeneização os sistemas foram incubados a 10°C (temperatura de armazenamento do queijo de coalho). Um total de quatro sistemas foram conduzidos, os quais foram analisados nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas. Sistemas controle sem adição do OEOV foram conduzidos nas mesmas condições. No tempo inicial (imediatamente após a inoculação) 70 mL de solução salina estéril foram misturados ao sistema, em seguida, após suave homogeneização por 30 segundos, uma alíquota de 100 μL foi retirada e diluída seriadamente (10^{-1} - 10^{-5}) em solução salina estéril. Posteriormente, 20 μL de cada diluição foi inoculada em placas de Petri estéreis contendo meio seletivo estéril (M17 Ágar - Himedia, Índia; Baird Parker Ágar suplementado com 50 mL/L de emulsão de gema de ovo e telurito de potássio, Himedia, Índia; Listeria Ágar suplementado - Listeria II Himedia, Índia) para, *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente, sendo então incubadas a 37°C por 24 horas. Em cada tempo, este procedimento foi repetido para os outros sistemas. Nos sistemas controle, a solução do óleo essencial OV foi substituída por solução salina estéril. Após o período de incubação, realizou-se a contagem do número de células viáveis, expressa como $\log \text{UFC.g}^{-1}$, por meio da técnica de micro-gota (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK et al., 2001).

4.2.8 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (repetições), os resultados foram expressos com os valores médios dos ensaios. Os resultados da CIM foram expressos em valor modal, porque não foi observada variação entre os resultados replicados (McMAHON et al., 2008). Nos ensaios de viabilidade celular, a comparação entre as médias e determinação das diferenças significativas ($p < 0,05$) foi realizada através da análise

de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sigma-Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia).

REFERÊNCIAS

- ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijo**, 2011. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp?codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17>. Acesso em 25 de novembro de 2014.
- 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.
- ALVES, C. C. D. **Comportamento da *Escherichia coli* em queijo minas frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta com ácido láctico**. Niterói, 2010. 80p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 2001. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA. 676p.
- AOAC. 2012. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist** (18th eds.). Washington. DC USA.
- ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; GONZÁLEZ-HEVIA, M. A.; BANCES, M.; GUERRA, B.; RODICIO, M. R. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. **Applied Environmental Microbiology**. v. 78, n. 8, p. 2930-2935, 2012.
- AXELSSON, L. T. L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, v. 3, n. 1, p. 61-66, 2004.
- AZERÊDO, G. A.; STAMFORD, T. L. M.; NUNES, P. C.; GOMES-NETO, N. J.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUZA, E. L. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 1541-1548, 2011.
- AZERÊDO, G. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; STAMFORD, T. L. M.; SOUZA, E. L. The cytotoxic effect of essential oils from *Origanum vulgare* L. and/or *Rosmarinus officinalis* L. on *Aeromonas hydrophila*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 4, p. 293-297, 2012.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- 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, n. 2, p. 722-734, 2012.

BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; ÖZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 6, p. 169-172, 2004.

BARANAUSKIENE, R.; VENSKUTONIS, P. R.; DAMBRAUSKIENE, E.; VISKELIS, P. Harvesting time influences the yield and oil composition of *Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare* and ssp. *hirtum*. **Industrial Crops and Products**, v. 49, n. 9, p. 43-51, 2013.

BARANCELLI, G. V.; CAMARGO, T. M.; GAGLIARDI, N. G.; PORTO, E.; SOUZA, R. A.; CAMPIONI, F. Pulsed field gel electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, n. 3, p. 21-29, 2014.

BARROS, J. C.; CONCEICAO, M. L.; GOMES NETO, N. J.; COSTA, A. C. V.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P.; SOUZA, E. L. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and metabolic parameters of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Food Science and Technology - LWT**, v. 42, n. 1, p. 1139-1143, 2009.

BARROS, J. C.; CONCEIÇÃO, M. L.; GOMES NETO, N. J.; COSTA, A. C. V.; SOUZA, E. L. Combination of *Origanum vulgare* L. essential oil and lactic acid to inhibit *Staphylococcus aureus* in meat broth and meat model. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1120-1127, 2012.

BASTOS, M. S. R.; NASSU, R. T.; BORGES, M. F.; SILVA, J. B. Inspeção em uma indústria produtora de queijos tipo coalho no estado do Ceará, visando a implantação das boas práticas de fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 2, p. 130-136. 2001.

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.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3, p. 80-83, 2005.

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.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y.; Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008.

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.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Portaria nº 146, de 07/03/1996. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11/03/1996. p. 3977-3978.

BRASIL. Portaria nº 352 de 1997 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 1997. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2194>>. Acesso em 20 novembro 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02/01/2001. p. 1-54. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>>. Acesso em 28 de novembro de 2014.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga de terra, queijo de coalho e queijo de manteiga. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 jul. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica/Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos**, 2013.

Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.com/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2013/>> . Acessado em 27 de novembro de 2014.

BRUNO, L. M. Avaliação microbiológica de queijos de Coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 217-220, 2005.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in microbiology**. New York, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 1-8, 2011.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, R. O. P.; PETTI, R. H. V.; SILVA, C. R. L. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**, v. 39, n. 6, p. 77-88, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDCP. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – United States. 2002. **Morb Mortal Wkly Rep**, v. 50, n. 26, p. 560-562, 2002.

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.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Seven Edition M07-A7. 2006. Wayne.

DALMASSO, M.; JORDAN, K. Absence of growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 81, n. 1, p. 46-53, 2014.

DI PASQUA, R.; MAMONE, G.; FERRANTI, P.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaption to sublethal concentration of thymol. **Proteomics**, v. 10, n. 5, p. 1040-1049, 2010.

DIMITRIJEVIC, S. I.; MIHAJLOVSKI, K. R.; ANTONOVIC, D. G.; MILANOVIC-STEVANOVIC, M. R.; MIJIN, D. Z. 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, n. 2, p. 774-782, 2007.

EL-BAKRY, M; SHEEHAN, J. Analysing cheese microstructure: A review of recent developments. **Journal of Food Engineering**, v. 125, n. 13, p. 84-96, 2014.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênicosanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 162-165, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. Triunfo Import Food Corp. Recalls queijo tipo mineiro Cheese – United States. 2003. Disponível em: <http://www.fda.gov/oc/po/firmrecalls/triunfo10_03.html> . Acesso em 29 de novembro de 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. Antimicrobial resistance: a growing threat, 2009. Disponível em < www.fda.gov > Acesso dia 12 de dezembro de 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO Animal Production and Health – The thecnology of traditional milk products in developing countries, Roma, 1990, v. 85. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/t0251e/T0251E13.htm>> . Acesso em 26 novembro de 2014.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000.

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

FREITAS, J. R.; SOUZA, J. S.; OLIVEIRA, H. B.; ANGELO, J. H. B.; BEZERRAS, J. D. C. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. **Revista Eletrônica de Extensão**, v. 6, n. 8, p. 37-49, 2009.

GALES, R. C.; PREOTU, A.; NECULA, R.; GILLE, E.; TOMA, C. Altitudinal variations of morphology, distribution and secretion of glandular hairs in *Origanum vulgare* L. leaves. **Studia Universitatis Vasile Goldis**, v. 20, n. 1, p. 59-62, 2010.

GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ, L.; RODRÍGUEZ, A.; MARTÍNEZ, B. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 8, p. 373-382, 2010.

GILLISS, D.; CRONQUIST, A. B.; CARTTER, M.; TOBIN-D'ANGELO, M.; BLYTHE, D.; SMITH, K.; LATHROP, S.; ZANSKY, S.; CIESLAK, P. R.; DUNN, J.; HOLT, K. G.; LANCE, S.; CRIM, S. M.; HENAO, O. L.; PATRICK, M.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food e Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US Sites, 1996-2012. **Morbidity and Mortality Weekly Review**, v. 62, n. 15, p. 283-287, 2013.

GOMES-NETO, N. J.; LUZ, I. S.; FRANCO, O. L.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Tolerance evaluation in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* challenged with sublethal amounts of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil or 1,8-cineole in meat model. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 8, p. 1912 - 1917, 2014.

GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, n. 2, p. 1839-1846, 2005.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 29-45, 2012.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

HAMADI, F.; ASSEME, F.; ELABED, S.; BENSOUA, S.; MABROUKI, M.; LATRACHE, H. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. **Food Control**, v. 38, n. 4, p. 104-108, 2014.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2^a ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HEALTH CANADA - HC. Listeriosis: British Columbia – Canadá. 2002. Disponível em: <http://www.phacaspc.gc.ca/bid-bmi/dsd-dsm/nb-ab/2002/nb3502_e.html> . Acesso em 29 de novembro de 2014.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121-129, 2001.

HOLZAPFEL, H. W.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 3, p. 365 -373, 2001.

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

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

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

INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCIÓN DE LOS ALIMENTOS Y ZOONOSIS (INPPAZ) / ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS) / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Vigilancia epidemiológica**. Sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos (SIRVETA), 2006. Disponível em: <<http://www.panalimentos.org/sirveta/e/salida2.asp>> . Acesso em 27 de novembro de 2014.

LINO, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 3, p. 310-321, 2013.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.

LUZ, S. I.; GOMES NETO, N. J.; TAVARES, A. G.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 667- 672, 2012.

LUZ, I.; GOMES NETO, N. J.; TAVARES, A. G.; NUNES, CAMPOS, P.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Lack of induction of direct protection or cross-protection in *Staphylococcus aureus* by sublethal concentrations of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol in a meat-based medium. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 5, p. 587-593, 2013.

LUZ, I. S.; GOMES NETO, N. J.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Assessment of tolerance induction by *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in *Pseudomonas aeruginosa* cultivated in a meat-based broth and in a meat model. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 7, p. 1-10, 2014.

LV, G.; XU, B.; WEI, P.; SONG, J.; ZHANG, H.; ZHAO, C.; QIN, L.; ZHAO, B. Molecular characterization of foodborne-associated *Staphylococcus aureus* strains isolated in Shijiazhuang, China, from 2010 to 2012. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 462-468, 2014.

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.

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, n. 3, p. 187-195, 2001.

MAZZARRIN, 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**, v. 50, n. 10, p. 794-803, 2015.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252-9287, 2010.

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.

MONTE, D. F. M.; TAVARES, A. G.; ALBUQUERQUE, A. R.; SAMPAIO, F. C.; OLIEVIRA, T. C. R. M.; FRANCO, O. L.; SOUZA, E. L.; MAGNANI, M. Tolerance response of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains to habituation to *Origanum vulgare* L. essential oil. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2014.

McMAHON, M. A. S.; TUNNEY, M. M.; MOORE, J. E.; BLAIR, I. S.; GILPIN, D. F.; McDOWELL, D. A. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 263-268, 2008.

NAKAMURA, S.; KUDA, T.; KANNO, T.; TAKAHASHI, H.; KIMURA, B. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 19-24, 2012.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 201-204, 2007.

NEVIANI, E.; DE LA LINDNER, J.; BERNINI, V.; GATTI, M. Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural medium. **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 240-245, 2009.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; VAN DER GIESSEN, J.; KRUSE, H. Food-borne diseases -The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1, p. 3-15, 2010.

ÖZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. **Eur. Food Res. Technology**, v. 212, n. 6, p. 658-660, 2001.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 521-542, 2007.

PERRY, K. S. P. Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PINTADO, C. M. B. S.; OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M. E.; FERREIRA, M. A. S. S. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheeses. **Food Microbiology**, v. 22, n.1, p. 79-85, 2005.

PULIDO, R. P. Bactericidal effects of high hydrostatic pressure treatment singly or in combination with natural antimicrobials on *Staphylococcus aureus* in rice pudding. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 19-24, 2012.

ProMED – International society for Infectious Diseases. ProMED-mail. Listeriosis, fatal - Switzerland (Neuenburg): Alert. 2005.

ProMED - International Society for Infectious Diseases. ProMED-mail. Listeriosis - USA: Update; 2008.

ProMED - International Society for Infectious Diseases. ProMED-mail. Yersiniosis, listeriosis Canada: Unpasteurized Milk/Cheese; 2007.

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

QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 538-544, 2013.

RODRIGUEZ-CATURLA, M. Y.; VALERO, D. A.; VALLEJO, J. L.; GARCÍA-GIMENO, R. M.; COSANO, G. Z. Effect of pre-incubation conditions on growth and survival of *Staphylococcus aureus* in sliced cooked chicken breast. **Meat Science**, v. 92, n. 4, p. 409-416, 2012.

RÓRVIK, L. M.; AASE, B.; ALVESTAD, T.; CAUGANT, D. A. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 94, n. 4, p. 633-640, 2003.

ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 915-923, 2007.

SANTOS, A. L.; SANTO, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 412-423, 2007.

ŞAHİN, 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. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 549-557, 2004.

SILVA, M. C. D.; RAMOS, A. C. S.; MORENO, I.; MORAES, J. O. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 214-221, 2010.

SILVA, J. P. L.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. M. Oregano essential oil: influence of the chemical composition on the inhibitory activity against *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 136-141, 2010.

SILVA-ANGULO, A. B.; ZANINI, S. F.; RODRIGO, D.; ROSENTHAL, A.; MARTINEZ, A. Growth kinetics of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* under exposure to carvacrol and the occurrence of sublethal damage. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 336-342, 2014.

SIQUI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais - potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.16, n. 2, p. 38-43, 2000.

SOARES, A. K. C. **Mapeamento dos queijos produzidos no estado da Paraíba**, 2013. Disponível em: <www.sovergs.com.br/site/higienistas/trabalhos/10390.pdf> . Acesso em 25 novembro de 2014.

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, 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, n. 2, p. 308-311, 2010.

SOUZA, E. L.; AZERÊDO, G. A.; SOUSA, J. P.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; STAMFORD, T. L. M. Cytotoxic effects of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils alone and combined at sublethal amounts on *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable broth. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 2, p. 163-171, 2013.

SCHROETER, J.; KLAENHAMMER, T. Genomics of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 292, n. 2, p. 1-6, 2009.

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

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p.1236-1243, 2007.

TEUBER, M. The genus *Lactococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall. v. 2, n. 4, p. 173-234, 1995.

TODD, E. C. D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 22, n. 9, p. 1484-1490, 2011.

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.

USDA - United States Department of Agriculture, 2012. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/portugues/reports.asp>>. Acesso em 25 de novembro de 2014.

