

**EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS NO CRESCIMENTO DE
Staphylococcus aureus E *Escherichia coli* EM
QUEIJO RICOTA**

MARIA MILAGROS VILLEGAS ALARCÓN

2007

MARIA MILAGROS VILLEGAS ALARCÓN

**EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NO
CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli* EM
QUEIJO RICOTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Alarcón, Maria Milagros Villegas

Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota / Milagros Villegas Alarcon. -- Lavras: UFLA, 2007.

56 p. : il.

Orientadora: Roberta Hilsdorf Piccolli.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Ricota. 2. Óleo essencial. 3. *Staphylococcus*. 4. *Escherichia*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-637.353

MARIA MILAGROS VILLEGAS ALARCÓN

**EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NO
CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*
EM QUEIJO RICOTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 12 de abril de 2007.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

UFLA

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado.

Ao meu pai, Oswaldo e minha mãe, Madgy, pelo amor, confiança e apoio.

Ao meu irmão, Oswaldo, pelo carinho e amizade.

Aos meus avós, Edel, Julio e Victor, pelo carinho que sempre recebi deles e cuja lembrança esta sempre comigo.

A minha avô Angélica, pelo carinho e orações cheias de fé e amor.

A minha tia Marujita, por estar sempre preocupando-se comigo.

A minha orientadora Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, pela orientação, atenção e incentivo.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pelo apoio e a oportunidade de poder realizar o mestrado.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pela grande ajuda recebida e pela consideração.

Ao professor Dr. Luis Ronaldo de Abreu, pela atenção.

Ao professor Dr. Jose Luiz Pereira, pelo fornecimento da cepa utilizada neste experimento.

À Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande (CAARG).

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela cooperação e ensinamentos.

A Ana Carolina ,pela ajuda durante o experimento.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Cleube, Danilo, Gisele, Belami, Aline e Camila, pelo apoio e amizade.

A Ivani, Eliane, Magda, Cleuza, pessoas das que recebi um importante apoio.

Aos amigos do Mestrado Tais, Carolina, André, Gisele, pela amizade e bons momentos.

Aos amigos que me acompanharam e que fizeram agradável a permanência em Lavras.

Aos meus familiares, pelo carinho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, me ajudaram a alcançar este objetivo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> e intoxicação estafilocócica.....	3
2.2 <i>Escherichia coli</i> em alimentos.....	6
2.3 Óleos essenciais e sua aplicação como conservantes de alimentos.....	9
2.4 Ricota.....	16
3 MATERIAL E METODOS.....	17
3.1 Extração dos óleos essenciais.....	17
3.2 Microrganismos e preparação do inóculo.....	18
3.3 Atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais.....	18
3.4 Avaliação da atividade dos óleos essenciais na ricota.....	19
3.4.1 Preparo das amostras.....	19
3.4.2 Análise microbiológica.....	20
3.5 Análise estatística.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais.....	22
4.2 Atividade dos óleos essenciais em ricota.....	26
4.3 Avaliação do crescimento da cultura mista <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> inoculada em ricota.....	31
5 CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 Aspecto das folhas frescas de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) (A). Aspecto das folhas e grãos frescos de pimenta do reino preta (<i>Piper nigrum</i>) (B).....	12
FIGURA 2 Estrutura química da piperidina.....	12
FIGURA 3 Estrutura química do timol (A) e carvacrol (B).....	14
FIGURA 4 Estrutura química do limoneno (A) e β -pineno (B).....	15
FIGURA 5 Halos de inibição obtidos pelo método de difusão cavidade placa agar, pelo óleo essencial de orégano, em <i>S. aureus</i> (A) e <i>E. coli</i> (B).....	22
FIGURA 6 Halos de inibição obtidos pelo método de difusão cavidade placa agar, pelo óleo essencial de pimenta-do-reino preta, em <i>S. aureus</i> (A) e <i>E. coli</i> (B).....	23
TABELA 1 Atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) e óleo essencial de pimenta-do-reino preta (<i>Piper nigrum</i> L).....	23
FIGURA 7 Efeito dos óleos essências de orégano (1%) e pimenta-do-reino preta (5%) sobre a concentração de <i>S. aureus</i> em ricota armazenada a 7°.....	26
FIGURA 8 Efeito dos óleos essências de orégano (1%) e pimenta-do-reino preta (5%) sobre a concentração de <i>E. coli</i> em ricota armazenada a 7°C.....	28
FIGURA 9 Efeito da interação no crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> adicionados de óleo essencial de orégano.....	31
FIGURA 10 Efeito da interação no crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> adicionados de óleo essencial de pimenta-do-reino preta.....	32

RESUMO

ALARCÓN, Maria Milagros Villegas. **Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota.** 2007. 56 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

A tendência atual da ciência dos alimentos de seguir uma linha de pesquisa orientada à investigação de novas tecnologias de preservação, na qual procuram-se alternativas para a utilização de técnicas tradicionais, justifica-se pelo aspecto negativo que estas últimas poderiam representar na saúde do consumidor e nas características nutricionais e sensoriais no alimento. Os óleos essenciais estão incluídos dentro do grupo de tecnologias inovativas, devido a suas comprovadas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. A presente investigação avaliou a ação dos óleos essenciais em queijo ricota. Óleos essenciais extraídos de orégano (*Origanum vulgare*) e pimenta do reino preta (*Piper nigrum* L) foram avaliados quanto sua capacidade em inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, *in vitro*, utilizando o método de difusão cavidade placa ágar e em ricota, armazenada a 7°C, pelo período de 21 dias. As concentrações de ambos os óleos que inibiram, no teste *in vitro*, as duas bactérias foram utilizadas no teste em queijo ricota. A concentração de 1% de óleo de orégano diminuiu em 3,36 e 1,88 ciclos logarítmicos a população de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. O óleo essencial de pimenta-do-reino preta teve discreta atuação. O número de *S. aureus* e *E. coli* foi reduzido em 1,39 e 1,17 ciclos logarítmicos quando utilizado 5% de óleo, respectivamente. Avaliando-se o efeito sinérgico de inibição entre *S. aureus* e *E. coli* em presença dos óleos e inoculados em ricota, não foi observado qualquer efeito de interação entre os microrganismos. O presente trabalho permite corroborar que os óleos essenciais poderiam ser, na prática, uma alternativa para a obtenção de alimentos naturais e, ao mesmo tempo, seguros. Porém, tem que ser considerado que seu uso veria-se limitado ao grau e ao espectro de inibição do óleo, como demonstrado no presente estudo.

