



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Marília Gonçalves Cattelan

Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias em  
alimentos

São José do Rio Preto

2012

**MARÍLIA GONÇALVES CATTELAN**

Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias em  
alimentos

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

São José do Rio Preto

2012

Cattelan, Marília Gonçalves.

Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias em alimentos / Marília Gonçalves Cattelan. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

58 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Fernando Leite Hoffmann

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Alimentos – Microbiologia. 3. Óleos e gorduras - Microbiologia. I. Hoffmann, Fernando Leite. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 579.67

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE

Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Marília Gonçalves Cattelan

Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias em  
alimentos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Profa. Dra. Maria Luiza Silva Fazio  
IMES – Catanduva

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
16/fevereiro/2012

*A Deus, pai da vida, por tudo que me proporciona nesta existência.*

*Aos meus pais, Grácia e José Wanderley, pelo amor, carinho, dedicação,  
paciência e oportunidade de estudo.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades na vida.

Aos mestres Jesus e Maria, exemplos de amor a serem seguidos.

Ao Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, pela acolhida, paciência, dedicação e ensinamentos, mesmo em momentos delicados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro por meio de bolsa concedida.

Aos professores doutores Maria Luiza Silva Fazio, Crispin Humberto Garcia-Cruz, Margarete Tereza Gottardo de Almeida e Alexandre Rodrigo Coelho pelas correções e sugestões na pesquisa.

Aos meus pais, Grácia e José, e aos meus irmãos, Rafael e Renan, pelo amor incondicional.

A Priscila Juliana Pinsetta Sales, pela poesia e prosa.

Ao meu mentor espiritual, que me conduz e ampara ao longo dos meus caminhos.

Aos meus familiares pelas alegrias e momentos compartilhados.

Às minhas amigas-irmãs Lilian Lee e Caroline A. Cunha, que mesmo distantes continuam sempre por perto.

A amiga Aline Teodoro de Paula, pela amizade, carinho, compreensão e auxílio.

Ao Maurício B. M. de Castilhos, pelo aprendizado e amizade.

Aos amigos Juliana Rezende, Gisele Bueno, Sabrina Casarotti, Fábila Lavoyer, Janaína Alves dos Reis, Catharina Calochi, Tatiane Silva, Larissa Zuanon, Caroline Aranha, Juliane Viganó, Camila Rocha, Cássia Malacrida e Juliano Borsato, pelos “delírios verbais” e por tornarem os dias mais alegres.

A Tânia M. V. Gonçalves e ao Ginaldo V. dos Santos, amigos e instrutores de técnicas e vida.

A família Hoffmann, por toda paciência e disponibilidade.

Aos amigos do GAEBEM (Grupo de Amparo Espiritual Bezerra de Menezes), por todo carinho e ensinamentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos.

A todos aqueles que são parte de quem eu sou.

*Meus sinceros agradecimentos.*

*“Penso que não cegamos, penso que estamos cegos, Cegos que vêem, Cegos  
que, vendo, não vêem”*

(José Saramago – Ensaio sobre a cegueira)

## RESUMO

É crescente o número de consumidores que têm exigido da indústria alimentícia a adoção de políticas que visem à segurança de seus produtos. Dentro deste âmbito, a adoção de medidas que reduzam o uso de aditivos químicos torna-se cada vez mais iminente. Verifica-se um crescente interesse em pesquisas pela busca de compostos alternativos para um emprego racional como conservantes de alimentos, dentre os quais pode-se destacar o uso de especiarias, seus óleos e extratos como agentes antimicrobianos.

O presente estudo teve por intuito avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de óleos essenciais de algumas especiarias, em concentrações de 1%, 2% e 5% (v/v), sobre bactérias contaminantes de alimentos. O estudo *in situ* foi realizado com o óleo essencial que resultou em maior inibição bacteriana *in vitro*. Fez-se uso amostras comerciais de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), coentro (*Coriandrum sativum* L.), cravo (*Eugenia caryophyllata* Thumb), manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), sálvia (*Salvia officinalis*) e tomilho (*Thymus vulgares* L.), sobre as seguintes cepas de micro-organismos: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

O estudo da atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais foi efetuado por meio do procedimento de difusão em meio sólido, por disco e por poço. Os micro-organismos foram inoculados na concentração de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Halos de inibição superiores a 10 mm foram considerados significativos de atividade antibacteriana.

Para o estudo da atividade antibacteriana *in situ* optou-se pela utilização do óleo essencial que resultou na maior atividade antimicrobiana sobre as distintas cepas de contaminantes alimentícios empregados no estudo *in vitro*. Com relação

ao micro-organismo a ser empregado, a bactéria *E. coli* foi a escolhida por apresentar altos índices de incidência em produtos alimentícios.

O sistema alimentício empregado foi o queijo tipo Minas Frescal, produzido com a adição das três concentrações do óleo essencial mencionado e sem a adição do óleo (controle). Os queijos foram contaminados com  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>, ao serem embalados, e a contagem de *E. coli* foi avaliada durante o período de armazenamento do produto.

Os resultados obtidos demonstraram que o óleo que apresentou maior atividade antibacteriana foi o de orégano, em diferentes concentrações. Óleos essenciais de cravo e de tomilho também propiciaram inibição microbiana. O micro-organismo mais resistente foi a *P. aeruginosa*, não inibido por qualquer composto empregado.

Na avaliação da atividade antibacteriana *in situ* o óleo essencial de orégano propiciou a redução da contagem de *Escherichia coli*, principalmente na concentração de 5%, havendo o decréscimo na contagem microbiana de cinco ciclos logarítmicos.

Palavras-chave: ação antimicrobiana, especiarias, contaminantes de alimento

## ABSTRACT

*The study aimed to evaluate the antibacterial activity in vitro of essential oils of some spices in concentrations of 1%, 2% and 5% on foodborne pathogens. Commercial samples of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), clove (*Eugenia caryophyllata* Thumb), basil (*Ocimum basilicum* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgares* L.) was evaluated against the following strains of microorganisms: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).*

*Antibacterial activity in vitro of essential oils was carried out by the diffusion method, for disk and well. The microorganisms were inoculated at a concentration of  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Inhibition halos exceeding 10 mm were considered significant for antibacterial activity.*

*Antibacterial activity in situ was evaluated using the essential oil which resulted in the highest antimicrobial activity in vitro. Regarding the micro-organism to be used, the bacterium *E. coli* was chosen because it has high incidence rates in food products. Minas Frescal cheeses were produced with the addition of three concentrations of essential oil mentioned and without the addition of oil (control). The cheeses were contaminated with  $10^8$  CFU.g<sup>-1</sup>, at package, and the count of *E. coli* was evaluated during product storage.*

*Results showed highest bacterial activity for the oregano oil. Essential oils of clove and thyme also presented microbial inhibition. The most resistant microorganism, *P. aeruginosa*, wasn't inhibited by any compound. In situ antibacterial activity of oregano essential oil led to the reduction of *Escherichia coli* counts, especially at a concentration of 5%, with the decrease in microbial count of five log cycles.*

*Keywords: antimicrobial action, spices, food contaminants.*

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>3</b>
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos específicos	3
<b>3</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>4</b>
3.1	Considerações Gerais	4
3.2	Especiarias	5
3.2.1	Definição e legislação	5
3.2.2	Histórico	5
3.3	Atividade antimicrobiana de especiarias	7
3.4	Mecanismo de ação antimicrobiana	11
3.5	<i>Escherichia coli</i>	12
3.6	Queijo tipo Minas Frescal	13
<b>4</b>	<b>Material e Métodos</b>	<b>15</b>
4.1	Obtenção dos micro-organismos	15
4.2	Obtenção dos óleos essenciais	15
4.3	Preparação dos inóculos	15
4.4	Óleos essenciais	15
4.5	Ensaio de resistência in vitro	16
4.5.1	Técnica de difusão em disco	16
4.5.2	Técnica de difusão em poço	16
4.6	Ensaio de resistência in situ	17
4.6.1	Controle do leite empregado no estudo <i>in situ</i>	17
4.6.2	Análises do leite	17
4.6.2.1	Análises microbiológicas	17

4.6.2.2 Análises físico-químicas do leite .....	18
4.6.3 Fabricação do Queijo tipo Minas Frescal .....	18
4.6.4 Inoculação do queijo com <i>Escherichia coli</i> .....	20
4.6.5 Contagem de <i>E. coli</i> no Queijo tipo Minas Frescal.....	20
4.6.6 Análises físico-químicas do queijo .....	20
4.7 Planejamento Experimental .....	21
<b>5 Resultados e Discussão .....</b>	<b>22</b>
5.1 Ensaio de resistência antibacteriana in vitro .....	22
5.2 Perfil físico-químico do leite empregado na elaboração do Queijo tipo Minas Frescal.....	30
5.3 Perfil microbiológico do leite.....	30
5.4 Perfis físico-químicos dos queijos .....	31
5.5 Ensaio de resistência antibacteriana in situ .....	31
<b>6 Conclusões .....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 1</b>	Fluxograma de processo de fabricação do queijo tipo Minas Frescal com e sem adição de óleo essencial (1%, 2% e 5%) e inoculação com <i>E. coli</i> .....	19
<b>Figura 2</b>	Média dos resultados do ensaio de resistência da cepa de <i>E. coli</i> (ATCC 8739) frente aos óleos essenciais empregados.....	25
<b>Figura 3</b>	Média dos resultados do ensaio de resistência da cepa de <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) frente aos óleos essenciais empregados.....	26
<b>Figura 4</b>	Média dos resultados do ensaio de resistência da cepa de <i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028) frente aos óleos essenciais empregados.....	27
<b>Figura 5</b>	Média dos resultados do ensaio de resistência da cepa de <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633) frente aos óleos essenciais empregados.....	28
<b>Figura 6</b>	Resultados médios do ensaio de resistência da cepa de <i>B. cereus</i> (ATCC 11778) frente aos óleos essenciais empregados.....	29
<b>Figura 7</b>	Contagem de <i>E. coli</i> em queijo tipo Minas Frescal durante o período de armazenamento.....	32