WANG, G.; NING, J.; ZHAO, J.; HANG, F.; TIAN, F.; ZHAO, J.; CHEN, Y.; HANG, H.; CHEN, W. Partial characterisation of an anti-listeria substance produced by *Pediococcus acidilactici* P9. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 2, p. 1-5, 2013.

WALLIN-CARLQUIST, N.; MÁRTA, D.; BORCH, E.; RÅDSTRÖM, P. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International Journal of Food Microbiology**. v. 141, n. 1-2, p. 69-74, 2010.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with *Listeria*? **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 6, p. 245-254, 2009.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n.2, p. 163-175, 2008.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO: Effects of essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semi-hard cheese-mimicking models

Artigo submetido a Food Control (Fator de Impacto 2,819)

Effects of essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semi-hard cheese-mimicking models

Running title: Antibacterial effects of oregano essential oil on cheese

Geany Targino de Souza^a, Rayssa Julliane de Carvalho^b, Jossana Pereira de Sousa^b, Donald Schaffner^c, Evandro Leite de Souza^b, Marciane Magnani^{a*}

^a*Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

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

^c*Department of Food Science, Rutgers, The State University of New Jersey, 65 Dudley Road, New Brunswick, NJ 08901, USA*

* 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: magnani2@gmail.com.br; phone number: + 55 83 3216 7576; fax number: + 55 83 3216 7354

Abstract

This study assessed the inhibitory effects of the essential oil from *Origanum vulgare* L. (OVEO) on *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and a mesophilic starter culture composed of lactic acid bacteria (*L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*) in semi-hard cheese (*coalho*)-mimicking models. Minimum inhibitory concentration (MIC) of OVEO was 2.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ against both *S. aureus* and *L. monocytogenes* and 0.6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ against the tested starter co-culture. Assays in cheese-based broth containing OVEO at 0.6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ revealed no decrease in viable cell counts of both pathogenic bacteria, while the starter co-culture decreased 1.0 CFU.mL^{-1} after 24 h of exposure compared with the initial viable counts. OVEO at 1.25 and 2.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ caused reductions of up to 2.0 log CFU.mL^{-1} and 2.5 log CFU.mL^{-1} in *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively. At these same concentrations, OVEO severely affected the cell viability of the starter co-culture following a short period of exposure. Higher concentrations of OVEO were required to decrease the viable cell counts of all target bacteria in the semi-solid *coalho* cheese model compared to cheese-based broth. Over the assessed time points, viable cell counts of *Lactococcus* spp. in *coalho* cheese containing OVEO were lower than those of *S. aureus* and *L. monocytogenes*. These results suggest that the concentrations of OVEO used to control pathogenic bacteria in semi-hard cheese could be carefully evaluated because of their possible inhibitory effects on the growth and survival of starter lactic acid culture used during the production of this product.

Keywords: oregano; antimicrobial activity; *coalho* cheese; starter culture.

1. Introduction

Coalho cheese is a semi-hard (mildly ripened) cheese that is typically produced in the Northeast region of Brazil (Oliveira, Garcia, Queiroga & Souza, 2012) with medium to high moisture, high yield and good acceptance among consumers (Silva, Ramos, Moreno & Moraes, 2010). This cheese is obtained by a simple manufacturing process using an enzymatic coagulating agent and mesophilic lactic acid starter cultures (Machado et al., 2011; Queiroga et al., 2013). Lactic acid starter cultures are typically used to improve sensory aspects, i.e., flavor, taste and texture, during the ripening of this product (Oliveira, Garcia, Queiroga & Souza, 2012; Queiroga et al., 2013). Other beneficial uses of lactic acid cultures in mildly ripened cheeses include the production of chemical substances during fermentation, which have been associated with higher microbial stability during storage (Coelho, Silva, Ribeiro, Dapkevicius & Rosa, 2014).

Unripened or mildly ripened cheeses, such as *coalho* cheese, are among the main foods that have been reported to be involved in major outbreaks caused by *Staphylococcus aureus* and *L. monocytogenes* worldwide (Coelho, Silva, Ribeiro, Dapkevicius, & Rosa, 2014; Zeleny et al., 2015). Some physicochemical characteristics of mildly ripened cheeses, such as high moisture, high pH and low acidity, may favor the survival and growth of these foodborne pathogens (Gilliss et al., 2013; Pimentel-Filho et al., 2014). *S. aureus* is one of the most common pathogenic bacteria related to cheese, causing a typical intoxication through the ingestion of enterotoxins pre-formed in foods by enterotoxigenic strains (Wang et al., 2013; Le, Bazger, Hill & Wilcock, 2014). *L. monocytogenes* is also frequently isolated from unripened and mildly ripened cheeses. This bacterium causes listeriosis, a foodborne disease that is well known worldwide because of its high morbidity and mortality (EFSA, 2013; Gilliss et al., 2013). A common aspect related to these foodborne pathogens is the ability to grow under the

refrigerated storage conditions that are used to preserve fresh and mildly ripened cheeses (Franco, Hsu & Simonne, 2010; Burall, Laksanalamai & Datta, 2012).

Increasing concerns about the quality and safety of cheeses have led to the development of improved methods to preserve these products. Alternative preservation techniques using naturally derived ingredients, such as essential oils (EOs) are being investigated. EOs are attracting interest as potential preserving agents in cheese because would satisfy the current food manufacturers and consumers' demands for healthier foods (Asensio, Grosso & Juliani, 2015). Among the EO considered as generally recognized as safe (GRAS) and cited as candidate to ensure the microbiological safety and stability of cheese, that from *Origanum vulgare* L. is of interest (oregano – OVEO) (Olmedo, Nepote & Grosso, 2013; Asensio et al., 2015). The inhibitory effects of OVEO against a wide range of foodborne pathogens, particularly *S. aureus* and *L. monocytogenes*, have been reported in laboratory media and in food-based broths (Azerêdo et al., 2011; Luz, Gomes-Neto, Tavares, Magnani & Souza, 2012; Luz et al., 2013). However, there is a lack of information regarding the effects of OVEO on the lactic acid bacteria used as starter cultures in fermented dairy foods. These effects are of interest because starter cultures can improve the sensory attributes of dairy products, particularly of fresh or low-ripened cheeses – e.g. *coalho* cheese (Buriti, Rocha, & Saad, 2005; Coelho et al., 2014). Some authors have stated that food matrix components can influence the activity of EOs (Burt, 2004; Gutierrez, Barry-Ryan & Bourke, 2008, 2009), but little information is available about the activity of OVEO against *S. aureus* and *L. monocytogenes* or starter bacteria in food matrices.

Considering these aspects, the present study evaluated the effects of OVEO on the growth of *S. aureus*, *L. monocytogenes* and a mesophilic starter co-culture composed of the lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in different *coalho* cheese-mimicking models.

2. Material and methods

2.1. Essential oil

OVEO was obtained by steam distillation, was purchased from Laszlo Ind. Com. Ltda. (Minas Gerais, Brazil). Solutions of OVEO were prepared in BHI (Himedia, India) in a range of concentrations (40-0.312 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) using Tween 80 (1%, v/v; Sigma–Aldrich, USA) as an emulsifier (Monte et al., 2014). Tween 80 at the higher assayed concentration (1%, v/v) presented no inhibitory effects against the evaluated bacterial strains.