¹ Orientadora: Profª. Dra. Roberta Hilsdorf Picolli – UFLA

ABSTRACT

ALARCÓN, Maria Milagros Villegas. **Inhibitory effect of essential oils on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* growth in ricotta cheese.** 2007. 56 p. Dissertation (Master Program in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

The actual tendency of food science to follow an investigation line oriented to research new preservation techniques instead of traditional ones is justified because the negatives aspects in the consumers' health and in the nutritional and sensorial properties of the food that the last ones represent. The essential oils are included into de innovative preservation techniques because their antimicrobials and antioxidants properties. The present study evaluated the essential oil action in ricotta cheese. Essential oils from oregano (*Origanum vulgare*) and black pepper (*Piper nigrum* L) were evaluated for their inhibitory capacity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* growth, *in vitro*, using the agar well technique and in ricotta at 7°C over a 21-day period. The essential oil concentration that was inhibitory in the *in vitro* test was used in the ricotta cheese. Oregano essential oil at 1% reduced in 3,36 and 1,88 logarithmic units the *S. aureus* and *E. coli* population, respectively. The black pepper essential oil has a discrete performance. The 5% concentration of this oil reduced in 1,39 and 1,17 logarithmic units the initial counts of *S. aureus* and *E. coli*, respectively. It was not observed interaction between *S. aureus* and *E. coli* when evaluated the synergistic effect of inhibition. The present work permit corroborated that essential oils can became in practice an alternative to obtain natural and safe food products. However it has to be consider that essential oils use is limited to their spectrum and inhibition grade like observed in this study.

¹ Advisor: Roberta Hilsdorf Piccolli– UFLA

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade, há uma tendência na substituição de técnicas tradicionais de preservação de alimentos por novas técnicas, devido a um aumento da demanda pelos consumidores por alimentos nutritivos e naturais, embora estáveis e seguros.

Dentro das novas técnicas de conservação, os compostos naturais como extratos de plantas e óleos essenciais têm demonstrado possuir propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Devido ao caráter hidrofóbico destes compostos, podem ocorrer distúrbios na membrana celular, afetando a viabilidade dos microrganismos. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido avaliada contra bactérias deterioradoras e patogênicas, contra fungos filamentosos toxigênicos e deterioradores, e leveduras patogênicas.

Staphylococcus aureus é um dos microrganismos patogênicos mais importantes, sendo responsável pela produção de toxinfecções alimentares. Em alguns países, incluindo o Brasil, tem sido indicado como o microrganismo mais freqüentemente relacionado por ocasionar surtos a partir de leite cru e queijos, tendo sua origem em matérias-primas obtidas de vacas com mastite ou em fontes humanas. Na produção tradicional de queijos, após a pasteurização do leite, o produto resultante é considerado seguro da presença de *S. aureus*, porém, a contaminação pode acontecer em etapas posteriores, como na adição do inóculo ou embalagem, por contato com equipamento, manipulação, entre outros fatores.

Escherichia coli tem como hábitat o trato entérico de humanos e animais. Assim, a presença deste microrganismo indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, sendo considerado o indicador clássico da possível presença de microrganismos patogênicos. É freqüentemente encontrado em grande população em queijos macios. As cepas de *E. coli* não são, geralmente,

patogênicas embora *E. coli* enteropatogênica tenha sido isolada em queijos com elevada umidade.

Dentro de todos os queijos, a ricota é um dos mais consumidos do Brasil. A ausência de barreiras antimicrobianas neste tipo de produto, como, por exemplo, pH quase neutro, alta umidade, baixo conteúdo de sal e não adição de "starter", permite o crescimento rápido de microrganismos; porém, certos aditivos são utilizados para prolongar o tempo de conservação e a segurança em diferentes tipos de queijo. A legislação brasileira permite a utilização de nisina e nitrato de sódio ou potássio como conservantes.

Segundo o exposto, os óleos essenciais podem ser considerados como uma alternativa factível aos aditivos sintéticos, em que seriam utilizados como métodos adicionais no controle de microrganismos patogênicos e deterioradores; porém, existe pouca informação disponível relacionada aos efeitos do uso dos óleos essenciais em matrizes alimentares. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito inibitório do óleo essencial de orégano e pimenta-do-reino preta sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli in vitro* e na matriz alimentar ricota. Também se procurou avaliar a interação entre estas duas bactérias na ricota, adicionado de óleo essencial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Staphylococcus aureus* e intoxicação estafilocócica

Os gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* compreendem a família Micrococcaceae. Na atualidade, o gênero *Staphylococcus* inclui 33 espécies reconhecidas (Behme et al., 1996). Apresentam-se como cocos Gram-positivos, não esporulados, anaeróbios facultativos e de diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm (Kloss & Schleifer, 1986).

Staphylococcus aureus é um microrganismo mesófilo, entretanto, estudos comprovam que pode crescer em uma ampla margem de temperaturas, tendo como limite mínimo e máximo 6,5°C e 48,5°C (Tatini, 1973; Schmitt et al., 1990). O pH ótimo para o crescimento é 6 a 7, podendo crescer entre valores de 4 a 10. O microrganismo pode desenvolver-se em meio contendo até 20% de cloreto de sódio (Tatini, 1973). É considerada como a eubactéria mais halotolerante não-halófila, crescendo até a_w (atividade de água) de 0,86 (Gutierrez et al., 1995; Wijnker et al., 2006).

Staphylococcus aureus tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares como coagulase, termonuclease e lipase, consideradas fatores de virulência, sendo também empregadas para a sua identificação entre outras espécies de estafilococos (Madani, 1998).

O hábitat principal de *Staphylococcus aureus* em humanos e animais é a mucosa naso-faríngea, onde forma parte da microbiota normal. Organismos presentes no nariz podem contaminar facilmente a pele, assim portadores nasais podem ser portadores cutâneos (Fueyo et al., 2005). Lues e Van Tonder (2007) encontraram uma incidência de 88% das amostras, ao investigar a presença de *S. aureus* nas mãos de manipuladores de alimentos. Este fato é preocupante, já que este microrganismo é reconhecido como um importante agente patogênico, por

sua capacidade de produzir toxinfecções alimentares (De Buyser et al., 2001; Jorgensen et al., 2005), sendo que de um terço até a metade das linhagens estudadas tem demonstrado ser enterotoxigênicas (Bergdoll, 1989).

A intoxicação estafilocócica consiste na ingestão de uma ou mais toxinas pré-formadas nos alimentos que tenham sido contaminados por várias espécies de estafilococos, especialmente *S. aureus* (Fueyo et al., 2001). Esta intoxicação é caracterizada por um período curto de incubação (2-6 horas) após o consumo da toxina, seguido por náusea, vômito, dor abdominal e diarreia (Balaban & Rasooly, 2000). A doença é raramente mortal, precisando de 24 horas de recuperação nos casos mais leves (ICSMF, 2000).

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são um grupo heterogêneo de proteínas de cadeia simples, de baixo peso molecular (28.000 a 35.000 daltons) (Su & Wong, 1995). Estas toxinas são classificadas de acordo com as suas propriedades antigênicas, como SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ (Balaban & Rasooly, 2000; Fueyo, 2001;). Apresentam propriedades como atividade emética, resistência ao calor e à pepsina, similaridade na estrutura terciária e superantigenicidade (Dinges et al., 2000). Estudos mostram que existe certa semelhança entre a seqüência de aminoácidos de algumas estafilotoxinas, por exemplo, SEA e SEE apresentam uma homologia de 81%, SEB e SEC1 de 67%, tendo SEH pouca similaridade com elas (Balaban & Rasooly, 2000).