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Componentes majoritários de óleos essenciais selecionados que exibem propriedades antibacterianas.....	08
<b>Tabela 2</b>	Eficácia de agentes antimicrobianos naturais empregados em alimentos.....	09
<b>Tabela 3</b>	Ensaio de resistência bacteriana aos óleos essenciais.....	24
<b>Tabela 4</b>	Perfil físico-químico do leite empregado na produção do Queijo tipo Minas Frescal.....	30
<b>Tabela 5</b>	Perfis físico-químicos dos queijos produzidos.....	31
<b>Tabela 6</b>	Contagem de <i>E. coli</i> nos queijos ao longo do período de armazenamento.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>DTA</b>	Doença transmitida por alimento
<b>MHA</b>	Ágar Müller-Hinton
<b>OEO</b>	Óleo essencial de orégano
<b>PCA</b>	Ágar para contagem padrão
<b>UFC ou CFU</b>	Unidades Formadoras de Colônia
<b>ETEC</b>	<i>E. coli</i> enterotoxigênicas
<b>EPEC</b>	<i>E. coli</i> enteropatogênicas
<b>STEC</b>	<i>E. coli Shiga</i> toxigênica
<b>VTEC</b>	
<b>DAEC</b>	<i>E. coli</i> de aderência difusa
<b>EIEC</b>	<i>E. coli</i> enteroinvasivas
<b>EaggEC</b>	<i>E. coli</i> enteroagregativas
<b>EAEC</b>	
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>EMB</b>	Agar Eosina Azul de Metileno

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>° C</b>	Temperatura na escala Graus Celsius
<b>ATP</b>	Adenosina tri-fosfato
<b>Aw</b>	Atividade de água
<b>g</b>	grama
<b>h</b>	hora
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mM</b>	mili-mol
<b>NMP</b>	Número Mais Provável
<b>p/p</b>	Relação peso/peso
<b>p/v</b>	Relação peso/volume
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>v/p</b>	Relação volume/peso
<b>v/v</b>	Relação volume/volume
<b>μL</b>	Microlitro
<b>κ</b>	Letra grega Kappa

## 1 Introdução

Com o decorrer dos anos, tornou-se crescente a adoção de políticas que visem à segurança alimentar dos produtos industrializados. Embora a indústria faça uso de diferentes técnicas para garantir a qualidade e inocuidade dos produtos alimentares, as doenças transmitidas por alimentos (DTA) continuam sendo um problema de saúde pública (JAY, 2005).

Diversos surtos alimentares causados por *E. coli* são mencionados na literatura. O patógeno pode estar presente em alimentos que vão desde carne bovina, de aves e leite, causando gastroenterites (SOFIA et al., 2007). Embora a presença de *E. coli* em alimentos seja indesejável, por se tratar de um indicador de contaminação de origem fecal, sua eliminação de todos os alimentos frescos e refrigerados é praticamente impossível (JAY, 2005).

Um dos alimentos que pode causar toxinfecção em humanos é o queijo tipo Minas Frescal, quando contaminado por bactérias patogênicas, em razão das péssimas condições de produção e/ou comercialização. Trata-se de um produto de grande aceitação, consumo e produção nacionais (HOFFMANN et al., 2002). Escassos são os estudos de ação *in situ* de óleos essenciais de especiarias em queijos. Porém, Govaris et al. (2011) demonstraram que óleos essenciais de orégano e tomilho em queijo Feta, em concentração de 0,1mL/100g, possuem ação antibacteriana sobre *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7.

Dentre as formas de controle da proliferação microbiana em alimentos pode-se mencionar o uso de aditivos químicos e emprego de compostos naturais como conservantes, com ou sem o auxílio da tecnologia de barreiras. Porém, a suspeita sobre a toxicidade de alguns aditivos químicos em produtos e o abuso de utilização de tais compostos têm demandado medidas legislativas cada vez mais enérgicas no panorama mundial (MOREIRA et al., 2005; IVANOVIC et al., 2012). Por conseguinte, há um crescente interesse em pesquisas pela busca de compostos alternativos para um emprego racional como conservantes de alimentos (GUTIERREZ et al., 2009).

O constante interesse na ação inibitória de especiarias e seus óleos essenciais nos diferentes micro-organismos é evidenciado em diversos estudos, e é atribuído basicamente a duas razões: o questionamento incessante sobre a segurança dos aditivos químicos, gerando uma tendência ao uso de substâncias naturais de plantas, e a redução dos teores de sal e açúcar em alimentos por razões dietéticas, o que tende a aumentar o uso de outros temperos (TRAJANO et al., 2009).

Extratos naturais e óleos essenciais são utilizados para aumentar a vida-de-prateleira e melhorar as características sensoriais de alimentos. Algumas plantas, seus extratos e/ou princípios ativos possuem atividade antibacteriana demonstrada em estudos laboratoriais (HOFFMANN et al., 1999; BURT, 2004; USHIMARU et al., 2007; ALVES et al., 2008; YOSSA et al., 2010; IVANOVIC et al., 2012).

O presente estudo busca, portanto, propiciar resultados relevantes sobre a atividade antibacteriana *in vitro* de alguns óleos essenciais de especiarias sobre contaminantes microbiológicos de alimentos. Também fora efetuado o estudo *in situ*, empregando-se um dos óleos essenciais em queijo tipo Minas Frescal contaminado com o micro-organismo *Escherichia coli*.

## 2 Objetivos

O objetivo geral e os objetivos específicos do presente trabalho são descritos a seguir.

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias sobre cepas bacterianas contaminantes de alimentos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudar a atividade antibacteriana *in vitro* de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), coentro (*Coriandrum sativum* L.), cravo (*Eugenia caryophyllata* Thumb), manjericão (*Ocimum basilicum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), sálvia (*Salvia officinalis*) e tomilho (*Thymus vulgares* L.) sobre os seguintes micro-organismos: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
- Estudar duas técnicas de triagem para avaliação da eficácia na atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de especiarias sobre os micro-organismos por meio dos métodos de difusão em ágar por disco e por poço.
- Avaliar o efeito antibacteriano *in situ* de óleo essencial de orégano em queijo tipo Minas Frescal contaminado com *Escherichia coli* (ATCC 8739) durante o período de armazenamento do produto (2°, 4°, 8° e 14° dia).

### 3 Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Considerações Gerais

A incidência global das doenças de origem alimentar é difícil de ser estimada. Porém, de acordo com dados do ano de 2005 da *World Health Organization* (WHO, 2007) aproximadamente 1,8 milhões de pessoas morreram em decorrência de doenças diarreicas.

A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) tornou-se foco de discussões nos últimos anos, devido à preocupação mundial com estratégias que permitam seu controle e, conseqüentemente, garantam a colocação de produtos seguros no mercado consumidor. As alterações no perfil epidemiológico de enfermidades transmitidas por alimentos são devidas à expansão do mercado consumidor, a globalização econômica, alterações dos hábitos alimentares e aumento no consumo de alimentos industrializados ou produzidos fora do lar (SHINOHARA et al., 2008).

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos no Brasil ainda é pouco conhecido, sendo que somente alguns estados e/ou municípios dispõem de estatísticas e levantamentos reais sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais freqüentemente envolvidos e fatores contribuintes. Além disso, doenças transmitidas por alimentos nem sempre são oficialmente notificadas (VAN OMSON et al., 2006). Dentre os micro-organismos envolvidos em doenças, pode-se destacar *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* e *B. subtilis* (RANDRIANARIVELO et al., 2000 *apud* MATASYOH et al., 2007).

É crescente o número de consumidores que têm exigido a adoção de políticas que visem à segurança alimentar. Por conseguinte, a adoção de medidas que reduzam o emprego de aditivos químicos em alimentos torna-se extremamente necessária (MOREIRA et al., 2005).

A suspeita sobre a toxicidade de alguns aditivos químicos em produtos e o abuso na utilização destes compostos têm demandado medidas legislativas cada vez mais severas no panorama mundial. Em consequência, há um crescente

interesse em pesquisas pela busca de compostos alternativos aos aditivos químicos para um emprego racional como conservantes de alimentos (GUTIERREZ et al., 2009).

O uso de antimicrobianos naturais, como temperos, condimentos e extratos vegetais tende a ser uma alternativa eficaz, principalmente quando empregado em combinação com outras tecnologias já existentes (BURT, 2004; ISAACS et al., 2005; NAZER et al., 2005; DUPONT et al., 2006 *apud* SILVA et al., 2010)

## **3.2 Especiarias**

### **3.2.1 Definição e legislação**

De acordo com a legislação vigente no Brasil, Regulamento Técnico para Especiarias, Temperos e Molhos, “especiarias são produtos constituídos por partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes, talos) de uma ou mais espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas” (BRASIL, 2005). Dentre as espécies vegetais descritas na referida legislação, pode-se destacar as que são de interesse no estudo em questão.

### **3.2.2 Histórico**

Ao longo da história verifica-se a existência de exemplos bem documentados de pessoas que faziam uso de plantas medicinais. Dentre eles, pode-se mencionar Hipócrates, na medicina grega, Avicena, na árabe, e Paracelso, na européia (GÓMEZ CAAMAÑO, 1990). No âmbito alimentar, especiarias são utilizadas desde a antiguidade no Oriente com o intuito de aromatizar alimentos e bebidas, ou de mascarar propriedades indesejadas em produtos cárneos.

Muitas vezes oriundos de regiões banhadas pelos oceanos Índico e Pacífico, chegando à casa de Imperadores e famílias modestas, os condimentos vegetais foram adquirindo importância, tornando-se indispensáveis à vida destes povos, seja por ligação em rituais, por sua utilização como temperos de alimentos ou mesmo em medicina (MENDES, 1993).

Segundo Giacometti (1989), a história do uso de ervas aromáticas pelo homem pode ser dividida em quatro períodos: o da Antiguidade; o das civilizações clássicas dos gregos e romanos; o da Idade Média, que inclui grandes explorações e o colonialismo; e o dos tempos modernos.

Com o passar do tempo, o consumo foi se expandindo, e o valor das ervas aromáticas era tão alto que possuí-las era tão importante quanto possuir ouro. O consumo de ervas aromáticas fez, em tempos decorridos, a opulência de cidades como Veneza e Gênova. Na busca por especiarias nas Índias, foram descobertos territórios da África, os Açores, as Ilhas de Cabo Verde, a América e, finalmente, o Brasil (OURIVES, 1997).

No contexto atual, a adição de especiarias permanece como uma prática crescente e amplamente difundida. Especiarias são utilizadas de modo seguro no mundo todo com o intuito de aumentar a vida-de-prateleira e melhorar as características sensoriais de alimentos (PIRBALOUTI et al., 2010).