2.2 Test strains and growth conditions

The strains *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 were obtained from the Collection of Reference Microorganisms, National Institute of Quality Control in Health (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil). A freeze-dried commercial starter co-culture composed of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R-704, batch 3122631) was obtained from Cristian Hansen Brazil (Valinhos, Minas). During the study, the stock cultures were maintained in cryovials at -80 °C.

Inocula of pathogenic bacterial strains and the starter co-culture used for antimicrobial testing were obtained by preparing suspensions in BHI broth, from overnight cultures grown in BHI agar at 37 °C. Each strain or the starter co-culture was grown in BHI broth at 37 °C for 18 - 20 h (late exponential growth phase), harvested by centrifugation (4500 g, 15 min, 4 °C), washed twice in sterile BHI broth and re-suspended to obtain standard cell suspensions at which the OD reading at 660 nm (OD_{660}) was 0.1 and 0.8 to provide viable cell counts of approx. 10^8 CFU.mL^{-1} for pathogenic strains and starter co-culture, respectively (MacMahon et al., 2008; Wiegand, Hilpert & Hancock, 2008).

2.3 Chemical composition of OVEO

The chemical composition of OVEO was analyzed using a gas chromatography-mass spectrometry GCMS-QP2010 Ultra Shimadzu with a capillary RTX-5MS column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). Helium (high purity) was used as a carrier gas at a flow rate of 0.99 mL/min. The oven temperature was increased from 60°C to 240°C at a rate of 3°C/min. The injector and detector temperatures were maintained at 250°C. The injection volume was 1 μ L for OVEO diluted with hexane (1:10). The mass spectrometer was operated in electron impact mode with a source temperature of 200°C, an ionization energy of 70 V, and a scan variation of 40 m/z-500 m/z scans at 3.33/s. Identification of the individual components was based on a comparison with the mass spectra of library of GC/MS, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database (Version 1.7). The quantities of the constituents were calculated as the mean values of three injections and expressed as the area percentage (%).

2.4. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

MIC of OVEO against the co-culture of lactic acid starter bacteria and pathogenic bacteria was determined by microdilution in broth according to procedures described by the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) with minor modifications (CLSI, 2006; Wiegand, Hilpert & Hancock, 2008). Ninety-six-well plates were prepared by dispensing 50 μ L each of OVEO solutions (40-0.312 μ L.mL⁻¹). Then, 50 μ L of bacterial suspension (6 log CFU.mL⁻¹) were added to each well. The microplate was wrapped loosely with cling wrap to prevent bacterial dehydration and ensure that the OVEO would not volatilize. Each plate included controls without OVEO. The system was incubated at 37 °C for 24 h. After the incubation period, a 30 μ L aliquot of resazurin (0.01 g/100 L, w/v) (Inlab, Brazil) prepared in aqueous solution was added to each well. Color changes were then assessed visually after 20 min of incubation at 37 °C. Bacterial growth was indicated by a color change in each well from

purple to pink (or colorless). The MIC value was confirmed as the lowest concentration capable of inhibiting the growth of the strains.

2.5. Preparation of cheese-mimicking models

The effects of OVEO on bacterial cell viability were studied in a *coalho* cheese-based broth and in a semi-solid *coalho* cheese model with the purpose of simulating the environmental conditions found by microorganisms in the studied food matrix. The *coalho* cheese samples (four 500 g units from the same batch produced only by enzymatic coagulation with 0.9 mL/L chymosin without the addition of a mesophilic lactic acid culture) used for preparing the cheese broth and for the evaluation of the survival of bacteria in a food micromodel were purchased from a local retail supermarket in João Pessoa (Brazil). Before the assays, the hygienic-sanitary conditions of the cheese samples were assessed according to current sanitary standards established by the Brazilian legislation (Brazil, 2001), which establishes the limits of total and thermotolerant coliforms (45°C), coagulase-positive *Staphylococcus* (*S. aureus*), *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. Microbiological analyses were performed according to standard methods described elsewhere (APHA, 2001), and the obtained data demonstrated the satisfactory sanitary quality of the cheese samples according to the established criteria, including the absence of *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

To obtain a cheese-based broth, 160 g of the *coalho* cheese (previously macerated) were added to 1000 mL of sterile distilled water and hand-mixed with a sterile glass stem for 5 min to ensure even homogenization. Subsequently, the mixture was placed in a thermostatic water bath (42°C, for 50 min) and vacuum-filtered using Whatman nº 1 filters. The filtrate was sterilized in autoclave (121 °C, 1.1 atm, for 15 min) (Neviani, De Dea Lindner, Bernini & Gatti, 2009). The broth was stored at -20°C in aliquots of 50 mL, and when required, one aliquot was thawed under refrigeration ($7 \pm 1^\circ\text{C}$) and used for the assays.

The physico-chemical characterization (moisture, ash, fat, protein, and carbohydrate) of the cheese-based broth and of the *coalho* cheese (semi-solid cheese model) used as substrate in antimicrobial assays was performed according to standard procedures described elsewhere (AOAC, 2012). The values of the assessed parameters were as follows: moisture, 98.4 g/100 g; ash, 0.37 g/100 g; fat, 0.39 g/100 g; protein, 0.7 g/100 g and carbohydrates, 0.23 g/100 g for the cheese-based broth; and moisture, 46.5 g/100 g; ash, 4.57 g/100 g; fat, 6.35 g/100 g; protein, 22.17 g/100 g; and carbohydrates, 20.40 g/100 g for the cheese.

2.6. Effects of OVEO on bacterial cell viability in cheese-based broth

The effects of different concentrations of OVEO (0.6, 1.25, 2.5 and 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) on the cell viability of each tested bacterial suspension (each pathogenic bacterium or starter co-culture) in cheese based-broth were assessed over 24 h using the viable cell count procedure. Initially, 150 μL of the tested bacterial suspension (approximately 8 log CFU.mL⁻¹) were inoculated in 2850 μL of individual cheese-broth samples containing OVEO at the desired final concentration. The different systems (final viable cell counts of approximately 6 log CFU.mL⁻¹) were gently hand-shaken for 30 s and then incubated at 37 °C for 24 h. At intervals of 0 (immediately after the homogenization of the system), 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h of post-incubation (exposure time), an aliquot of 100 μL of each system was serially diluted in sterile saline solution, and then 20 μL of each dilution were dispensed in M17 agar base (Himedia, India) for counts of *Lactococcus* spp., in Baird-Parker agar + egg yolk solution and potassium tellurite (Himedia, India) for counts of *S. aureus* and in *Listeria* Agar Base + a selective supplement for *Listeria* II (Himedia, India) for counts of *L. monocytogenes*, using the microdrop inoculation technique (Herigstad, Hamilton & Heersink, 2001). Control systems without the addition of OVEO were assayed similarly. The plates were incubated at 37°C for 24 h. Plates inoculated with aliquots collected from the cheese broth containing OVEO were always incubated for 24

h longer than those obtained from control assays at an adequate temperature. The results were expressed as log CFU.mL⁻¹.