A produção de enterotoxina se dá em condições mais favoráveis do que para o crescimento. A temperatura ótima para a produção de enterotoxina é de 40°-45°C, no entanto tem-se detectado entre 10° e 46°C (Tatini, 1973). A produção de enterotoxina a pH neutro é máxima, mas decresce a pH ácido, os limites de produção vão de 4 e 9,8, sendo a disponibilidade de oxigênio e a natureza do acidulante fatores que podem afetar estes valores (Varnam & Evans, 1991). O microrganismo *S. aureus* pode produzir enterotoxina a partir de a_w

maior a 0,86 (Tatini, 1973), representando um risco relacionado a alimentos com umidade intermediária 0,6-0,9 (Leistner, 1987).

Estas toxinas têm sido detectadas em alimentos contendo cerca de 10^6 UFC/g, no entanto, têm sido reportado níveis maiores e menores (Anuniação et al., 1995). Do Carmo et al. (2002) obtiveram contagens de 2×10^3 e 2×10^8 UFC/g em amostras de leite não pasteurizado e queijo minas, respectivamente, responsáveis por causar surtos por intoxicação estafilocócica no Brasil. A quantidade de enterotoxina necessária para causar intoxicação é muito pequena. Evenson et al. (1988) detectaram 0,5 ng/mL de estafilotoxina A (SEA) em leite achocolatado vinculado a um surto nos Estados Unidos. Além disso, 55,5 ng/g de enterotoxina estafilocócica H (SEH) foram detectados em purê de batata elaborado com leite cru, associado a um surto (Jorgensen et al., 2005).

Staphylococcus aureus é capaz de crescer e produzir toxina em uma ampla margem de condições ambientais e em uma variedade de alimentos. Diversos trabalhos relatam a influência da temperatura, pH, tensão de oxigênio, a_w , microbiota competitiva, entre outros fatores no crescimento e produção de enterotoxina. Fujikawa & Morozumi (2006) verificaram que a produção de enterotoxina aumentou linearmente com o aumento da temperatura, observando também que, a 32°C, demorou quase a metade do tempo em chegar à máxima quantidade de enterotoxina produzida do que a 23°C. Em um trabalho realizado por Su & Won (1998), foi verificado in vitro o efeito do pH e aeração na produção de estafilotoxina H. Aeração de 300 cc/min e pH de 7 foram indicados como parâmetros ótimos.

A microbiota competitiva encontrada em alimentos crus, semi-processados e fermentados afeta o crescimento de *Staphylococcus aureus* e, conseqüentemente, a produção de enterotoxina. É bem conhecido que as bactérias ácido lácticas exercem um forte antagonismo contra *S. aureus*, no entanto, estudos que relatem a influência de outros microrganismos, por

exemplo, deterioradores ou patogênicos são escassos. As bactérias ácido lácticas exercem seu efeito inibitório por competição por nutrientes ou pela produção de metabólitos ativos (Devlieghere et al., 2004). Gonzáles-Fandos et al. (1999) demonstraram que o crescimento de *S. aureus* em lingüiça foi claramente afetado pela temperatura de fermentação e, especialmente, o "starter". A produção de enterotoxina não foi inibida, no entanto, a diminuição da quantidade foi notória. Zárate et al. (1997) indicaram que a população em queijo maturado caiu significativamente com o tempo, onde após 60 dias não foi detectada a presença de *S. aureus*.

S. aureus junto com *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *E. coli* patogênica estão incluídas dentro do grupo de bactérias que constituem uma maior ameaça à segurança de queijos (De Buyser et al., 2001). Produtos como leite e derivados estão comumente relacionados por provocarem intoxicação estafilocócica, devido à má qualidade da matéria-prima (leite obtida de animais com mastite), má condições de elaboração (refrigeração e pasteurização deficiente, contaminação cruzada, incorreta higienização dos manipuladores). Diversos autores têm relatado surtos, nos quais o consumo de queijo, creme, leite cru, leite em pó desnatado foram implicados (Sabioni et al., 1988; Pereira et al., 1994; do Carmo et al., 2002; Asao et al., 2003).

2.2 *Escherichia coli* em alimentos

Escherichia coli pertence à família Enterobacteriaceae. Os membros desta família são bacilos Gram-negativos, de 1,1 a 1,5 x 2,0 a 6 µm. Alguns têm a capacidade de motilidade possuindo flagelos peritricos, são anaeróbios facultativos e fermentam a glicose com formação de ácido e gás (Holt et al., 1994).

E. coli pode crescer entre pH de 4,4 a 9 (ICSMF, 2000), porém, é conhecida sua capacidade de tolerar ambientes ácidos, que lhe permitem

sobreviver no trato gastrintestinal. Sainz et al. (2005) demonstraram que cepas de *E. coli* não adaptadas a ambientes ácidos sobreviveram em pH de 2,5 até por 6 horas. Em condições ótimas de crescimento, *E. coli* pode crescer acima de a_w de 0,95 (Varnam & Evans, 1991). Entretanto, tem-se demonstrado a viabilidade de *E. coli* O157: H7 a a_w 0,34 por até 8 semanas (Ryu et al., 1999). A temperatura de crescimento varia entre 7° a 48°C, sendo 37°C a temperatura ótima (Varnam & Evans, 1991). No entanto, diversos autores têm observado crescimento em alimentos de algumas cepas de *E. coli* a temperaturas menores, como 4°C, por vários dias (Anang et al., 2007; González-Montalvo et al., 2007).

A espécie *Escherichia coli* inclui cepas não virulentas, que têm como hábitat o trato entérico de humanos e animais sadios, e cepas altamente patogênicas, responsáveis por provocar surtos de doenças em humanos e animais com considerável taxa de mortalidade. A presença de cepas não patogênicas em alimentos indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, sendo considerado o indicador clássico da possível presença de microrganismos patogênicos. Contagens elevadas de *E. coli* também relacionam-se à falta de higiene e falhas no processamento de alimentos (ICSMF, 2000; Yucel & Ulusoy, 2006).

Os patótipos de *E. coli* têm sido classificados como patogênicos de origem entérico e patogênicos extraintestinais. O primeiro grupo são causadores de produzir diarreias em humanos e animais. O segundo causa infecções do trato urinário, sépsis e meningites (Kuhnert et al., 2000). A transferência de genes, por ganância e perda de elementos genéticos móveis, incluindo plasmídeos, bacteriófagos e ilhas de patogeneidade, logrou que *E. coli* não patogênica pudesse desenvolver diferentes mecanismos que lhe permitiram ter a capacidade de aderir-se, crescer e colonizar o hospedeiro (Dobrindt, 2005). Estes mecanismos são chamados fatores de virulência e incluem-se toxinas, adesinas, invasinas, cápsula, resistência ao soro e captação de ferro (Kaipainen et al.,

2002). *E. coli* patogênica entérica e classificada como entero-toxigênica (ETEC), entero-patogênica (EPEC), entero-hemorrágica (EHEC), entero-invasiva (EIEC), entero-agregativa (EAaggEC), e de aderência difusa (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998).