Algumas plantas, seus extratos e/ou princípios ativos possuem atividade antibacteriana relatada em diversos estudos (ARORA; KAUR, 1999; NASCIMENTO et al., 2000; BURT et al., 2004; HOLLEY; PATEL, 2005; FAZIO et al., 2009; IVANOVIC et al., 2012). As ervas possuem níveis distintos de atividade biológica sendo, porém, efetivas contra micro-organismos em distintas concentrações (PIRES et al., 2009). De acordo com Holley e Patel (2005), a performance antimicrobiana de óleos essenciais sobre contaminantes alimentícios pode variar de acordo com o ensaio empregado.

### **3.3 Atividade antimicrobiana de especiarias**

O constante interesse na ação inibitória de especiarias e seus óleos essenciais nos diferentes micro-organismos é evidenciado em diversos estudos, e é atribuído basicamente a duas razões: o questionamento incessante sobre a segurança dos aditivos químicos, existindo uma tendência ao uso de substâncias naturais de plantas, e a redução dos teores de sal e açúcar em alimentos por razões dietéticas, o que tende a aumentar o uso de outros temperos (TRAJANO et al., 2009).

De acordo com Devlieghere e colaboradores (2004), novas tecnologias na preservação de alimentos incluem radiação ionizante, alta pressão hidrostática, atmosfera modificada, embalagens ativas, biopreservação e compostos antimicrobianos naturais. Diversos autores têm focado seus estudos na atividade antimicrobiana das especiarias, bem como de seus óleos essenciais, que progressivamente têm sido adicionados aos alimentos como aromatizantes.

A tabela 1, adaptada de Burt (2004), ilustra os componentes majoritários de alguns óleos essenciais com propriedades antibacterianas.

**Tabela 1** – Componentes majoritários de óleos essenciais selecionados que exibem propriedades antibacterianas\*

Nome do óleo essencial	Nome científico	Componentes majoritários	Composição aproximada (%)
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	$\alpha$ -pineno Bornil acetato Cânfora 1,8-Cineol	2 – 25 0 – 17 2 – 14 3 – 89
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalol E-2-Decanal	70 ---
Cravo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol Eugenil acetato	75 – 85 8 – 15
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol Timol $\gamma$ -Terpineno $\rho$ -Cimeno	Traços – 80 Traços – 64 2 – 52 Traços – 52
Sálvia	<i>Salvia officinalis L.</i>	Cânfora $\alpha$ -pineno $\beta$ -pineno 1,8-Cineol	6 – 15 4 – 5 2 – 10 6 – 14
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol Carvacrol $\gamma$ -Terpineno $\rho$ -Cimeno	10 – 64 2 – 11 2 – 31 10 – 56

\* Adaptada de Burt (2004).

Os componentes bioativos de especiarias possuem atividade antimicrobiana bem documentada, com atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (HOLLEY; PATEL, 2005; GUTIERREZ et al., 2009; FERREIRA et al., 2010; SILVA et al., 2010). Porém, de acordo com Burt (2004), óleos essenciais de especiarias são geralmente mais efetivos contra bactérias Gram-positivas.

A diversidade de espécies de especiarias com atividade antimicrobiana permite uma ampla variedade de estudos em áreas distintas. Os estudos recentes buscam um antimicrobiano ideal, ou seja, aquele que apresenta maior espectro de ação, menores toxicidade, custo e índice de resistência bacteriana (ALVARENGA et al., 2007). A tabela 2 traz dados sobre a eficácia de antimicrobianos naturais de plantas, quando empregados em alimentos.

**Tabela 2** – Eficácia de agentes antimicrobianos naturais empregados em alimentos \*

<b>Agente antimicrobiano</b>	<b>Concentração</b>	<b>Alimento</b>	<b>Micro-organismo</b>	<b>Efeito</b>
Óleo de alecrim	1%	Linguiça fresca de porco	<i>L. monocytogenes</i>	b
Óleo de cravo	1% (v/v)	Queijos com baixos teores lipídicos	<i>L. monocytogenes</i>	a
Óleo de manjeriço	1% (p/v)	Molho de Massas	<i>Shigella spp.</i>	b,c
Orégano	≤ 1%	Maionese	<i>E. coli O157:H7</i>	c
Óleo de orégano	0,8% (v/p)	Filé de carne bovina	<i>S. thyphimurium</i>	a
Sálvia	≤ 2,5% (p/p)	Alimentos infantis, arroz cozido	<i>S. thyphimurium</i> <i>S. aureus</i> <i>B. cereus</i>	b
Tomilho	1% (p/v)	Salsicha	<i>Shigella spp.</i>	b, c

(a) Efeito bactericida; (b) efeito bacteriostático; (c) pouco ou nenhum efeito.

\* Adaptada de Holley e Patel (2005).

No âmbito da Ciência e Tecnologia de Alimentos, o estudo de um antimicrobiano ideal é de suma importância no desenvolvimento de sistemas de bioconservação, que é definido por Trajano et al. (2009) como um “sistema de preservação amplamente aceito, sendo referido como um procedimento natural capaz de prover a extensão da vida útil e satisfatória segurança microbiológica de alimentos”.

Alvarenga et al. (2007), fazendo uso do método de difusão em Ágar Müeller-Hinton, avaliaram o efeito de extratos aquoso e etanólico (nas concentrações de 10 e 20%) de diferentes plantas aromáticas, dentre as quais o orégano, hortelã, alecrim, sálvia, capim-limão e gengibre sobre bactérias patogênicas de importância em saúde pública (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus mutans*). Em geral, os resultados obtidos foram melhores quando se utilizaram os extratos vegetais alcoólicos.

Em estudo sobre a inibição de óleos essenciais sobre o desenvolvimento de bactérias em alimentos consumidos populamente em ruas da Índia, Das e colaboradores (2011) demonstraram que óleos essenciais de canela e cravo resultaram na máxima atividade antibacteriana frente a patógenos alimentares (*Arizona spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Vibrio spp.*), quando comparados aos outros óleos essenciais envolvidos no estudo.

Alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cravo (*Syzygium aromaticum*), noz-moscada (*Myristica fragrans*), pimenta-da-jamaica (*Pimenta dióica*) e sálvia (*Salvia officinallis*) demonstraram constituir fontes eficientes de compostos bioativos antibacterianos em estudo conduzido por Bara e Vanetti (1998).

Em avaliação sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais de canela, cravo, gengibre e menta em concentrações de 10,0, 1,0 e 0,1%, Hoffmann et al. (1999) demonstraram que, dentro dos parâmetros do experimento, os óleos essenciais de canela e menta, nas concentrações de 10,0 e 1,0% foram mais efetivos sobre os micro-organismos testados.

Trajano et al. (2009), em estudo sobre a propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos, verificaram que os óleos essenciais de folhas do cravo, *E. caryophyllata*, e da canela, *C. zeylanicum*, mostraram uma eficiência na inibição de todas as cepas bacterianas submetidas aos ensaios (*B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. enterica*, *S. marcencens* e *Y. enterocolitica*).

Castilho et al. (2012), em estudo sobre a atividade antimicrobiana de óleo essencial de orégano (OEO) e seus componentes principais (oriundos da Ilha da Madeira, Portugal), sugerem um potencial de ação do OEO sobre micro-organismos patógenos humanos e contaminantes de alimentos, dentre os quais pode-se destacar: *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Em estudo sobre os componentes antimicrobianos de ervas e especiarias em alimentos, Tajkarimi e colaboradores (2010) concluem que são necessários mais estudos detalhados sobre antimicrobianos naturais em alimentos, especialmente sobre a efetividade dos óleos essenciais, quando empregados

individualmente e em combinação com outros extratos, óleos essenciais e tecnologias de processamento de alimentos.

Verifica-se, portanto, que as especiarias e seus derivados assumiram importância relevante para serem utilizados como potenciais agentes inibitórios de micro-organismos, com ação inibitória sobre distintas cepas, revelando uma nova perspectiva para seu emprego na indústria alimentícia.

### **3.4 Mecanismo de ação antimicrobiana**

Os óleos essenciais são complexos naturais formados por cerca de 20 – 60 componentes em distintas concentrações. São caracterizados por dois ou três componentes presentes em maiores concentrações (20 – 70%) quando comparados aos demais. Geralmente esses componentes determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

A atividade antibacteriana de muitas plantas deve-se aos compostos sintetizados no metabolismo secundário. Tais produtos são conhecidos por suas substâncias ativas (NASCIMENTO et al., 2000). Domingo e López-Brea (2003) evidenciaram que as plantas produzem mais de 100.000 produtos naturais de baixo peso molecular, conhecidos como metabólitos secundários, que se diferenciam dos primários por não serem essenciais à vida das plantas.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é clara, porém este mecanismo ainda não está completamente elucidado. Dentre os grupos químicos conhecidos, com ação antibacteriana, pode-se mencionar principalmente os compostos fenólicos, quinonas, taninos, cumarinas, alcalóides e flavonas e seus compostos (HOLLEY; PATEL, 2005).

Deve-se destacar, porém, que alguns fatores influenciam na composição dos óleos essenciais: clima, composição do solo, parte da planta em que se origina, estágio e ciclo vegetativo (MASOTTI et al., 2003; ANGIONI et al., 2006 apud BAKKALI et al., 2008). A influência dos fatores mencionados reflete, portanto, na ação inibitória frente aos micro-organismos.

Os compostos com maior eficácia de inibição microbiana são os fenólicos (BURT, 2004; HOLLEY; PATEL, 2004). Tratam-se de componentes hidrofóbicos dos óleos essenciais, cujo sítio de ação é a membrana celular microbiana. Esses compostos se acumulam na bicamada lipídica causando desarranjo na função e na estrutura da membrana e penetram a célula bacteriana, exercendo atividade inibitória no citoplasma celular, provocando lise e liberação do ATP intracelular. A perda de constituintes celulares, pelo aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, também foi documentada (SILVA et al., 2010).

Existem autores que sugerem que a membrana ao redor da parede celular de bactérias Gram-negativas pode restringir a difusão de compostos hidrofóbicos através da cobertura de lipopolissacarídeos, o que sugere que as bactérias Gram-positivas sejam mais susceptíveis à inibição (DAVIDSON; BRANEN, 2005 *apud* GUTIERREZ et al., 2005).

### **3.5 *Escherichia coli***

Segundo Jay (2005), a *Escherichia coli* foi reconhecida como patógeno de origem alimentar em 1971, quando queijos importados foram comercializados em 14 estados norte-americanos, provocando, aproximadamente, 400 casos de gastroenterite devido à linhagem enteroinvasiva. Antes de 1971 foram reportados, pelo menos, outros cinco surtos de origem alimentar, sendo o primeiro deles na Inglaterra em 1947.