2.7. Effects of OVEO on bacterial cell viability in semi-soli cheese model

The effects of different concentrations of OVEO (0.6, 1.25 and 2.5 µL.g⁻¹) on the cell viability of each tested bacterial suspension (each pathogenic bacterium or starter co-culture) inoculated in the semi-solid cheese model were assessed over 72 h using the viable cell count procedure. Four different systems (with 0 h, 24 h, 48 h and 72 h of exposure time) containing 20 g of macerated *coalho* cheese (taken from the same macerated cheese pool), 10 mL of sterile saline solution, 1 mL of the tested bacterial suspension (approximately 8 log CFU.mL⁻¹) and OVEO at the desired final concentration were prepared and mixed with a sterile glass stem for 1 min to ensure even homogenization (final viable cell counts of approximately 6 log CFU.mL⁻¹). The systems were incubated at 10°C (proper storage temperature of *coalho* cheese). At each pre-established exposure time, 70 mL of sterile saline solution were added to the corresponding system (0 h - immediately after the homogenization of the system, 24 h, 48 h or 72 h), homogenized and serially diluted (10⁻¹–10⁻⁵) in sterile saline solution. Subsequently, 20 µL aliquots of each dilution were dispensed in M17 agar base (Himedia, India) for counts of *Lactococcus* spp., in Baird-Parker agar + egg yolk solution and potassium tellurite (Himedia, India) for counts of *S. aureus* and in *Listeria* Agar Base + selective supplement for *Listeria* II (Himedia, India) for counts of *L. monocytogenes*, using the microdrop inoculation technique (Herigstad, Hamilton & Heersink, 2001). Control systems without the addition of OVEO were assayed similarly. The plates were incubated at 37°C for 24 h. Plates inoculated with aliquots collected from the semi-solid cheese model containing OVEO were always incubated for 24 h longer than those obtained from the control assays at an adequate temperature. The results were expressed as log CFU.mL⁻¹.

2.8. Statistical analysis

Assays were performed in triplicate in three independent experiments, and the results were expressed as an average of the assays. The MIC results were expressed as modal values because no variation was observed between the replicated results (McMahon et al., 2008). Statistical analysis was performed to determine significant differences ($p \leq 0.05$) using ANOVA followed by Tukey's test with Sigma Stat 3.5 software (Jandel Scientific Software, San Jose, CA).

3. Results

Analysis of OVEO composition resulted in the identification of 19 compounds at amounts of higher than 0.1% of the total mass. Carvacrol (69.0%) was the major compound in OVEO, followed by thymol (14.12%), γ -terpinene (3.71%) and p-cymene (3.67%) (Table 1). Other compounds, such as linalool (2.73%), α -pinene (1.31%), mycerne (1.02%) and caryophyllene (0.68%), were found in minor amounts.

The MIC value of OVEO against both *S. aureus* and *L. monocytogenes* was 2.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, while against the mesophilic starter co-culture was 0.6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. The survival curves for the pathogenic and starter bacteria during cultivation in the presence of OVEO at 0.6, 1.25, 2.5 and 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ in the cheese-based broth over a period of 24 h are shown in Figure 1A-C. The systems containing OVEO always exhibited lower viable cell counts ($p \leq 0.05$) compared to the control systems (without OVEO).

The effects of OVEO at 0.6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ on cell viability of *S. aureus* and *L. monocytogenes* in cheese-based broth over 24 h of exposure were similar. OVEO at this concentration caused no decrease in viable cell counts of either pathogenic bacteria during the assessed time interval. However, the viable cell counts of the starter co-culture decreased approximately 1.0 log CFU.mL⁻¹ ($p \leq 0.05$) compared with the initial population (time zero) at the end of the assessed

time interval (Fig. 1A-C). The presence of OVEO at $1.25 \mu\text{L.mL}^{-1}$ in the cheese-based broth caused reductions in the initial counts (zero time) of nearly $1.8 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ in *L. monocytogenes* and $1.5 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ in *S. aureus* ($p \leq 0.05$) after 24 h of exposure (Fig. 1A-C). At this same concentration, OVEO caused a sharp decrease in the viable cell count of the starter co-culture after 4 h of exposure, and counts close to $2 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ were observed after 24 h of exposure (a reduction of approximately 4 log cycles of the initial count). Assays of the cheese-based broth containing OVEO at $2.5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ revealed reductions of up to $2.0 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ and $2.5 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ in the initial counts ($p \leq 0.05$) for *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively, after 24 h of exposure. Decreases in cell viability of both pathogenic strains tested occurred after as early as 2 h of exposure, and no recovery in the viable counts was observed for the remainder of the exposure time. OVEO at $2.5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ caused a reduction of approximately 4 log cycles in the initial counts of the starter co-culture after 1 h of exposure in the cheese-based broth.

When OVEO was assayed at $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$, a decrease in the viable cells counts of 3.3 and $3.7 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ was observed for *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively, after 24 h of exposure – with similarity to kill-time curve shapes obtained for the starter co-culture treated with OVEO at $1.25 \mu\text{L.mL}^{-1}$ (a reduction of higher than 3.0 log cycles of the initial population; $\geq 99.99\%$).

Bacterial cells (from the pathogenic strains and starter co-culture) cultivated in cheese-based broth without OVEO showed increases in the viable cell counts over the assessed time interval ($0.5\text{--}1.0 \log$ cycles after 24 h compared with the initial counts). Regarding these results, the OVEO at $1.25 \mu\text{L.mL}^{-1}$ had bactericidal effects ($\geq 3 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ reduction in the initial count, i.e. ≥ 99.99 killed) on the starter co-culture after 24 h of exposure, while this effect was only found for both *S. aureus* and *L. monocytogenes* when OVEO was tested at $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ (after 24 h).

The survival-curve shape of *S. aureus*, *L. monocytogenes* and starter co-culture in the semi-solid cheese model over 72 h (at 10°C) were assessed following exposure to OVEO at 0.6, 1.25 and 2.5 $\mu\text{L.g}^{-1}$. Although, OVEO at 2.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ caused a sharp decrease in the viable counts of the starter co-culture after 1 h of exposure in the cheese-based broth (Fig. 2A-C), this concentration was also evaluated in the semi-solid cheese model, considering the reported influences of food matrix components (mainly proteins and fat, which cause decreases in antimicrobial effects) on the antimicrobial efficacy of essential oils, as well as the difference of responses previous found in mimicking models.

Similarly to observed in assays using the cheese-based broth, the semi-solid cheese model systems containing OVEO consistently exhibited lower viable cell counts ($p \leq 0.05$) compared with control systems (without OVEO). The addition of OVEO at 0.6 $\mu\text{L.g}^{-1}$ to the semi-solid cheese-model did not cause reductions in the viable cell counts of *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *Lactococcus* spp. over time; otherwise, slight increases in the viable counts were noted over the assessed time (Fig. 2A-C). The addition of OVEO at 1.25 $\mu\text{L.g}^{-1}$ to the semi-solid cheese model resulted in decreases in the viable cell counts of *S. aureus* and *L. monocytogenes* of up to 1.5 CFU.g⁻¹ after 72 h of exposure. Under the same conditions, *Lactococcus* spp. showed a decrease in the viable cell count of approximately 2.0 log CFU.g⁻¹. Over the assessed time points, the viable cell counts of the *Lactococcus* spp. in the semi-solid cheese model containing OVEO at 1.25 $\mu\text{L.g}^{-1}$ were lower ($p \leq 0.05$) than those determined for both assayed pathogenic bacteria. Only the addition of OVEO at 2.5 $\mu\text{L.g}^{-1}$ to the semi-solid cheese model caused a sharp decrease in the viable cell count of *Lactococcus* spp. after 24 h of exposure. At the same OVEO concentration, reductions of 2.5 and 2.8 log CFU.g⁻¹ after 72 h of exposure were observed for *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively, compared with the initial counts.