Gado bovino tem se apresentado com um portador assintomático de *E. coli* patogênica (Heuvelink et al., 1998). Cerqueira et al. (1999) analisaram 197 amostras fecais de gado bovino sadio; três isolados pertenceram ao serotipo O157:H7, tendo um sido procedente de gado de corte (produtora de shiga toxina), e dois de gado leiteiro. Este fato poderia explicar a incidência destas cepas em alimentos elaborados à base de carne, leite não pasteurizado e derivados, vegetais crus e minimamente processados. Durante o beneficiamento dos animais, *E. coli* pode ser transferida à carcaça, inclusive em etapas anteriores ao eviscerado (McEvoy et al., 2003). O leite e derivados podem sofrer contaminação direta ou indireta por este microorganismo. Lira, Macedo & Marin (2004) observaram uma incidência de *E. coli* produtora de shiga toxina (STEC) em 12,08% das amostras de leite obtidas de vacas com mastite. *E. coli* patogênica pode chegar ao leite pasteurizado e derivados por contaminação cruzada (CDC, 2000). Os vegetais e frutas podem ser contaminados pelo adubo, durante a irrigação, ou durante o processamento, como no lavado e no esfriamento (CDC, 1997; Taormina et al., 1999; Islam et al., 2005).

EHEC O157:H7 e STEC O157 são as cepas de *E. coli* mais predominantemente isoladas de leite cru e derivados e, conseqüentemente, formam parte do grupo de bactérias patogênicas responsáveis pelos surtos provocados pelo consumo destes produtos. (De Buyser et al., 2001). Oksuz et al. (2004), ao analisarem 100 amostras de leite não pasteurizado e 50 amostras de queijo elaborado com leite não pasteurizado, encontraram a presença de *E. coli* O157 em 1% e 4% das amostras, respectivamente. Os autores indicaram que, no entanto, a incidência foi baixa, conseqüentemente representando um risco

pequeno. Tem sido demonstrado que esta bactéria pode sobreviver às condições de processamento de queijos, incluindo maturação. Em uma investigação realizada por Dontorou et al. (2003) foi detectada a presença de *E. coli* O157:H7 em 1 de 100 amostras de leite de ovelha cru, no entanto, não foi detectada nas amostras de leite de vaca ou cabra.

O consumo de queijo fresco contaminado com *E. coli* O157:O7 produziu um surto em 1998, envolvendo 55 pessoas. Os resultados das amostras analisadas demonstraram que houve contaminação cruzada entre o leite cru e o produto final, por meio da matéria-prima e equipamento (CDC, 2000). Em 1997, detectaram-se cinco casos de gastroenterites relacionadas ao consumo de queijo elaborado com leite cru. As amostras analisadas apresentaram 5 -10 NMP *E. coli* O157/g.

O comportamento em matrizes alimentares de *E. coli* com relação a outros microrganismos tem sido avaliado em produtos fermentados, como queijo e lingüiça, em que a biota ácido láctica tem um efeito antagonista para com esta bactéria. Porém, *E. coli* é considerado um microrganismo resistente ao baixo pH. Vernozy-Rozand et al. (2005) observaram uma diminuição de 2 ciclos \log_{10} após 42 dias de maturação nos queijos elaborados com leite inoculado com 10^4 UFC/mL. O pH das amostras variou de 6,7 a 4,3. Os mesmos autores, em um trabalho anterior, estudaram o comportamento de *S. aureus* sob as mesmas condições, em que, após os 42 dias, não detectou-se a presença da bactéria. Foi estudado, por Luukonem et al. (2005), o efeito das bactérias ácido lácticas contra *E. coli* O157:H7 em queijo edam. Observou-se uma diminuição de quase 2 ciclos \log_{10} , após 41 dias de maturação.

2.3 Óleos essenciais e sua aplicação como conservantes de alimentos

O crescente interesse dos consumidores por alimentos naturais obriga a indústria a pesquisar novas alternativas de conservação de alimentos. Assim,

podem-se mencionar compostos naturais como lisozimas, compostos de plantas, bacteriocinas e quitosân. Entre os compostos de plantas, os extratos e óleos essenciais têm demonstrado possuir propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antiparasitárias (Okpekon et al., 2004; Sokmen et al., 2004; Sacchetti et al., 2005; Ferreira et al., 2006).

Os óleos essenciais são líquidos aromáticos obtidos de diferentes partes de plantas, como raízes, folhas, flores, sementes e ramos, geralmente por hidrodestilação ou arraste de vapor. São misturas quimicamente complexas, porém, o número de compostos responsáveis pelo odor e sabor é limitado (Aridogan et al., 2002).

A atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais tem sido avaliada amplamente contra microrganismos deterioradores e patogênicos, contra fungos filamentosos toxigênicos e deterioradores e leveduras patogênicas. No entanto, tem-se estudado a atividade dos óleos nas mais diversas matrizes alimentares, como salsichas (Lemay et al., 2002; Singh et al., 2003), queijo suave (Smith -Palmer et al., 2001), queijo mussarela (Menon & Garg, 2001), iogurte (Penney et al., 2004), alface (Wan, 1998) e cenoura (Singh et al., 2002). Os trabalhos realizados, basicamente, englobam um grupo pequeno de microrganismos (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *E. coli* não patogênica), bem como dos óleos testados (tomilho, canela, cravo da Índia, vanilina, mostarda).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais está relacionado com a perturbação da membrana citoplásmica, interrupção da força motriz de prótons, do fluxo de elétrons, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares (Burt, 2004).

Diversos autores têm estudado a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Canillac &

Mourey, 2001; Opalchenova & Obreshkova, 2003; Skaltsa et al., 2003; Baydar et al., 2004; Benkeblia, 2004; Edwards-Jones et al., 2004). Matan et al. (2006) estudaram o efeito inibitório da mistura dos óleos essenciais de canela e cravo da Índia em fase gasosa junto com atmosfera modificada (40% de CO₂) contra *S. aureus*, observando que o crescimento deste microorganismo foi inibido até por 41 dias. A atividade do óleo essencial de algumas espécies de tomilho foi testada por Cosentino et al. (1999) contra *S. aureus* e *E. coli*. Os autores obtiveram concentrações mínimas bactericidas entre 225-900 e 450-900 µg/mL, respectivamente, atribuindo esta atividade ao elevado conteúdo de carvacrol e timol presentes neste óleo. Oussalah et al. (2007) determinaram a concentração mínima inibitória de um extenso grupo de óleos essenciais contra *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes*. Dos 28 óleos testados, os extraídos de *Corydothymus capitatus*, *Cinnamomum cassia*, *C. verum*, *Satureja montana* e *Origanum heracleoticum* apresentaram maior atividade contra os quatro microrganismos testados.

Tradicionalmente, o orégano (*Origanum vulgare*) e a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L) têm sido empregados popularmente como condimentos, mas, devido à presença de compostos antimicrobianos, possuem um potencial para seu uso como agentes para a preservação de alimentos (Figura 1). Trabalhos comparativos *in vitro* indicam o óleo essencial de orégano como possuidor de uma importante atividade antimicrobiana sobre as bactérias *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Proteus vulgaris* sobre a levedura *Cândida albicans* e sobre os fungos *Fussarium* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., merece destaque também a atividade antioxidante do extrato alcoólico (Valero & Salmerón, 2003; Sahin et al., 2004; Capecka et al., 2005; Moreira et al., 2005). A pimenta-do-reino é um condimento valorizado por seu aroma e pungência, de importância comercial para o Brasil, que é um dos grandes exportadores mundiais (International Pepper

Comunity, 2003). A presença da alquilamida piperidina na sua composição confere lhe propriedades biológicas, como antipirética, analgésica e antibacteriana (Parmar et al., 1997; Venkat et al., 2004) (Figura 2).