Trata-se de uma das bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capaz de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubada à 44 – 45,5°C. É um bacilo catalase-positivo, oxidase-negativo, Gram-negativo e não esporulado. É um micro-organismo mesófilo típico, que cresce em temperaturas desde 7 – 10°C até 50°C. Sua atividade de água (*Aw*) mínima de crescimento é 0,95 (ADAMS; MOSS, 1997).

Dados genético-moleculares sugerem que os gêneros *Escherichia* e *Salmonella* surgiram de um antecessor comum, por isso, não é surpresa a existência de genes de virulência que possivelmente foram trocados entre eles por transferência horizontal, entre outros fatores (JAY, 2005).

Pode ser diferenciado dos demais representantes da família *Enterobacteriaceae* com base no número de açúcares que fermenta e mediante provas bioquímicas, tais como as de IMViC. Pelas provas bioquímicas de IMViC, verifica-se a capacidade da *E. coli* produzir indol a partir do triptofano (I), produzir ácido suficiente para reduzir o pH do meio abaixo de 4,4, ponto de viragem do indicador vermelho de metila (M), produzir acetoina, ou seja, acetilmetil carbinol (V) e utilizar o citrato (C).

As linhagens causadoras de doenças intestinais são agrupadas em, pelo menos, seis grupos com base nas características de virulência específica e traços fenotípicos. Destacam-se: *E. coli* enteroagregativas (EaggEC ou EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) e *E. coli* Shiga toxigênica (STEC). Surtos alimentares são particularmente associados com cepas STEC e, em menor grau, com linhagens EPEC, ETEC e EaggEC (NEWELL et al., 2010).

Para a prevenção de doenças de origem alimentar causadas por *E. coli* devem ser evitados: refrigeração inadequada, alimentos preparados com muita antecedência ao consumo, manipuladores infectados com hábitos de higiene pessoal insuficientes, cozimento ou processamento inadequado e alimentos mantidos sob aquecimento em temperaturas que favorecem o crescimento bacteriano (JAY, 2005).

### **3.6 Queijo tipo Minas Frescal**

De acordo com o Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade de Queijo tipo Minas Frescal, entende-se por Queijo tipo Minas Frescal o queijo obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com a ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997).

Trata-se de um queijo semi-gordo (25,0 – 44,9% de matéria gorda), de muito alta umidade (umidade  $\geq$  55,0%), destinado ao consumo imediato e de reduzida vida-de-prateleira, sendo produzido em indústrias tanto de pequeno e

médio porte, quanto de grande porte. É um produto consumido por todas as camadas da população, no decorrer de todo o ano (FURTADO, 1999).

A primeira etapa da tecnologia de fabricação desse tipo de queijo é constituída pela coagulação, primeiramente lenta e posteriormente rápida, do leite após tratamento com enzimas coagulantes (quimosina, pepsina ou proteinases microbianas). Esse fenômeno é resultante de dois processos, sendo o primeiro deles o ataque à  $\kappa$ -caseína, proteína responsável pela estabilização das micelas de caseína e, o segundo, a coagulação das micelas desestabilizadas pelo ataque enzimático. Ocorre ainda um terceiro processo, que é responsável pelas modificações nas propriedades e na estrutura do coágulo após sua formação (DALGLEISH, 1993; FOX et al., 1998; FOX et al., 2000).

Sabe-se que matéria-prima, equipamentos, embalagens e manuseio são as principais fontes de contaminação na indústria de queijos (VALLE et al., 2005). Assim sendo, o leite torna-se um transmissor de micro-organismos e toxinfecções alimentares em potencial, podendo comprometer os produtos obtidos, gerando riscos à saúde pública.

Torna-se, portanto, necessário um controle rigoroso das condições higiênico-sanitárias destes produtos, assim como da utilização de métodos que reduzam o grau de contaminação, a fim de evitar a exposição do consumidor a alimentos contaminados e que possam causar sérios danos à saúde (ROLIM, 2004).

## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Obtenção dos micro-organismos**

As cepas microbianas empregadas no estudo são provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), de São José do Rio Preto – SP. Tratam-se de bactérias oriundas da *American Type Culture Collection* (ATCC).

### **4.2 Obtenção dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais de especiarias utilizados no estudo foram obtidos comercialmente e por meio de doação da empresa Laszlo Aromaterapia Ltda.

### **4.3 Preparação dos inóculos**

Todas as cepas microbianas empregadas na pesquisa foram mantidas em PCA (Ágar para Contagem Padrão – Acumedia) a 4°C e reativadas *overnight* em PCA a 35°C.

### **4.4 Óleos essenciais**

Foram preparadas, no momento da realização dos experimentos, soluções com as concentrações de 1%, 2% e 5% (v/v) de cada óleo essencial de especiaria a ser empregado, utilizando-se como solvente a solução composta por água destilada estéril e Tween 80 a 0,5%.

## **4.5 Ensaio de resistência *in vitro***

Halos iguais ou superiores a 10 mm foram considerados significativos de atividade antimicrobiana, conforme Hoffmann et al., 1999.

### **4.5.1 Técnica de difusão em disco**

A sensibilidade de cada cepa microbiana sobre os óleos essenciais foi avaliada pelo método de difusão em disco com modificações (BAUER et al., 1966). Em placas de Petri contendo MHA (Ágar Müeller Hinton – Himedia) foram realizadas sementeiras por superfície com a cultura da bactéria contendo  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, padronizada em escala 0,5 de Mc Farland (ALVES et al., 2008). Nas placas de Petri foram, então, inseridos discos estéreis de papel filtro de 6 mm de diâmetro (Filtro Whatman), próprios para avaliação de atividade antimicrobiana. Alíquotas de 40µL de cada solução, descritas no item 4.4, foram inseridas sobre os discos de papel filtro.

Após incubação a 35°C por 24 horas, o diâmetro do halo de inibição de cada disco foi mensurado com o auxílio de um paquímetro, sendo que o tamanho do halo era diretamente proporcional à atividade antibacteriana. Como controle negativo foi utilizada a solução solvente, água e Tween 80 a 0,5%. O estudo foi efetuado em triplicata para cada concentração de óleo essencial empregada sobre cada um dos micro-organismos.

### **4.5.2 Técnica de difusão em poço**

Procedeu-se de acordo com a técnica mencionada por Schillinger e Lücke, (1989), com modificações. Empregou-se, a sementeira por profundidade ao invés da sementeira por superfície, e o uso de poços (perfurações) de 6 mm de diâmetro, ao invés do uso de discos de papel filtro.

## **4.6 Ensaio de resistência *in situ***

Todas as análises referidas neste item foram conduzidas no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP de São José do Rio Preto.

### **4.6.1 Controle do leite empregado no estudo *in situ***

O leite pasteurizado tipo A empregado na fabricação do queijo tipo Minas Frescal foi adquirido de empresa conhecida, em São José do Rio Preto – SP, e submetido às análises microbiológicas e físico-químicas. As coletas das amostras foram efetuadas após homogeneização do leite.

### **4.6.2 Análises do leite**

Para o controle da matéria-prima empregada no estudo foram efetuadas análises microbiológicas e físico-químicas, de modo a avaliar se o leite empregado na produção dos queijos encontrava-se dentro dos padrões exigidos pela legislação nacional vigente. A seguir são apresentadas as referidas análises.

#### **4.6.2.1 Análises microbiológicas**

Para garantir que a matéria-prima utilizada no processamento estava conforme os padrões estabelecidos no Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (BRASIL, 2000) foram efetuadas as análises de:

- ✓ Coliformes termotolerantes, de acordo com metodologia proposta por Kornacki e Johnson (2001).
- ✓ *Salmonella sp.*, segundo metodologia recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Os limites observados foram os de tolerância para amostra indicativa.

#### **4.6.2.2 Análises físico-químicas do leite**

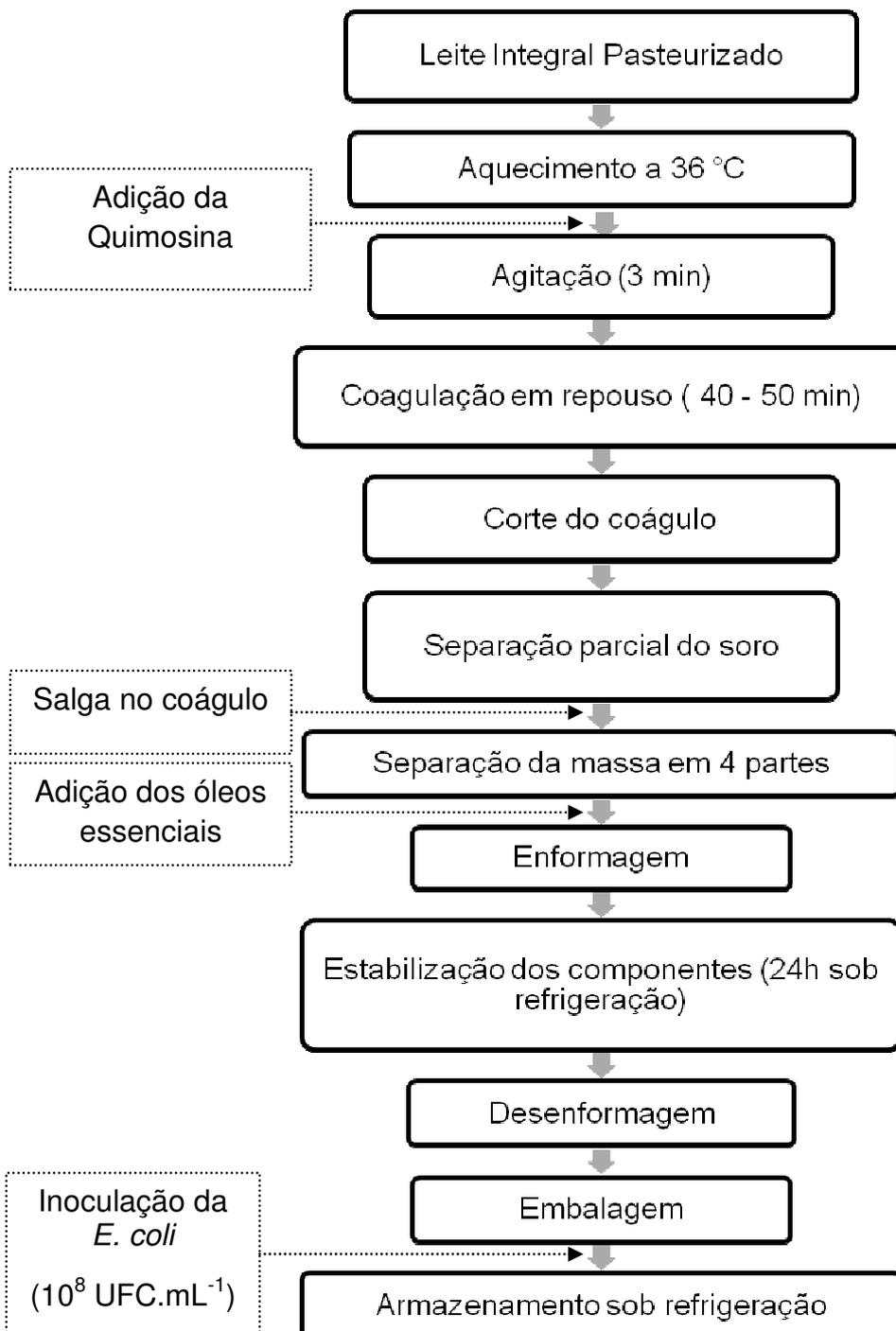
As análises foram realizadas por método rápido (ultrassom), utilizando-se o equipamento Ekomilk Ultra e recomendações do fabricante (EON Tradding LLC, Bulgaria).