4. Discussion

The composition profile of OVEO observed in the present study supports the findings of previous studies that describe carvacrol (CAR) as the major constituent of this essential oil (Azerêdo et al., 2011; Luz, Gomes Neto, Magnani & Souza, 2014; Krishnan et al., 2014). Although many individual components are present in OVEO, CAR has been related to its strong antibacterial activity against a range of pathogenic microorganisms (Luz et al., 2012; Burt, 2004; Nostro, Cannatelli, Musolino, Procopio & Alonzo, 2002), including *S. aureus* and *L. monocytogenes*. However, possible synergetic activity of CAR with minor individual components is considered to improve the antimicrobial properties of OVEO (Bajpai, Baek, & Kang, 2012).

With regard to the detected MIC values of OVEO, the mesophilic starter co-culture showed higher susceptibility to OVEO (2-fold lower) compared to *S. aureus* and *L. monocytogenes*. However, considering the well-accepted intrinsic two-fold variability in results achieved for MIC assays determined by dilution in solid or liquid media (Smith, Williamson, Wareham, Kaatz, & Gibbons, 2007), this higher sensitivity of the tested starter co-culture should be carefully considered. The MIC value of OVEO against *L. monocytogenes* and *S. aureus* determined in this study is similar to those reported in previous studies of the same essential oil and target bacteria (Azerêdo et al., 2011; Luz et al., 2013) however, there are no reports of a MIC value of OVOE against *Lactococcus* spp. in the literature.

Assays of food-mimicking models with candidate antimicrobial compounds such as OVEO may help to provide a more realistic picture of the efficacy of these compounds in food matrices (Luz et al., 2012). The assayed concentrations of OVEO in the cheese-based broth were based on values determined to be the minimum for inhibiting the growth of the pathogenic bacteria tested (MIC - 2.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) and its fractions ($1/2 \times \text{MIC}$ - 1.25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; and $1/4 \times \text{MIC}$

- 0.6 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$) because the main focus of studies involving the incorporation of EOs into food models has been the evaluation of antimicrobial activity against foodborne pathogens (Souza, Stamford, Lima & Trajano, 2007; Souza, Barros, Conceição, Gomes Neto & Costa, 2009; Oliveira, Stamford, Gomes Neto & Souza, 2010; Azêredo et al., 2011).

The inhibitory effects of OVEO on the survival of the tested pathogenic bacteria were lower than those observed for the starter co-culture in both of the cheese-mimicking models assayed (the cheese-based broth and semi-solid cheese model). Higher concentrations of OVEO were required to result in decreases of the same number of log cycles for all tested bacteria in the semi-solid *coalho* cheese model compared to cheese-based broth. This effect was more pronounced for *Lactococcus* spp. It is likely that the abilities of these bacteria to survive under environmental stress conditions imposed during the manufacturing and low-ripening of cheese (as occurs in *coalho* cheese) could also be involved in their responses to OVEO in the semi-solid *coalho* cheese model (Bourdichon et al., 2012; Cavanagh, Fitzgerald & McAuliffe, 2015). According to Holley and Patel (2005), the necessary concentration of essential oils to achieve an antimicrobial effect in food matrices is much higher than that under *in vitro* conditions. This difference can be partially explained because the content of nutrients in the semi-solid cheese model is higher compared to that in the cheese-based broth. It is known that high levels of fat and/or protein in foodstuffs (as found in the semi-solid cheese model) can protect bacteria from the action of EOs (Gutierrez, Barry-Ryan & Bourke, 2008). Proteins and fatty acids can react and bind to individual constituents of EOs, becoming unavailable to act in target cells (Burt, 2004). This interaction is particularly important if the cellular target of the antimicrobial compound is the cell membrane, as occurs with OVEO (Lambert, Skandamis, Coote & Nychas, 2001; Burt, 2004). Still, the physical structure of the cheese in the semi-solid model assayed could have influenced the dispersion of OVEO in the system, limiting its contact with bacterial cells and consequently, its antibacterial activity (Gutierrez et al., 2008; Gutierrez et al., 2009).

Moreover, the greater availability of nutrients in semi-solid cheese models compared to cheese-based broth may enable bacteria to repair damaged cells faster (Gill, Delaquis, Russo, & Holley, 2002; Burt, 2004).

Most studies reporting the antimicrobial activity of spices and EOs have involved pathogenic or spoilage microorganisms, and few reports of starter cultures, such as lactic acid bacteria, are available (Kivanç, Akgül, & Dogân, 1991). Previous reports have suggested that lactic acid bacteria are relatively resistant to the toxic effects of spices and EOs and that these compounds actually have stimulatory effects on these organisms and enhance acid production (Shelef, Naglik, & Bogen, 1980; Tiwari, & Pandey, 1981). In the present study, OVEO was found to decrease the viability of *Lactococcus* cells. A previous study has reported that exposure to oregano in synthetic media had no significant influence on the growth of *Lactobacillus plantarum* or *Leuconostoc mesenteroides*, and after 2 days of fermentation, it has been demonstrated to stimulate acid production by these starter culture. However, growth and acid production are strongly inhibited by exposure to OVEO at 150, 300 and 600 ppm (Kivanç, Akgül, & Dogân, 1991). Probably, the stimulatory effects previously observed on starter cultures were caused by natural spices rather than EOs, extracts or individual constituents.

5. Conclusions

OVEO exhibited inhibitory effects on the growth of *S. aureus* and *L. monocytogens*, as well as against a co-culture composed of *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*, which are used in the production of cheeses. The growth of the starter co-culture was more strongly affected by the assayed concentrations of OVEO than *S. aureus* and *L. monocytogens* in both the cheese-based broth and semi-solid cheese-based model. These results suggest that OVEO could represent an alternative for controlling pathogenic bacteria in semi-hard cheeses;

however, the concentrations used should be carefully evaluated because of its inhibitory effects on the growth and survival of the starter lactic acid culture used in the manufacture of this product and ultimately affect the development of desirable sensory properties during the low-ripening period.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) for the scholarships awarded to the first (Geany T. Souza) and second authors (Rayssa J. Carvalho).

References

- American Public Health Association - APHA. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington: APHA. 676p.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist - AOAC. (2012). (18th eds.). Washington. DC USA.
- Asensio, C. M., Grosso, N. R., & Juliani, H. R. (2015) Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential. *LWT-Food Science and Technology*, 60: 664-671.
- Azerêdo, G. A., Stamford, T. L. M., Nunes, P. C., Gomes Neto, N. J., Oliveira, M. E. G., & Souza, E. L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, 44, 1541-1548.
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45, 722–734.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., & Ouwehand, A. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal Food Microbiology*, 154, 87-97.