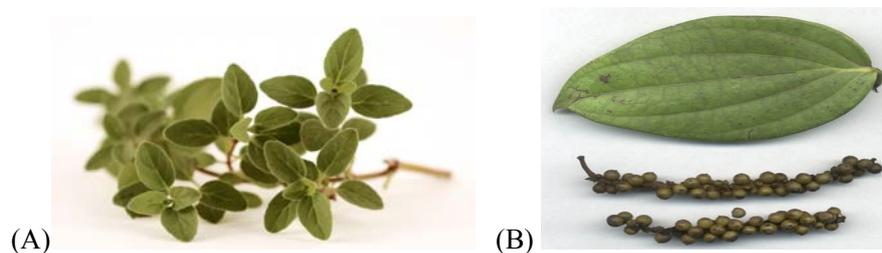


FIGURA 1 Aspecto das folhas frescas de orégano (*Origanum vulgare*) (A). Aspecto das folhas e grãos frescos de pimenta-do-reino preta (*Piper nigrum*) (B).

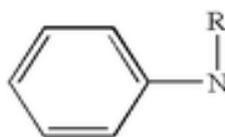


FIGURA 2 Estrutura química da piperidina.

Souza et al. (2007) testaram a atividade do óleo essencial de orégano contra leveduras deterioradoras de alimentos, incluindo a *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *Pichia minuscula*, *P. ohmeri*, *Rhodotorula rubra* e *Saccharomyces cerevisiae*, indicando que houve uma diminuição da taxa de crescimento em todas elas. O crescimento de *C. tropicalis* foi inibido até por 12 horas, tendo a contagem de células de *C. krusei* caído significativamente durante as 24 horas de exposição.

Foi estudado, por Velluti et al. (2003), o efeito dos óleos essenciais de canela, cravo-da-índia e orégano, entre outros, no crescimento de *Fusarium proliferatum* e na produção de fumonisina B1, em milho. O óleo de orégano foi capaz de inibir o crescimento e a produção de micotoxina com 0,995 de a_w a 20°C, no entanto, a 0,950 de a_w , foi inibido o crescimento, mas não a produção de fumonisina. Os autores atribuem esta diferença nos resultados ao fato que a penetração dos óleos no alimento foi facilitada pela presença de água.

A atividade antimicrobiana do orégano tem sido testada também em matrizes alimentares. Mejlholm & Dalgaard (2002) demonstraram o efeito contra *Photobacterium phosphoreum* em peixe. O óleo essencial de orégano, a uma concentração de 0,05 %, foi capaz de estender a vida em prateleira de filés de peixe armazenados em atmosfera modificada, a 2°C, de 12 até 26 dias.

Dentro dos constituintes majoritários do óleo essencial de orégano, os compostos terpenóides timol e carvacrol são reconhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas (Karatzas et al., 2001; Valero & Francês, 2006) (Figura 3). Nostro et al. (2004) testaram a susceptibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes e não resistentes à meticilina, na presença de óleo essencial de orégano, carvacrol e timol. Estes autores concluíram que as cepas de *S. aureus* resistentes e não resistentes à meticilina foram igualmente susceptíveis à ação do óleo essencial de orégano e seus componentes majoritários. Com relação aos resultados da concentração mínima inibitória, encontraram 0,015%-0,03 % v/v para o carvacrol, 0,03%-0,06% v/v para o timol e 0,06 - 0,125 % v/v para o óleo essencial de orégano.

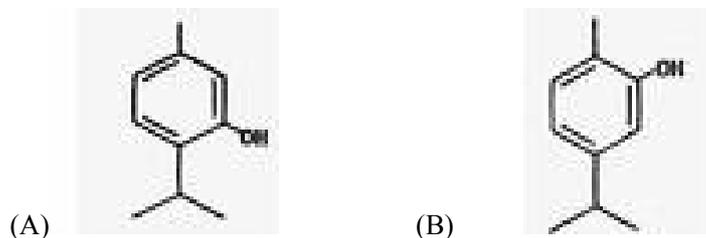


FIGURA 3 Estrutura química do timol (A) e carvacrol (B)

A atividade antimicrobiana da pimenta-do-reino tem sido pouco estudada. Venkat et al. (2004) isolaram 5 compostos no extrato de éter de petróleo de pimenta-do-reino preta e, pela primeira vez, testaram a atividade antimicrobiana in vitro. Os compostos 2E, 4E, 8Z-N-isobutileicosatrienamida, pelitorina, traquiona, perguminida e isopiperoleína foram ativos em todas as bactérias testadas, entre elas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Klebsiella aerogenes* e *Chromobacterium violaceum*.

Pradhan et al. (1999) demonstraram o efeito bacteriostático de dois compostos fenólicos presentes no extrato alcoólico de pimenta-do-reino verde. O 3,4-dihidroxifenil etanol e o 3,4-dihidroxi-6-(N-etilamino) benzamida apresentaram atividade sobre *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

A pimenta-do-reino tem como componentes majoritários o limoneno, o β -pineno e o α -felandreno (Jirovetz et al., 2002). O limoneno e o β -pineno são constituintes majoritários também das frutas cítricas e se lhes atribui atividade antimicrobiana (Figura 4).



FIGURA 4 Estrutura química do limoneno (A) e β -pineno (B)

Na atualidade, conhece-se pouco sobre os mecanismos de resistência bacteriana contra os óleos essenciais. Estudos empregando substâncias hidrofóbicas, por exemplo, tolueno e ácido benzóico, têm demonstrado que bombas de efluxo estão relacionadas ao mecanismo de resistência (Brul & Coote, 1999). Os solventes orgânicos exercem sua toxicidade acumulando-se na membrana bacteriana, causando danos a esta e, finalmente, produzindo a morte celular (Heipieper et al., 1994). Ramos et al. (1997) afirmam que a presença de sistemas de energia dependentes, como bombas de efluxo em *Pseudomonas putida*, é crítica para a sua tolerância a solventes. Em *E. coli*, têm-se identificado bombas de efluxo de compostos anfipáticos, a AcrAB (White et al., 1997). Em *S. aureus*, a bomba de efluxo de resistência a drogas, NorA, está relacionada à resistência ao derivado de planta berberina (Stermitz et al., 2001).

Apesar da aplicação prática dos compostos naturais estar restrita às possíveis modificações sensoriais nos alimentos e à influência na eficácia da interação destes compostos com os ingredientes (Devlieguere et al., 2004), atualmente, encontram-se disponíveis no mercado conservantes à base de compostos de plantas, aplicados com sucesso na indústria de alimentos (Burt, 2004).