- ✓ Teor de Gordura;
- ✓ Teor Protéico;
- ✓ Sólidos não-protéicos;

#### **4.6.3 Fabricação do Queijo tipo Minas Frescal**

A figura 1 ilustra o processo de fabricação do queijo tipo Minas Frescal.

**Figura 1** – Fluxograma de processo de fabricação do queijo tipo Minas Frescal com e sem adição de óleo essencial (1%, 2% e 5%) e inoculação com *E. coli*



#### 4.6.4 Inoculação do queijo com *Escherichia coli*

A cepa de *E. coli* (ATCC 8739) foi reativada *overnight* em PCA a 35 °C. A cultura da bactéria contendo  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> foi padronizada pela escala espectrofotométrica 0,5 de Mc Farland. Após inoculação da *E. coli* nas unidades experimentais efetuou-se a agitação manual da embalagem contendo o produto e o inóculo por 3 minutos.

Foram efetuadas quatro inoculações referentes às concentrações de óleo essencial aplicada aos queijos (1%, 2% e 5% - relação volume/peso) e ao controle - queijo sem óleo essencial. O estudo foi conduzido em triplicata.

#### 4.6.5 Contagem de *E. coli* no Queijo tipo Minas Frescal

Foram retirados 10,0g do queijo já inoculado referente a cada período de análise, os quais foram diluídos em 90,0mL de água peptonada 0,1% estéril. Diluições decimais seriadas foram conduzidas para posteriores inoculações por profundidade em placas de Petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). A contagem das unidades formadoras de colônia por grama foi efetuada após incubação das placas a 35 °C por 24 horas (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

#### 4.6.6 Análises físico-químicas do queijo

- ✓ Gordura, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985);
- ✓ Proteína, conforme metodologia proposta por Kjeldahl (AOAC, 1997), empregando-se o fator de conversão de 6,38;
- ✓ Cinzas, por incineração em mufla a 550 °C (AOAC, 1997);
- ✓ Umidade, por secagem à vácuo por 24h a 70 °C (APHA *apud* CASE et al., 1985);

#### 4.7 Planejamento Experimental

O experimento para avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi conduzido em triplicata, sendo o planejamento inteiramente casualizado. A influência da concentração de óleo essencial sobre a inibição microbiana foi o fator estudado. A análise estatística do diâmetro dos halos foi realizada por meio de uma análise descritiva. Os testes estatísticos foram realizados com suporte do software Minitab® v.15.

O efeito antibacteriano *in situ* do OEO sobre *Escherichia coli* foi avaliado empregando-se três concentrações do óleo, incorporadas na massa (coágulo), dando origem aos queijos. Dessa forma, o experimento constou de quatro tratamentos: controle (sem OEO), OEO 1%, OEO 2% e OEO 5%. Os tratamentos de cada repetição foram conduzidos concomitantemente. Foram efetuados três processamentos, de modo a obter três unidades experimentais de cada tratamento, ou seja, triplicata.

Leite pasteurizado integral tipo A foi utilizado para produção de 4 unidades de queijo de cerca de 200g para cada tratamento. As unidades foram porcionadas em quatro partes, referentes a cada tempo de amostragem para pesquisa de *E. coli* nos dias 2, 4, 8 e 14 de armazenamento.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Ensaio de resistência antibacteriana *in vitro*

A tabela 3 apresenta os resultados provenientes do ensaio de resistência das cepas de micro-organismos utilizadas. De acordo com os dados pode-se verificar que o óleo essencial que possui maior efetividade de ação antibacteriana é o de orégano (OEO), sendo que o aumento da concentração desse óleo propicia o aumento da atividade antibacteriana, à exceção da *P. aeruginosa* e *B. cereus*.

Nota-se, ainda na tabela 3, que a ação do óleo essencial de orégano faz-se sobre micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, o que corrobora com os dados já relatados na literatura por Gutierrez et al. (2009). A susceptibilidade de uma bactéria a um óleo essencial é resultado das diferenças existentes na estrutura da membrana celular (VIUDA-MARTOS et al., 2011).

Bactérias Gram-negativas são compostas por um envoltório lipoprotéico da membrana celular, que protege a célula e propicia rigidez, devido à sua superfície altamente hidrofóbica. Bactérias Gram-positivas, por sua vez, pela ausência do envoltório externo à membrana plasmática e por possuir as extremidades celulares lipofílicas são mais susceptíveis à ação de compostos hidrofóbicos (COX et al., 2000), como componentes fenólicos do óleos essenciais (ANGIENDA et al., 2010) .

De acordo com a tabela 3, *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou resistência à todos os óleos essenciais testados nas distintas concentrações. Maior resistência à antimicrobianos naturais por *P. aeruginosa* também foi relatada por Holley e Patel (2005) embora Bendahou et. al (2008) tenham relatado susceptibilidade da cepa ao gênero *Origanum*.

Marino e colaboradores (2001) relataram que óleo essencial de orégano foi o mais efetivo em estudo antimicrobiano com distintas cepas. Em

concentrações de 800 ppm, o referido óleo essencial inativou 100% dos micro-organismos, dentre eles: *E. coli*, *E. coli O157:H7*, *S. thyphimurium*, *S. aureus* e *P. fluorescens*.

Acredita-se que os compostos responsáveis pela ação antibacteriana do óleo essencial de orégano sejam os fenólicos, presentes em grandes teores. Sabe-se que os compostos fenólicos são capazes de alterar a permeabilidade da membrana plasmática e penetrar nas células bacterianas, onde interagem em mecanismos metabólicos (Judis, 1963; Juven et al., 1972 *apud* Marino et. al, 2001).

A figura 2 ilustra os resultados obtidos nos ensaios de resistência da cepa *Escherichia coli* (ATCC 8739) frente aos óleos essenciais. A referida figura ilustra apenas os resultados dos óleos essenciais cujas concentrações resultaram em inibição do micro-organismo em questão.

Tabela 3 – Ensaio de resistência bacteriana aos óleos essenciais

Óleo essencial	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. thyphi</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>B. cereus</i>	
	Halo D*	Halo P*	Halo D*	Halo P*	Halo D*	Halo P*	Halo D*	Halo P*	Halo D*	Halo P*	Halo D*	Halo P*
Alecrim 1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alecrim 2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alecrim 5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coentro 1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coentro 2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coentro 5%	NS	NS	-	-	-	-	10,00±0,00	-	10,00±0,00	14,67±4,16	90,00±1,00	NS
Cravo 1%	NS	NS	-	-	10,00±0,00	-	-	-	10,00±0,00	-	-	-
Cravo 2%	-	-	NS	-	11,00±0,00	-	-	-	10,33±0,58	18,00±5,29	-	10,00±0,00
Cravo 5%	NS	NS	NS	-	15,00±0,00	18,33±1,15	-	-	12,00±0,00	19,33±3,21	20,00±2,00	13,33±0,28
Manjerição 1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manjerição 2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS
Manjerição 5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS
Orégano 1%	16,00±4,58	15,00±1,00	21,00±5,29	13,67±1,15	14,67±1,53	16,67±1,15	-	-	12,67±1,53	13,00±3,46	13,00±0,00	16,67±4,04
Orégano 2%	25,67±1,15	19,00±1,73	24,00±1,00	18,67±0,58	18,00±3,60	17,67±1,15	-	-	16,67±0,58	15,00±1,73	22,33±2,51	14,00±0,00
Orégano 5%	30,33±1,53	33,00±5,00	33,00±4,36	22,67±1,15	30,00±0,00	19,00±1,00	-	-	27,00±0,00	30,00±0,00	90,00±1,00	20,00±1,00
Sálvia 1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sálvia 2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sálvia 5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tomilho 1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tomilho 2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tomilho 5%	21,33±1,15	-	-	NS	-	-	-	-	12,00±0,00	-	-	-

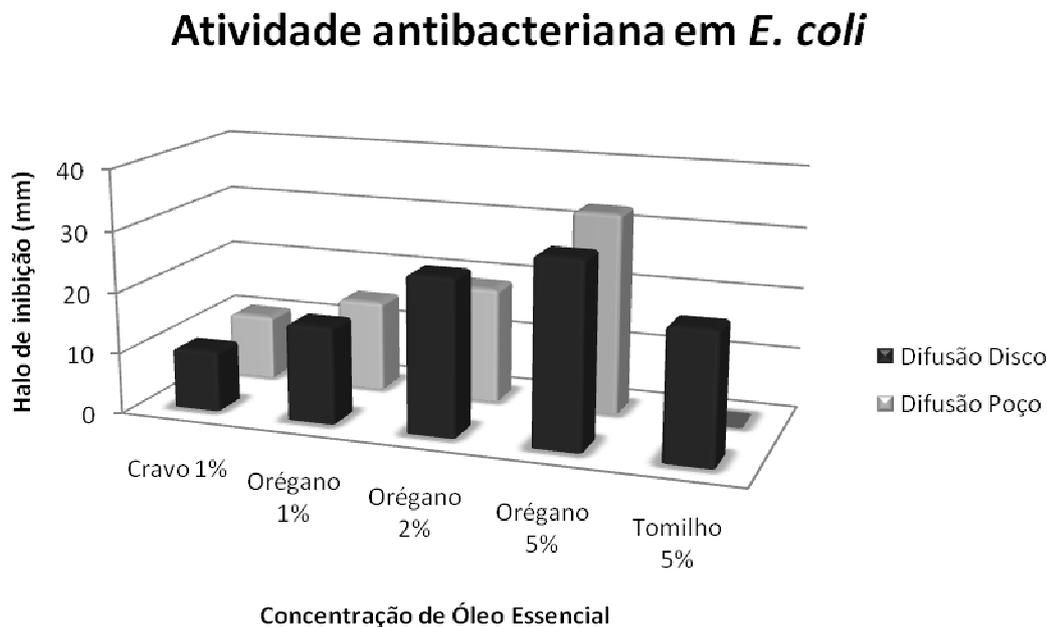
\*Valores representados por média ± desvio padrão, em milímetros.