- Burall, L. S., Laksanalamai, P., & Datta, A. R. (2012). *Listeria monocytogenes* mutants with altered growth phenotypes at refrigeration temperature and high salt concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1265-1272.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Buriti, F. C. A., 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. *International Dairy Journal*, 15, 1279-1288.
- Brazil. Ministry of Health. National Health Surveillance Agency. RDC Resolution No. 12 of 02/01/2001. Technical Regulation On the Microbiological Standards for Foods.
- Cavanagh, D., Fitzgerald, F. G., & McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology*, 47, 45-61.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational vol. 32, document M100-S22. Wayne, PA: CLSI/NCCLS.
- Coelho, M. C., Silva, C. C. G., Ribeiro, S. C., Dapkevicius, M. L. N. E., & Rosa, H. J. D. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 191, 53-59.
- Europeam Food Safety Authority - EFSA. (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. EFSA 11, 1-250.
- Franco, W., Hsu, W. Y., & Simonne, A. H. (2010). Survival of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in mexican red salsa in a food service setting. *Journal of Food Protection*, 73, 116-120.
- Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P., & Holley, R. A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 83-92.

- Gilliss, D., Cronquist, A. B., Cartter, M., Tobin-D'angelo, M., Blythe, D., Smith, K., Lathrop, S., Zansky, S., Cieslak, P. R., Dunn, J., Holt, K. G., Lance, S., Crim, S. M., Henao, O. L., Patrick, M., Griffin, P. M., & Tauxe, R.V. (2013). Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US Sites, 1996-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 62, 283-287.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal Food Microbiology*, 124, 91-97.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26, 142-150.
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J., (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J. Microbiol. Methods*. 44, 121-129.
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement of shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22, 273-292.
- Kivanç, M., Akgül, A., & Dogan, A. (1991). Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Food Microbiology*, 13, 81-85.
- Krishnan, K. R., Babuskin, S., Babu, P. A. S., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G., Sivarajan, M., & Sukumar, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 32-40.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-62.
- Le, S., Bazger, W., Hill, A. R., & Wilcock, A. (2014). Awareness and perceptions of food safety of artisan cheese makers in Southwestern Ontario: A qualitative study. *Food Control*, 41, 158-167.

- Luz, S. I., Gomes Neto, N. J., Tavares, A. G., Magnani, M., & Souza, E. L. (2012). Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. *Food Research International*, 48, 667-672.
- Luz, I. S., Gomes-Neto, N. J., Tavares, A. G., Nunes, P. C., Magnani, M., & Souza, E. L. (2013). Lack of induction of direct protection or cross-protection in *Staphylococcus aureus* by sublethal concentrations of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol in a meat-based medium. *Archives of Microbiology*, 195, 587-593.
- Luz, S. I., Gomes Neto, Magnani, M., & Souza, E. L. (2014). Assessment of tolerance induction by *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in *Pseudomonas aeruginosa* cultivated in a meat-based broth and in a meat model. *Food Science and Technology International*, DOI: 10.1177/1082013214554467.
- Machado, G. M., Costa, R. G. B., Costa-Junior, L. C. G., Sobral, D., Taviera, L. B., & Souza, B. M. (2011). Physico-chemical aspects of coalho cheese manufactured with lactic acid. *Nutrition and Foods*, 3, 421-428.
- McMahon, M. A. S., Tunney, M. M., Moore, J. E., Blair, I. S., Gilpin, D. F., & Macdowell, D. A. (2008). Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *Letters in Applied Microbiology*, 47, 263-268.
- Monte, D. F. M., Tavares, A. G., Albuquerque, A. R., Sampaio, F. C., Oliveira, T. C. R. M., Franco, O. L., Souza, E. L., & Magnani, M. (2014). Tolerance response of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains to habituation to *Origanum vulgare* L. essential oil. *Frontiers in Microbiology*, DOI 10.3389/fmicb.2014.00721.
- Neviani, E., De Dea Lindner, J., Bernini, V., & Gatti, M. (2009). Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural medium. *Food Microbiology*, 26, 240-245.
- Nostro, A., Cannatelli, M. A., Musolino, A. D., Procopio, F., & Alonzo, V. (2002). *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 181-184.

- Oliveira, M. E. G., Garcia, E. F., Queiroga, R. C. R. E., & Souza, E. L. (2012). Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *Scientia Agriculturae*, 69, 370-379.
- Oliveira, C. E. V., Stamford, T. L. M., Gomes Neto, N. J., & Souza, E. L. S. (2010). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 312-316.
- 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 Science and Technology*, 53, 409-417.
- Pimentel-Filho, N. J., Mantovani, H. C., Carvalho, A. F., Dias, R. S., & Vanetti, M. C. D. (2014). Efficacy of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 416-422.
- Queiroga, R. C. R. E., Santos, B. M., Gomes, A. M. P., Monteiro, M. J., Teixeira, S. M., & Souza, E. L. (2013). Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats, 'cows' milk and their mixture. *LWT – Food Science and Technology*, 50, 538-544.
- Shelef, L. A., Naglik, O. A., & Bogen, D. W. (1980). Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary, and all spice. *Journal of Food Science*, 45, 1042-1044.
- Silva, M. C. D., Ramos, A. C. S., Moreno, I., & Moraes, J. O. (2010). Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 69, 214-221, 2010.
- Smith, E. C. J., Williamson, E. M., Wareham, N., Kaatz, G. W., & Gibbons, S. (2007). Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytochemistry*, 68, 210-217.
- Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O., & Trajano, V. N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18, 409-413.

- Souza, E. L., Barros, J. C., Conceição, M. L., Gomes Neto, N. J., & Costa, A. C. V. (2009). Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 387-393.
- Tiwari, K. P., & Pandey, A., (1981). Effect of some spices on acid production by starter cultures. *Journal of Food Protection*, 42, 572-576.
- Wang, X., Tao, X., Xia, X., Yang, B., Xi, M., Meng, J., Zhang, J., & Xu, B. (2013) *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken in China. *Food Control*, 29,103-106.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3, 163-175.
- Zeleny, R., Emteborg, H., Charoud-Got, J., Schimmel, H., Nia, Y., Mutel, I., Ostyn, A., Herbin, S., & Hennekinne, J. A. (2015). Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin a in cheese: Feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. *Food Chemistry*, 168, 241-2.

Table

Table 1. Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) analysis of the essential oil from *Origanum vulgare* L.

Figure Caption

Fig. 1. Viable cell counts of *S. aureus* (A), *L. monocytogenes* (B) and mesophilic starter co-culture (C) in *coalho* cheese based-broth at 37 °C as a function of the *Origanum vulgare* L. essential oil concentration: (●): 0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (○) 0.6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (▲): 1.25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (▽): 2.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; (◆): 5.0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Detection limit of the test: 2.0 log CFU.mL⁻¹

Fig. 2. Viable cell counts of *S. aureus* (A), *L. monocytogenes* (B) and *Lactococcus* spp. (C) in semi-solid *coalho* cheese model at 10 °C as a function of the *Origanum vulgare* L. essential oil concentration: (●): 0 $\mu\text{L.g}^{-1}$; (○): 0.6 $\mu\text{L.g}^{-1}$; (▲): 1.25 $\mu\text{L.g}^{-1}$; (▽): 2.5 $\mu\text{L.g}^{-1}$. Detection limit of the test: 2.0 log CFU.g⁻¹

Peaks	Compound	Area (%)
1	carvacrol	69.0
2	thymol	14.12
3	γ -terpinene	3.71
4	p-cymene	3.67
5	linalool	2.73
6	α -pinene	1.31
7	α -thujene	0.27
8	camphene	0.31
9	mycerne	1.02
10	α -terpinene	0.51
11	limonene	0.07
12	eucalyptol	0.28
13	camphor	0.15
14	borneol	0.22
15	thymol methyl ether	0.18
16	anethole	0.6
17	caryophyllene	0.68
18	caryophyllene oxide	0.62
19	β -pinene	0.54

Fig. 1.