2.4 Ricota

A ricota é um queijo suave, não maturado, que foi tradicionalmente produzido na Itália a partir do leite de ovelha. Na atualidade, atingiu maior popularidade, sendo elaborado de soro ou uma mistura de soro e leite pasteurizado integral de vaca. O princípio de fabricação da ricota é baseado na precipitação das proteínas do soro (albumina e lactoglobulina) por meio de calor associado à acidificação (Farkye, 2004).

No processamento tradicional da ricota, o soro pode ser acrescentado de até 15% de leite. A mistura é aquecida a 80°-90°C e, em seguida, seguidamente realiza-se o processo de acidificação com ácido láctico. O aquecimento é interrompido quando os primeiros grãos aparecem na superfície (Furtado, 1994).

A ricota conta com 72% de matéria seca, conteúdo protéico de 8,0% a 12,0%, 3% de lactose e pH ao redor de 5,8. Devido ao elevado pH e alta umidade, a ricota favorece o desenvolvimento de microrganismos o que limita seu tempo de conservação entre 1 a 3 semanas, a 4°C (Farkye, 2004; Pintado et al., 2001). Durante o aquecimento do soro, este produto é considerado livre de microrganismos. Sims et al. (1989) indicaram que a contaminação após o tratamento térmico com bactérias psicotróficas aplicado durante a elaboração é o principal problema que influencia a vida de prateleira do produto. Entretanto, Govaris et al. (2001) indicam que o aquecimento aplicado ao soro destrói a microbiota natural incluindo bactérias ácido lácticas, que agem como antagonistas de microrganismos patogênicos que poderiam chegar ao produto durante a manipulação, a embalagem e o armazenamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração dos óleos essenciais

A obtenção dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os condimentos (orégano e pimenta-do-reino preta) desidratados, destinados à obtenção de óleos essenciais, foram adquiridos no mercado municipal de Belo Horizonte, sendo submetidos ao controle de qualidade microbiológico, incluindo contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, coliformes totais e fecais pela técnica de Numero Mais Provável (NMP) (ICSMF, 2000).

Os óleos essenciais foram extraídos pelo método de hidrodestilação, empregando o aparelho Clevenger modificado. Em cada extração foram utilizados 300 gramas de orégano (*Origanum vulgare*) e 400 gramas de pimenta-do-reino preta moída (*Piper nigrum* L). O material foi acondicionado em balões de 6 litros e mantido em ebulição, à temperatura constante, por 3 horas. Decorrido esse tempo, o hidrolato foi coletado e centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36 x G por 5 minutos. A fase aquosa foi retirada do hidrolato adicionando sulfato de sódio anidro à fase orgânica e levando-se à centrifugação novamente, para a obtenção do óleo puro. No total, foram utilizados 5 kg de orégano e 8 kg de pimenta-do-reino preta para todo o processo de extração. Os óleos essenciais foram armazenados, protegidos da luz, a 4°C.

3.2 Microrganismos e preparação do inóculo

A cepa de *Staphylococcus aureus* FRI 722, produtora de enterotoxina A foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Luiz Pereira (Unicamp) e a cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 foi cedida pela Fundação André Tosello. Ambas foram mantidas em tubos inclinados contendo TSA (Trypticase soy agar), sob refrigeração (4°C).

As cepas foram reativadas inoculando-se uma alçada em tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), por 24 horas, a 37°C. Foi colocado 1mL dos crescimentos em eppendorfs e centrifugados utilizando-se centrífuga modelo 5415 C, a 735 x G, por 15 minutos. Depois, 10 µL de células foram coletados do pellet formado e inoculados em 200 mL de caldo BHI. Avaliou-se o crescimento de cada cepa fazendo-se medições, de hora em hora da densidade óptica, 620 nm, e do número de unidades formadoras de colônias pela técnica de plaqueamento em microgota em ágar Baird-Parker (para *Staphylococcus aureus*) e ágar Eosina Azul de Metileno (para *Escherichia coli*). Com os resultados obtidos da leitura da absorbância e a contagem em placa de cada microrganismo, foram elaboradas curvas padrões.

3.3 Atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos óleos foi testada pelo método de difusão cavidade placa ágar, proposto por Deans & Ritchie (1987) e modificado por Mendonça (2004). Adicionou-se uma suspensão padronizada dos microrganismos a 20 mL de ágar Mueller-Hinton, à temperatura de 45°C, obtendo-se a concentração final de 10⁵ UFC/mL, homogeneizando-se a mistura que foi colocada imediatamente sobre uma placa contendo camada do mesmo ágar já solidificado. Após a solidificação, foram feitos slots na superfície do ágar de 3 mm de diâmetro. Aliquotas de 8 µL de cada diluição do óleo essencial

foram depositadas nos slots. As diluições foram preparadas homogeneizando-se 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µL a 100 µL de etanol. As placas foram incubadas em BOD, a 37°C, por 24 horas. Foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados. O etanol foi utilizado como controle. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4 Avaliação da atividade dos óleos essenciais na ricota

A ricota foi obtida do laticínio da Cooperativa Alto Rio Grande, em Lavras, MG. A massa da ricota (4 kg) foi colocada em recipiente estéril e transportada em condições higiênicas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos.

3.4.1 Preparo das amostras

A ricota foi dividida em 3 partes. A primeira foi inoculada com *S. aureus* FRI 722 (10^5 UFC/g) e a segunda com *E. coli* ATCC 8739 (10^5 UFC/g), sendo cada parte dividida novamente em 3 porções de 90 g cada uma. Uma porção serviu de controle (sem antimicrobiano), outra foi adicionada de óleo essencial de orégano (concentração final 1% v/p) e a última, de óleo essencial de pimenta-do-reino preta (concentração final 5% v/p). Em seguida, cada porção foi novamente dividida em amostras de 10 gramas, que foram analisadas após 0, 6, 12, 24, 48 horas e 5, 10, 15 e 21 dias, armazenadas a 7°C. A terceira parte foi destinada ao estudo de interação, sendo dividida em 2 grupos, um adicionado de óleo essencial de orégano e o outro de óleo de pimenta-do-reino preta. Cada grupo foi dividido, novamente, em 3 porções de 90 g cada uma: a primeira foi inoculada com cultura mista *S. aureus* FRI 722 (10^5 UFC/g) e *E. coli* 8739 (10^3 UFC/g); a segunda foi inoculada com cultura única de *S. aureus* (10^5 UFC/g) (controle) e a terceira foi inoculada com cultura única de *E. coli* (10^3 UFC/g)

(controle). Optou-se por utilizar esta concentração celular para que *E. coli* não ultrapassasse a população de *S. aureus*, sabendo que a primeira é mais comensal e tem um tempo de geração menor do que a última (Noletto et al., 1987). Cada porção foi dividida em porções de 90 g cada uma, que foram subdivididas para serem analisadas como explicado anteriormente. Ricota sem inóculo e sem antimicrobiano foi utilizada como controle. As características físico-químicas e microbiológicas da ricota foram determinadas antes de começar o experimento, incluindo pH, gordura, proteína e umidade.