Halo D: Halo de inibição bacteriana obtido através da metodologia de difusão por disco. Halo P: Halo de inibição bacteriana obtido através da metodologia de difusão por poço.

(-) : Não houve formação de halo de inibição bacteriana. (NS): Halo de inibição bacteriana não-significativo (<10 mm).

90mm corresponde ao diâmetro da placa de Petri empregada no estudo. Quando este valor é encontrado, houve inibição completa do micro-organismo.

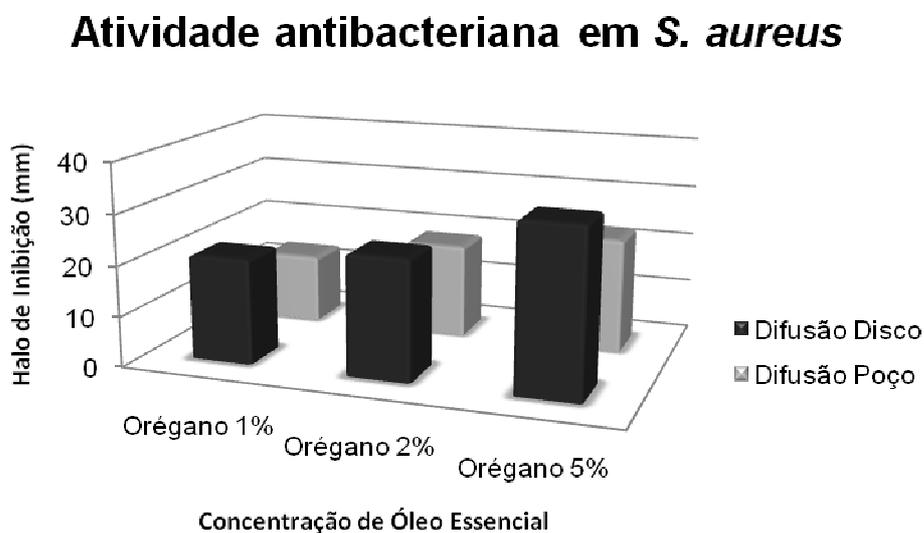
**Figura 2** – Média dos resultados do ensaio de resistência da cepa *E. coli* (ATCC 8739) frente aos óleos essenciais empregados



Com exceção do ensaio na concentração de 5% de OEO, a metodologia de difusão em ágar por disco foi a que resultou em maior sensibilidade bacteriana. Skandamis e Nychas (2000) demonstraram que OEO, quando em concentrações  $\leq 1\%$  em maionese, possui atividade antibacteriana sobre *E. coli* O157:H7.

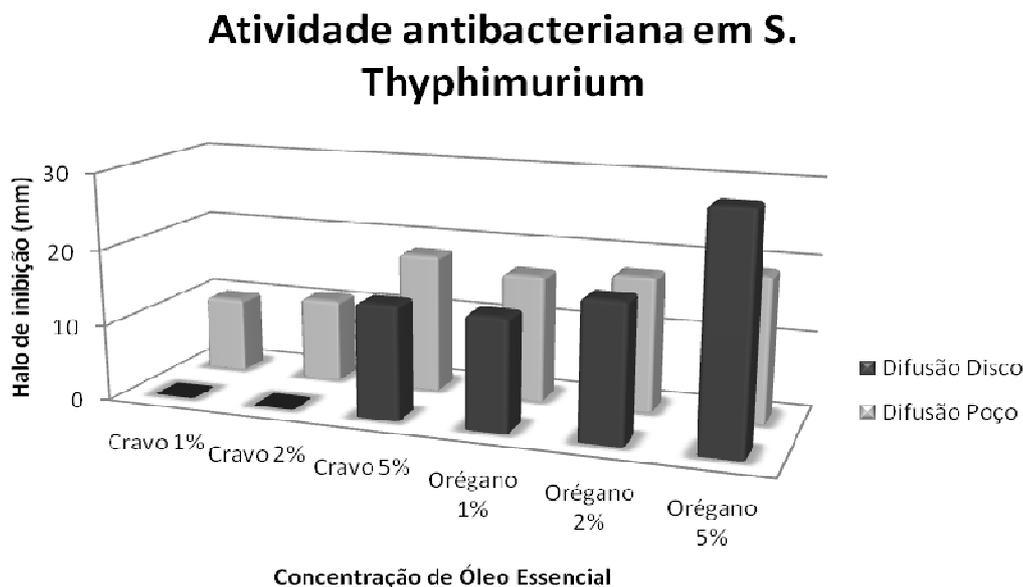
Na figura 3 torna-se mais evidente a ação antibacteriana do OEO em relação aos demais óleos essenciais empregados no estudo. Frente à *S. aureus* (ATCC 25923) o OEO foi o único a apresentar atividade inibitória, sendo mais uma vez a metodologia de difusão em ágar por disco a mais efetiva. Lambert et al. (2001), em estudo sobre a mínima concentração inibitória de óleo essencial de orégano (timol e carvacrol) relatam que a mistura adequada dos componentes do óleo podem exercer a inibição total de *S. aureus* que é evidente no óleo.

**Figura 3** – Média dos resultados do ensaio de resistência da cepa *S. aureus* (ATCC 25923) frente aos óleos essenciais empregados



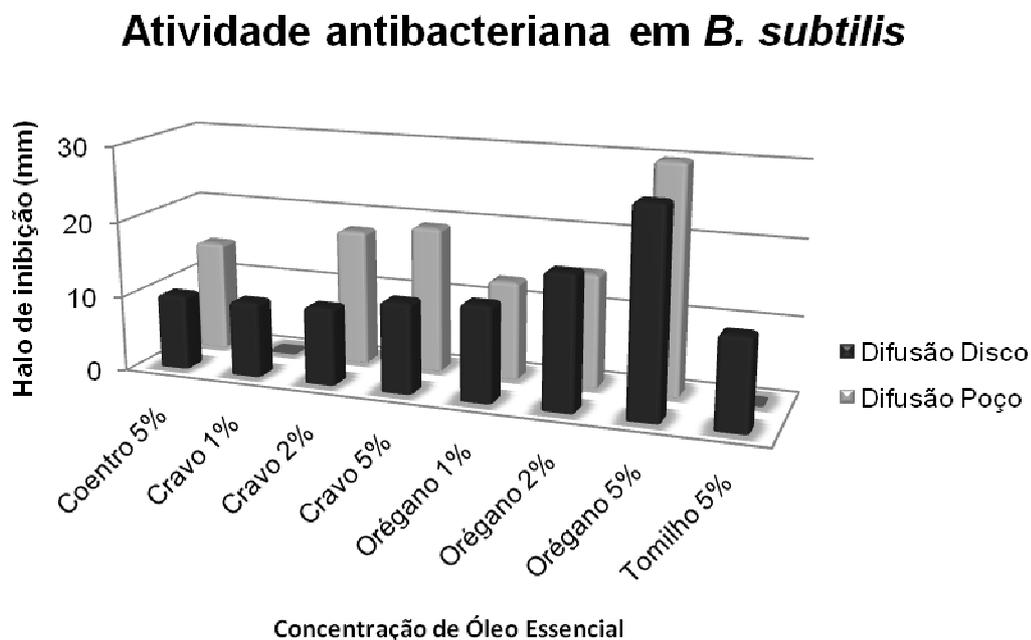
*Salmonella thyphimurium* (ATCC 14028) teve seu desenvolvimento inibido por óleos essenciais de cravo e orégano, em todas as concentrações aplicadas, por ambas as metodologias, conforme ilustra a figura 4. Nanasombat e Lohasupthawee (2005) relatam que o óleo essencial de cravo teve grande efetividade antimicrobiana frente a Enterobactérias e Salmonellae. *Salmonella thyphimurium* foi a cepa mais sensível aos óleos essenciais e extratos etanólicos.

**Figura 4** – Média dos resultados do ensaio de resistência da cepa *S. thyphimurium* (ATCC 14028) frente aos óleos essenciais empregados



O micro-organismo que apresentou maior sensibilidade aos óleos essenciais empregados foi o *B. subtilis* (ATCC 6633), conforme demonstra a figura 5. Nota-se que o micro-organismo foi inibido por óleos essenciais de coentro, cravo, orégano e tomilho. Resultados similares foram relatados por Sartoratto et al. (2004), notando atividade antibacteriana moderada de óleos essenciais de orégano e tomilho sobre *B. subtilis*. Tajkarimi et al. (2010) mencionam estudos que demonstram ação de cravo, sálvia, manjeriço e alecrim sobre a cepa em questão.