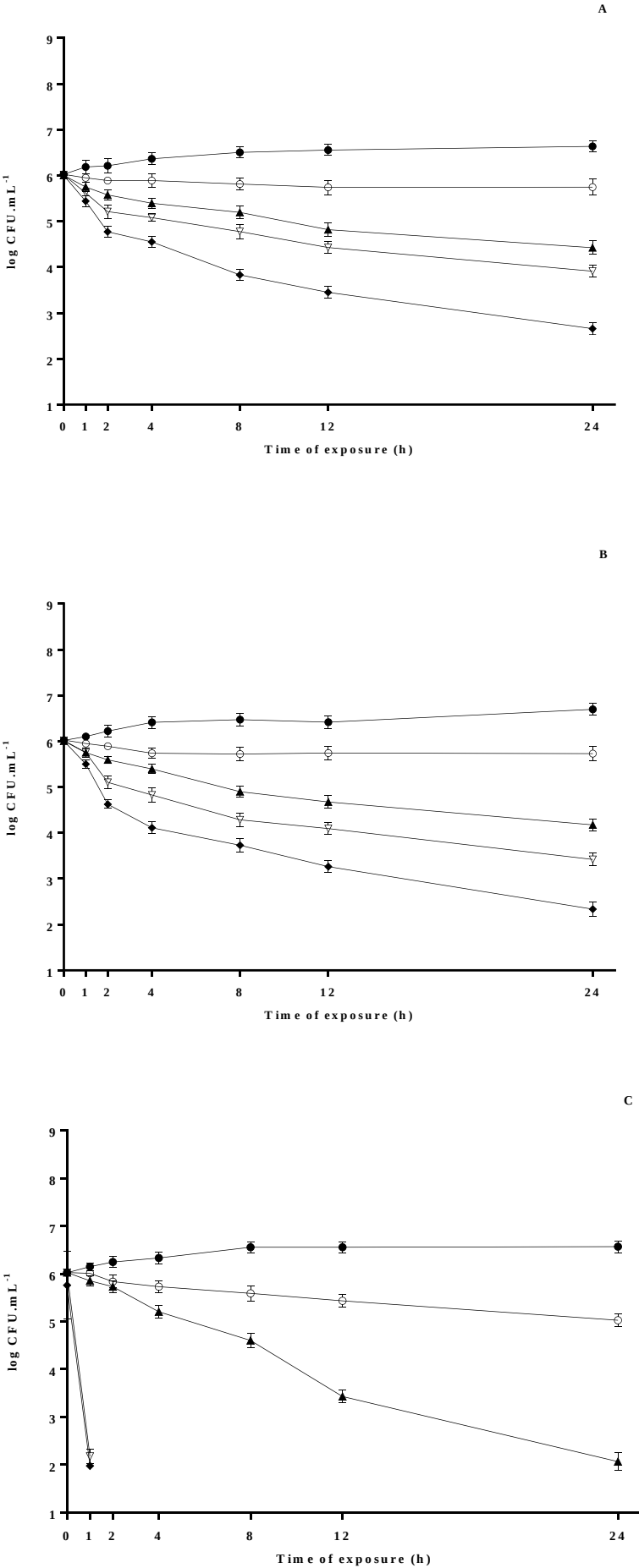
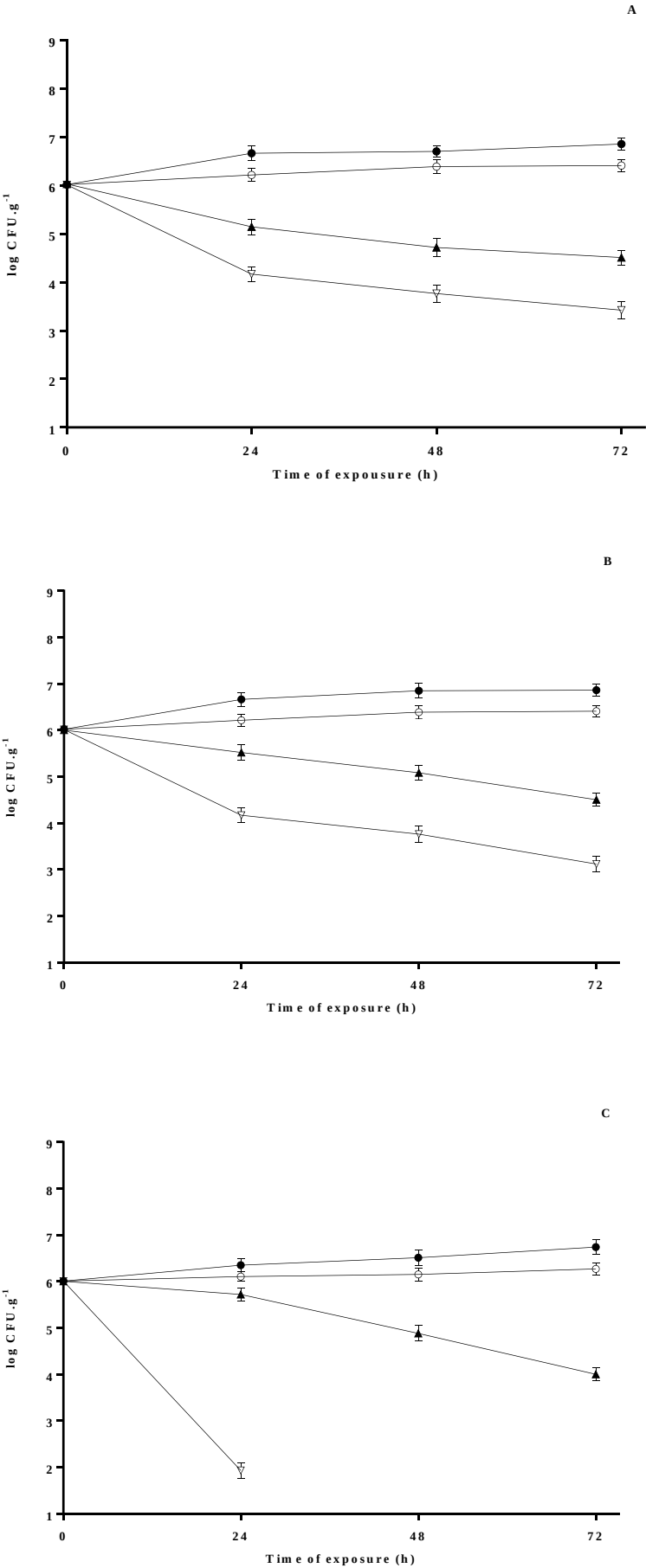


Fig. 2.



ANEXO

Ficha técnica do óleo essencial *Origanum vulgare* L.

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química / Colegiado de Extensão
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

UFMG

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

Nome comercial: Orégano orgânico.

Lote: szb1206

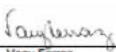
Nomenclatura botânica: *Origanum vulgare*.

Extração: Destilação por arraste a vapor.

Método de cultivo: orgânico certificado.

Parte da planta: folhas.

Origem: Hungria.


Dra. Vany Ferraz
Laboratório de Cromatografia
Departamento de Química – UFMG
vanyferraz@ufmg.br
Belo Horizonte