3.4.2 Análise microbiológica

Foram homogeneizadas 10 g de cada amostra em 90 mL de citrato de sódio 2% e foram realizadas diluições seriadas em água peptonada 0.1% (p/v). Para a quantificação dos microrganismos nos diferentes tratamentos foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície. Semeou-se 0,1 mL de cada diluição preparada da cultura de *Escherichia coli* em placas contendo ágar EMB, sendo incubadas a 37°C por 24 horas. O microrganismo *Staphylococcus aureus* foi quantificado semeando-se 0,1 mL de cada diluição em placas contendo ágar Baird-Parker; estas foram incubadas a 37°C, por 48 horas. As colônias típicas e atípicas de *S. aureus* foram submetidas à coloração de Gram, teste de catalase, coagulase e termonuclease. As colônias típicas e atípicas *E. coli* foram submetidas a teste de oxidase, coloração de Gram e aos testes bioquímicos IMVIC (ICSME, 2000).

No controle foi realizada a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, *Staphylococcus aureus* e coliformes totais e termotolerantes. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5 Análise estatística

O experimento foi realizado segundo um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os tratamentos foram arranjados segundo um esquema fatorial 2 x 9 (item 3.3) e 3 x 9 (item 3.4.1). O modelo estatístico utilizado que acompanhou os experimentos foi: $y_{ijk} = \mu + \tau_i + H_j + \tau H_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, $k = 1, 2, 3$, em que:

μ é uma constante associada a cada observação,

τ_i é o efeito do i -ésimo tratamento, com $i = 1, 2$ (item 3.3) e $i = 1, 2, 3$ (item 3.4.1),

H_j é o efeito do j -ésima concentração (item 3.3), e do j -ésimo tempo (item 3.4.1) com $j = 1, \dots, 9$,

τH_{ij} é o efeito da interação do i -ésimo tratamento com o j -ésima concentração ou tempo,

ε_{ijk} é o erro experimental como média 0 e variância σ^2 .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais

Os óleos essenciais do orégano e pimenta do reino preta apresentaram níveis significativos de inibição sobre os microrganismos testados (Tabela 1). O óleo de orégano foi mais eficaz em inibir o crescimento de *S.aureus* em concentrações mais baixas (0,5%), entretanto o óleo de pimenta do reino só afetou o crescimento dessa bactéria a partir da concentração de 1%. *Escherichia coli* se mostrou mais resistente à atividade antimicrobiana dos dois óleos, apresentando sensibilidade a partir da concentração de 1%, quando em presença de óleo de orégano e 5% em presença do óleo de pimenta. Resultados encontrados por Dorman & Deans (2000) também mostram a maior sensibilidade de *S.aureus* ao óleo essencial de orégano do que ao de pimenta-do-reino.

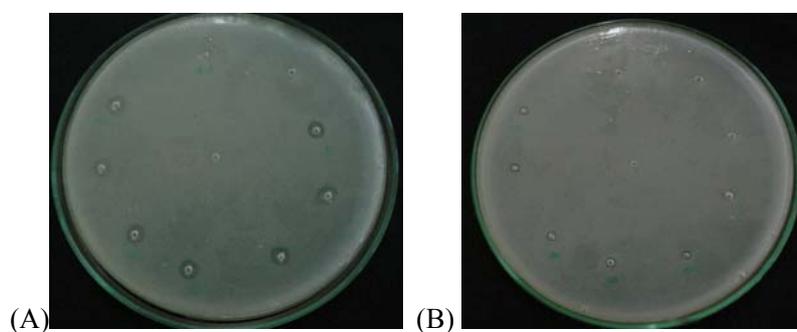


FIGURA 5 Halos de inibição obtidos pelo método de difusão cavidade placa ágar, pelo óleo essencial de orégano, em *S. aureus* (A) e *E. coli* (B).

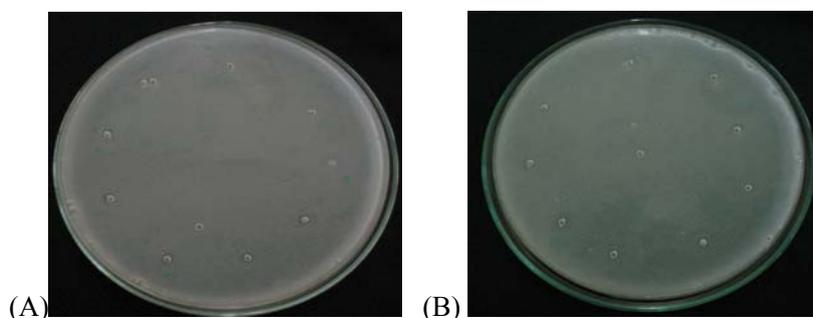


FIGURA 6 Halos de inibição obtidos pelo método de difusão cavidade placa agar, pelo óleo essencial de pimenta-do-reino em *S. aureus* (A) e *E. coli* (B).

TABELA 1 Atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) e óleo essencial de pimenta-do-reino preta (*Piper nigrum* L).

Óleo	Microrganismo	Concentrações do óleo essencial (% v/v)								
		0,1	0,5	1	5	10	20	30	40	50
Orégano	<i>E. coli</i>	–	–	3,5	3,7	3,9	4,17	4,03	4,3	4,0
	<i>S. aureus</i>	–	3,3	6,2	6,27	6,87	7,03	7,1	7,4	7,33
Pimenta do reino preta	<i>E. coli</i>	–	–	–	3,5	3,57	3,17	3,27	3,5	3,5
	<i>S. aureus</i>	–	–	3,3	4,07	4,4	4,43	4,57	4,5	4,6

Zona de inibição em mm incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3mm

Nos resultados obtidos por Sağdıç (2003), espécies de *E. coli* também foram mais resistentes ao hidrolato de orégano do que *S. aureus*. Embora estudos mostrem que os óleos essenciais sejam efetivos em inibir tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Dorman & Dean, 2000), Smith-Palmer,

Stewart & Fyfe (1998) afirmam que as primeiras são mais susceptíveis aos óleos essenciais do que as segundas. Essa afirmação é corroborada pelos resultados de vários trabalhos na literatura utilizando os mais diversos óleos essenciais e microrganismos (Mendoza-Yepes et al., 1997; Fisher & Phillips, 2006). Estudos demonstram que a presença da membrana externa nas bactérias Gram-negativas as tornam menos susceptíveis a algumas substâncias, como a antibióticos. Esse fato decorre do caráter hidrofílico da membrana celular externa dessas bactérias, que atua como barreira à permeabilidade de várias substâncias, ou devido ao tamanho de suas porinas, a qual varia entre os microrganismos (Nikaido & Vaara, 1985).

Na literatura, a concentração mínima inibitória (MIC) de óleo essencial de orégano é de 0,05% a 0,12%, para *E. coli* e *S. aureus* (Burt et al., 2004), dados cerca de dez vezes menores do que os encontrados neste trabalho para os dois microrganismos. Contudo, vários fatores influenciam os resultados obtidos de MIC para óleos essenciais. Dentre eles, podem-se citar a época de colheita da planta, a localização geográfica e o método de extração do óleo essencial. Outro fator que pode influenciar drasticamente nos resultados obtidos é a metodologia empregada para avaliação do MIC. Normalmente, os trabalhos diferem nessa metodologia, sendo, assim, difícil a comparação entre os resultados (Dormam & Deans, 2000; Daferera et al., 2003; Burt et al., 2004).