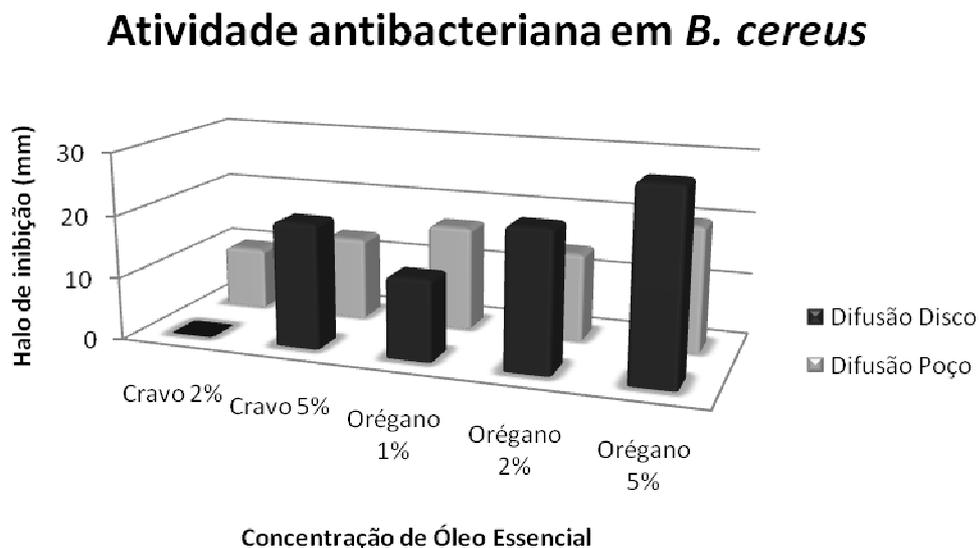
**Figura 5** – Média dos resultados do ensaio de resistência da cepa *B. subtilis* (ATCC 6633) frente aos óleos essenciais empregados



A figura 6, por sua vez, demonstra os resultados dos ensaios de susceptibilidade microbiana sobre *B. cereus* (ATCC 11778). O óleo essencial de orégano, mais uma vez, foi que apresentou maior eficácia de inibição microbiana, principalmente nas duas maiores concentrações empregadas.

Ultee et al. (1999), em estudo sobre os mecanismos de ação do carvacrol sobre o patógeno *B. cereus*, relata a efetividade de ação do composto antimicrobiano, sendo considerado um composto bactericida em concentrações superiores a 1mM.

**Figura 6** – Resultados médios do ensaio de resistência da cepa *B. cereus* (ATCC 11778) frente aos óleos essenciais empregados



A técnica de difusão por disco é uma metodologia aprovada pelo FDA, Food and Drug Administration, como padrão para análises de atividade antibacteriana. É a técnica mais empregada para avaliação antimicrobiana de óleos essenciais, de acordo com Turker e Usta (2008). E, embora neste estudo sejam observados resultados mais sensíveis pela referida técnica, observa-se discordância entre os resultados obtidos por meio do uso de outras técnicas.

Alves e colaboradores (2009) relatam, em uma revisão recente de artigos publicados sobre atividade antimicrobiana de plantas medicinais, que Rios e Recio (2005) revelaram que o maior problema com as pesquisas ainda continua sendo a falta de uniformidade nos critérios selecionados para estudar a atividade antimicrobiana. Isto frequentemente leva a relevantes contradições entre os resultados obtidos por diferentes grupos e até para o mesmo autor estudando a mesma amostra com diferentes métodos.

Sabe-se que diferentes parâmetros podem afetar o resultado de um ensaio antimicrobiano, tais como volume de OE empregado, o tipo de solvente que compõe a solução teste, a espessura da camada de ágar (TAJKARIMI et al., 2010), volume de inóculo, meio de cultura utilizado, pH do meio de cultura, fase de desenvolvimento microbiano, parte do vegetal empregada na extração do óleo essencial e parâmetros de incubação tempo e temperatura (BURT, 2004). Tais

fatores são de particular relevância na avaliação dos resultados obtidos no presente estudo.

## 5.2 Perfil físico-químico do leite empregado na elaboração do Queijo tipo Minas Frescal

Os dados da tabela 4 ilustram o perfil físico-químico dos leites empregados no experimento. Os valores enquadram-se nos requisitos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002).

**Tabela 4** – Perfil físico-químico do leite empregado na produção de Queijo tipo Minas Frescal

<b>Parâmetro</b>	<b>Média±Desvio Padrão</b>
<b>Gordura (%)</b>	3,65±0,01
<b>Sólidos não-gordurosos (%)</b>	8,60±0,01
<b>Proteínas (%)</b>	51,05±0,1

## 5.3 Perfil microbiológico do leite

Com relação aos parâmetros microbiológicos da matéria-prima exigidos na legislação brasileira, o leite apresentou ausência de *Salmonella spp.* e de coliformes termotolerantes. Portanto, a matéria-prima estava dentro dos padrões exigidos para comercialização.

A pesquisa de *E. coli* no leite resultou na ausência do micro-organismo. Por conseguinte, os queijos tipo Minas Frescal produzidos para o estudo não apresentavam contaminação pela referida enterobactéria.

#### 5.4 Perfis físico-químicos dos queijos

A tabela 5 apresenta os perfis físico-químicos dos queijos produzidos com e sem adição de OEO. Verifica-se que o emprego do óleo essencial propicia redução nos teores de proteína, umidade e cinzas. Na prática foi possível verificar visualmente a redução do teor de umidade dos queijos com o aumento do volume de óleo essencial empregado, uma vez que o produto tornava-se mais rígido e apresentava menor dessora.

**Tabela 5** – Perfis físico-químicos dos queijos produzidos

	<b>Proteína (%)*</b>	<b>Gordura (%)*</b>	<b>Umidade (%)*</b>	<b>Cinzas (%)*</b>
<b>Queijo Controle</b>	15,47±0,11	17,00±0,00	62,06±0,36	2,85±0,12
<b>Queijo 1% OEO</b>	14,55±0,07	23,06±0,58	59,55±2,10	2,64±0,21
<b>Queijo 2% OEO</b>	15,81±0,07	21,50±0,50	60,01±2,91	2,63±0,26
<b>Queijo 5% OEO</b>	15,03±0,05	18,00±0,00	61,96±1,93	2,62±0,04

\*Todos os resultados estão expressos como Média±Desvio Padrão.

Os valores de proteína e umidade para todas as amostras de queijo encontram-se dentro dos relatados na literatura por Rosa (2004). De acordo com a Portaria n° 146 de 07 de março de 1996 (BRASIL, 1996), os queijos obtidos neste estudo podem ser classificados como magros, por conter entre 10,0 e 24,9% de matéria gorda e de muita alta umidade (> 55,0% de umidade). Microbiologicamente a redução do teor de umidade relaciona-se diretamente com a atividade de água do produto, de modo a interferir no desenvolvimento adequado de micro-organismos.

#### 5.5 Ensaio de resistência antibacteriana *in situ*

Os dados da tabela 6 demonstram uma grande redução na contagem de *E. coli*, principalmente para o OEO nas concentrações de 2 e 5%. Nota-se que para o

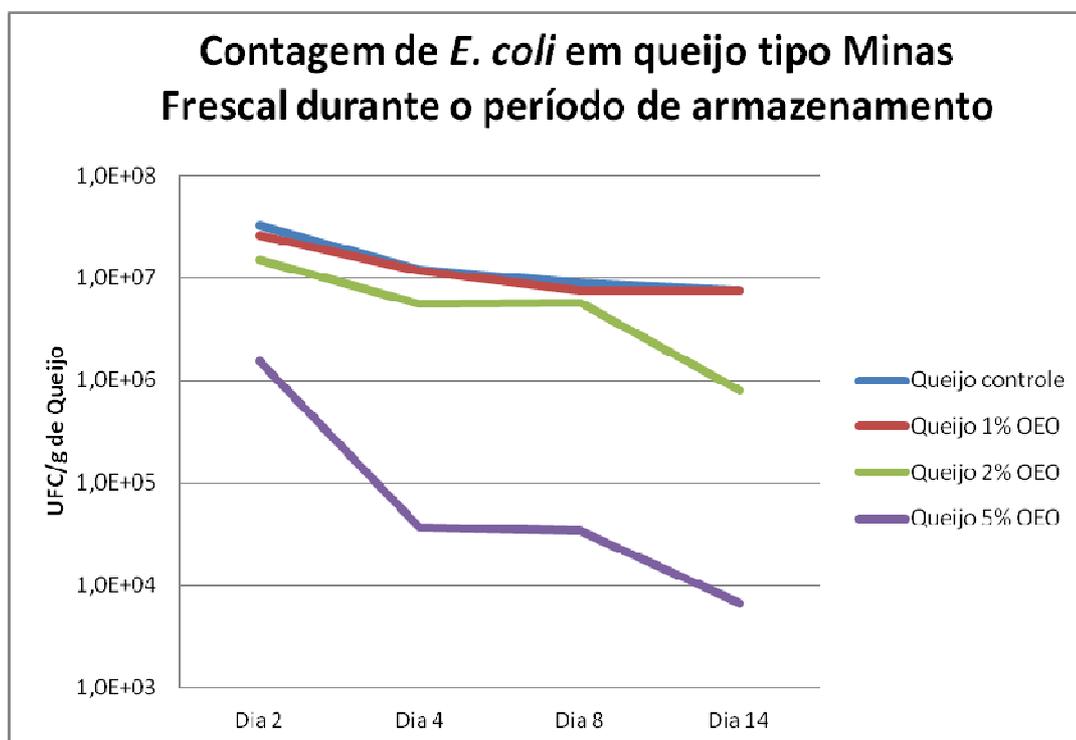
queijo com 1% de OEO a redução microbiana não chegou a ser logarítmica entre os dias 2 e 4.

**Tabela 6** – Contagem de *E. coli* nos queijos ao longo do período de armazenamento

	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 4</b>	<b>Dia 8</b>	<b>Dia 14</b>
<b>Queijo controle</b>	$3,30 \times 10^7$	$1,20 \times 10^7$	$8,97 \times 10^6$	$7,67 \times 10^6$
<b>Queijo 1% OEO</b>	$2,60 \times 10^7$	$1,18 \times 10^7$	$7,61 \times 10^6$	$7,67 \times 10^6$
<b>Queijo 2% OEO</b>	$1,48 \times 10^7$	$5,67 \times 10^6$	$5,69 \times 10^6$	$8,00 \times 10^5$
<b>Queijo 5% OEO</b>	$1,53 \times 10^8$	$3,70 \times 10^4$	$3,37 \times 10^4$	$6,72 \times 10^3$

Com o decorrer dos dias foi possível observar uma redução decimal significativa do micro-organismo no queijo com 5% de OEO, decrescendo 5 ciclos logarítmicos em relação ao inicial ( $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>), conforme ilustra a figura 7.

**Figura 7** – Contagem de *E. coli* em queijo tipo Minas Frescal durante o período de armazenamento



Verifica-se que o queijo controle teve uma redução na contagem microbiana ao longo dos dias de armazenamento. Por não conter óleo essencial de orégano ou

qualquer outra substância antibacteriana, pode-se relatar que a temperatura de armazenamento do produto (< 8°C) pôde ser um fator contribuinte para a redução microbiana, conforme já relatado em estudo por Kasrazedeh e Genigeorgis (1998).

A grande disponibilidade de nutrientes nos alimentos, quando compados aos meios de cultura empregados em ensaios *in vitro* de atividade antimicrobiana pode permitir que as bactérias reparem danos celulares mais rapidamente (GILL et al., 2002). Não apenas os componentes dos alimentos, tais como proteínas, gorduras, conteúdo de água, carboidratos, sais e aditivos são fatores relevantes, mas também fatores extrínsecos, como temperatura, embalagem com atmosfera modificada/controlada, e características microbianas podem interferir na sensibilidade das cepas aos antimicrobianos (SHELEF, 1983; TASSOU et al., 1995).

Geralmente a sensibilidade bacteriana ao efeito dos óleos essenciais parece aumentar com a redução dos valores de pH dos alimentos, temperatura de armazenamento e disponibilidade de oxigênio nas embalagens (TASSOU et al., 1995, 1996; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000; TSIGARIDA et al., 2000). Supõe-se que altos teores de proteínas e lipídeos protegem as bactérias da ação dos óleos essenciais (AURELI et al., 1992; PANDIT; SHELEF, 1994; TASSOU et al., 1995). Outra sugestão para a explicação dos dados é a de que o baixo teor de água nos alimentos, quando comparados aos meios de cultura laboratoriais, pode dificultar a dispersão dos agentes antimicrobianos no sítio-alvo das células bacterianas (SMITH-PALMER et al., 2001 apud BURT, 2004).

## 6 Conclusões

Os estudos *in vitro* demonstraram que o óleo essencial de orégano foi o mais efetivo frente os micro-organismos empregados, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*. Óleos essenciais de cravo e tomilho também demonstraram ter ação inibitória sobre alguns dos patógenos estudados. A metodologia de difusão em ágar por disco mostrou-se mais sensível.

Por sua vez, no estudo *in situ*, o óleo essencial de orégano a 2 e 5% propiciou a redução da contagem de *Escherichia coli*. A maior concentração de OEO empregada possibilitou a redução do contaminante em cinco ciclos logarítmicos, quando aplicado em queijo tipo Minas Frescal, durante o período de armazenamento.

Estudos mais detalhados sobre a interação entre os componentes presentes no sistema alimentício empregado e o óleo essencial são necessários para correlacionar precisamente os possíveis efeitos sinérgicos e antagonísticos presentes.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1997.
- ANGIENDA, P. O.; ONYANGO, D. M.; HILL, D. J. Potential application of plant essential oils at sub-lethal concentrations under extrinsic conditions that enhance their antimicrobial effectiveness against pathogenic bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 16, p. 1678 – 1684, 2010.
- ALVARENGA, A. L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.
- ALVES, E. G. A. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224 – 1229, 2008.
- ANGIONI, A. et al. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4364 – 4370, 2006.
- ARORA, D. S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, n. 3, p. 257-262, 1999.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Dairy products. In: \_\_\_\_\_. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington, 1997.
- AURELI, P., CONSTANTINI, A., ZOLEA, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 5, p. 344 – 348, 1992.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446 – 475, 2008.
- BARA, M. T. F.; VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7/8, n. 1, p. 22-34, 1998.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493, 1966.
- BENDAHO, M. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydro distillation. **Food Chemistry**, v. 106, p. 132 – 139, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC ANVISA n° 276, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 22 set. 2005. Seção 1.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA). Instrução Normativa n° 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 26 ago. 2003. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Normativa n° 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 20 set. 2001. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC ANVISA n° 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 20 dez. 2000. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria GMC n° 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1.

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

CASE, R. A.; BRADLEY JR., R. L.; WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 15 ed. Washington, 1985, p. 327 – 404.

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

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil from *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 88, p. 170 – 175, 2000.

DALGLEISH, D. G. The enzymatic coagulation of milk. In: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. London: Chapman & Hall, 1993. v. 1, p. 69-100.

DAS, M.; RATH, C. C.; MOHAPATRA, U. B. Bacteriology of a most popular street food (Panipuri) and inhibitory effect of essential oils on bacterial growth. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, 2011. Disponível em:

<<http://www.springerlink.com/content/55811825pw026838/fulltext.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2011.

DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. Food antimicrobials – an introduction. In: Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branen, A.L. (Eds.). **Antimicrobial in Food**. CRC Press, p. 1 – 9. Taylor and Francis Group ed.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, n. 4, p. 273-285, 2004.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas com acción antimicrobiana. **Revista Espanola de Quimioterapia**, Madrid, v. 16, n. 4, p. 385-393, Dec. 2003.

DUPONT, S. et al. *In vitro* antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 11, p. 929-932, 2006.

FAZIO, M. L. S.; GONÇALVES, T. M. V.; HOFFMANN, F. L. Determinação da atividade antibacteriana de romã (*Punica granatum L.*). **Higiene Alimentar**, v. 23, n. 168/169, p. 54-56, 2009.

FERREIRA, J. P. et al. Effects of the components of two antimicrobial emulsions on food-borne pathogens. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 227-230, 2010.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 2000. 587 p.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478 p.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte, 1999. 176 p.

GIACOMETTI, D. C. **Ervas condimentares e especiarias**. São Paulo: Nobel, 1989. 127 p.

GILL, A. O. et al. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 83 – 92, 2002.

GÓMEZ CAAMAÑO, J. L. (Ed.). **Páginas de historia de la farmácia**. Madrid: Sociedade Nestlé A. E. P. A., 1990. p. 29-229.

GOVARIS, A. et al. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. **Food Science and Technology – LWT**, v. 44, p. 1240 – 1244, 2011.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 142-150, 2009.

HOFFMANN, F. L. et al. Qualidade microbiológica de queijo tipo Minas Frescal, vendido em feiras livres em São José do Rio Preto-SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 68 – 76, 2002.

HOFFMANN, F. L.; SOUZA, S. J. F.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M.; DUTRA, A. L. Determinação da atividade antimicrobiana “in vitro” de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 11-20, jan./jun.1999.

HOLLEY, R. A.; 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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz**. 3 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

ISAACS, S. et al. An international outbreak of Salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella Enteritidis*. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 191-198, 2005.

IVANOVIC, J.; MISIC, D.; ZIZOVIC, I.; RISTIC, M. *In vitro* control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. **Food Control**, v. 25, p. 110-116, 2012.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JUDIS, J. Studies on the mechanism of action of phenolic disinfectants: II. Patterns of release of radioactivity from *Escherichia coli* labeled by growth on various compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 261 – 264, 1963.

JUVEN, B.; HENIS, J.; JAKOBY, B. Studies on the mechanism of the antimicrobial action of oleuropein. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 35, p. 559 – 567, 1972.

KASRAZADEH, M.; GENIGEORGIS, C. Potential growth and control of *Escherichia coli* O157:H7 in soft hispanic type cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 289 – 300, 1995.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed.), **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4<sup>th</sup> Ed., American Public Health Association, Washington, D.C., p. 69 – 82, 2001.

LAMBERT, J. R. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453 – 462, 2001.

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.

MASOTTI, V. et al. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7115–7121, 2003.

MATASYOH, J. C. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchoanthus camphoratus*. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1183 – 1187, 2007.

MENDES, J. E. F. **Especiarias**. Instituto de Investigação Científica e Tropical. Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia. 200 p. 1993.

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

NANASOMBAT, S.; LOHASUPTHAWEE, P. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonellae* and other *Enterobacteria*. **KMITL Science and Technology Journal**, v. 5, n. 3, p. 527-538, 2005.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 1-15, 2000.

NAZER, A. I. et al. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. *Typhimurium*: a synergistic effect? **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 391-398, 2005.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. s3 – s15, 2010.

OURIVES, E. A. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana de condimentos vegetais (ervas aromáticas) em meio de cultura e peito de frango picado frente a *P. fluorescens***. 1997. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

PANDIT, V.A., SHELEF, L.A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Microbiology**, v. 11, p. 57 – 63, 1994.

PIRBALOUTI, A. G. et al. Bioactivity of Iranian medicinal plants against *Yersinia enterocolitica*. **Nutrition & Food Science**, v. 40 n. 5, p. 515 – 522, 2010.

PIRES, A. C. S. et al. Increased preservation of sliced mozzarella cheese by antimicrobial sachet incorporated with allyl isothiocyanate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1002-1008, 2009.

RANDRIANARIVELO, R. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. **Food Chemistry**, v. 114, p. 680 – 684, 2009.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; J. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80 – 84, 2005.

ROLIM, M. T. **Avaliação da eficácia do açafrão (*Curcuma longa L.*) no controle de *Staphylococcus aureus* em queijo prato**. 2004. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2004.

ROSA, V. P. **Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas Frescal**. 2004. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz/USP, Piracicaba, 2004.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1901-1906.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, v. 6, p. 29 – 44, 1983.

SHINOHARA, N. K. S. et al. Salmonella spp. Importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675 – 1683, 2008.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 136-141, 2010. Suplemento.

SILVA, N. ***Escherichia coli* O157:H7 em alimentos**. 2004. 106 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, v. 18, p. 463 – 470, 2001.

SOFIA, P. K. et al. Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common foodborne pathogens. **International Journal of Food Science Technology**, v. 42, p. 910 – 915, 2007.

TAJKARIMI, M. M. et al. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199 – 1218, 2010.

TASSOU, C., DROSINOS, E. H., NYCHAS, G.-J. E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4°C and 10°C. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 593 – 600, 1995.

TASSOU, C.; DROSINOS, E.H., NYCHAS, G.-J.E. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 1, p. 31 – 34, 1996.

TSIGARIDA, E., SKANDAMIS, P., NYCHAS, G.-J.E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 901 – 909, 2000.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

TURKER, A. U.; USTA, C. Biological screening of some Turkish medicinal plant extracts for antimicrobial and toxicity activities. **Natural Product Research**, v. 2, n. 2, p. 136–146, 2008.

ULTEE, A.; KETS, E. P.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.

USHIMARU, P. I. et al. Antibacterial activity of medical plant extracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 717 – 719, 2007.

VALLE, J. L. E. Riscos na produção de queijos e princípios de lavagem e desinfecção de equipamentos. **Revista Leite e Derivados**, n. 21, p. 67 – 68, 1995.

VAN OMSON, G. et al. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

VIUDA-MARTOS, M. et al. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. **Food Control**, v. 22, p. 1715 – 1722, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety and foodborne illness**. Geneva: World Health Organization, 2007. (Fact Sheet, 237)

YOSSA, N. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 in organic soil. **Food Control**, v. 21, p. 1458 – 1465, 2010.