Já a diferença entre as concentrações de inibição entre os óleos ocorre devido à diferença da composição química de cada óleo. Os constituintes majoritários do óleo essencial de orégano, responsáveis pelo seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, são o timol e o carvacrol, que são encontrados na proporção de 86% (Bagamboula, Uyttendaele & Debevere., 2004; Baydar.; 2004). Esses componentes, atuando sinergicamente, são responsáveis pelo aumento da permeabilidade celular e conseqüente dissipação do gradiente de pH e da força motriz de prótons em *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Lambert

et al., 2001). A avaliação sob microscopia eletrônica de *S. aureus* após exposição a terpineno-4-ol mostrou estruturas multilamelares como mesossomos e a aparência amorfa de algumas células tratadas (Carson, Mee & Riley, 2002). Embora seja amplamente aceito que a atuação dos óleos essenciais sobre os microrganismos seja na membrana celular (Burt et al., 2004), nenhum trabalho envolvendo *E. coli* e o alvo de atuação dos óleos essenciais de orégano nessa bactéria foi encontrado na literatura.

Diferentemente da relativa abundância de trabalhos descrevendo a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano, são escassos trabalhos descrevendo a atividade antimicrobiana do óleo essencial da pimenta-do-reino. Dorman & Deans (2000) encontraram halos de inibição menores para *E. coli* do que para *S. aureus*, quando esses foram submetidos ao óleo essencial de *Piper nigrum*, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho. Contudo, os autores não relatam a concentração de óleo usada. Segundo Jirovetz et al. (2002), limoneno, sabineno, β -cariofileno, β -pineno, α -pineno e linalool são os principais compostos majoritários da pimenta-do-reino. Dentro destes compostos, limoneno (10,26 %), β -pineno (10,02 %), α -pineno (6,40%) e linalool (2,51%) possuem atividade antimicrobianas sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Dorman & Deans, 2000).

Com base nos resultados obtidos neste experimento, as concentrações de 1% e 5% de óleo essencial de orégano e de pimenta-do-reino, respectivamente, foram selecionadas para serem empregadas no estudo da atividade inibitória de *S. aureus* e *E. coli* inoculados em ricota. Apesar de todos os halos serem significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), optou-se pelas menores concentrações de óleo, buscando efetividade do antimicrobiano e pouca influência nas características sensoriais do produto, fato sugerido por Lambert et al. (2001).

4.2 Atividade dos óleos essenciais em ricota

O efeito inibitório dos óleos essenciais de orégano e pimenta-do-reino sobre *S. aureus* inoculado em ricota é mostrado na figura 7. Houve

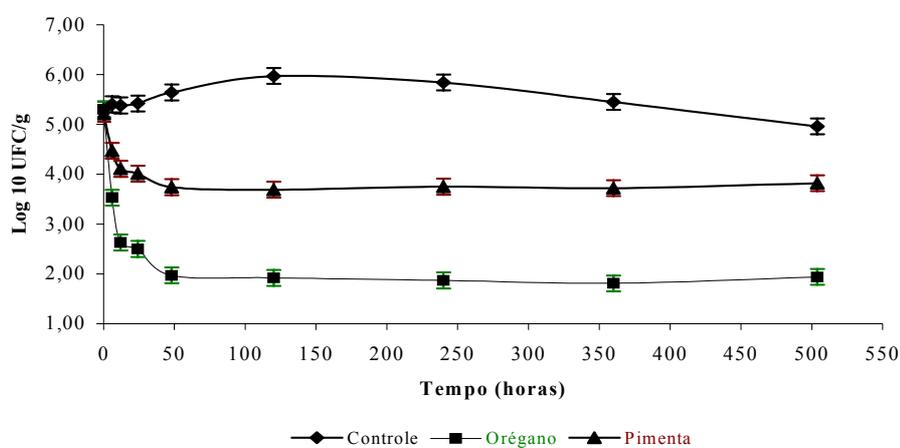


FIGURA 7 Efeito dos óleos essenciais de orégano (1%) e pimenta-do-reino preta (5%) sobre a concentração de *S. aureus* em ricota armazenada a 7°C.

redução significativa da população bacteriana ($P \leq 0,05$) nas ricotas às quais óleos foram adicionados, em relação ao controle. Comparando-se a atuação inibitória dos dois óleos, observa-se que o óleo essencial de orégano a 1% foi mais eficiente em reduzir o número de células de *S. aureus* na ricota do que o óleo de pimenta a 5%, fato esperado devido aos testes realizados anteriormente. O óleo essencial de orégano reduziu significativamente a população de *S. aureus* em $3,3 \log_{10}$ UFC/g após 48 horas de armazenamento da ricota a 7°C. Por outro lado, a redução da concentração de UFC de *S. aureus* pelo óleo de pimenta foi de $1,5 \log_{10}$ UFC/g, fato ocorrido apenas após 120 horas de armazenamento. Após esses períodos as concentrações de *S. aureus* permaneceram constantes até 540 horas de armazenamento, período de condução do experimento. Diferentemente das reduções do número da bactéria encontrados com a adição dos óleos essenciais, na ricota sem adição de óleo houve aumento não significativo do número de *S. aureus* de $5,3 \log_{10}$ UFC/g para $5,64 \log_{10}$ UFC/g em 48 horas, valores que permaneceram constantes durante o experimento, fato decorrente da temperatura de armazenamento da ricota.

Na Figura 8, pode-se observar o comportamento de *E. coli* em relação aos óleos essenciais de orégano de pimenta-do-reino adicionados separadamente em ricota nas concentrações de 1% e 5%, respectivamente. Como observado no teste *in vitro*, *E. coli* apresentou maior resistência à atividade dos óleos essenciais. O óleo essencial de orégano diminuiu a contagem inicial da bactéria em 1,7 ciclos \log_{10} UFC/g, após as primeiras 24 horas de armazenamento. Em contraste, o óleo de pimenta-do-reino reduziu em somente 1 ciclo \log_{10} UFC/g a população da bactéria após as primeiras 12 horas de armazenamento. Após esse período, as concentrações de *E. coli* se mantiveram constantes até o final do experimento. O controle não apresentou variação significativa, durante as 540 horas do experimento.

O presente estudo demonstrou a atividade inibitória do óleo essencial de orégano e de pimenta-do-reino em ricota. No entanto, nenhum microrganismo foi eliminado ou inibido em grande proporção; os óleos em questão foram capazes de evitar a proliferação no produto. Muitos estudos *in vitro* sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais são realizados, contudo, poucos envolvem a adição dessas substâncias em matrizes alimentares. De modo geral, fatores intrínsecos e extrínsecos interferem no efeito antimicrobiano dos óleos essenciais e a na conduta do microrganismo no alimento (Koutsoumanis, Lambropoulou & Nychas, 1999; Burt, 2004; Gonzáles-Montalvo et al., 2007).

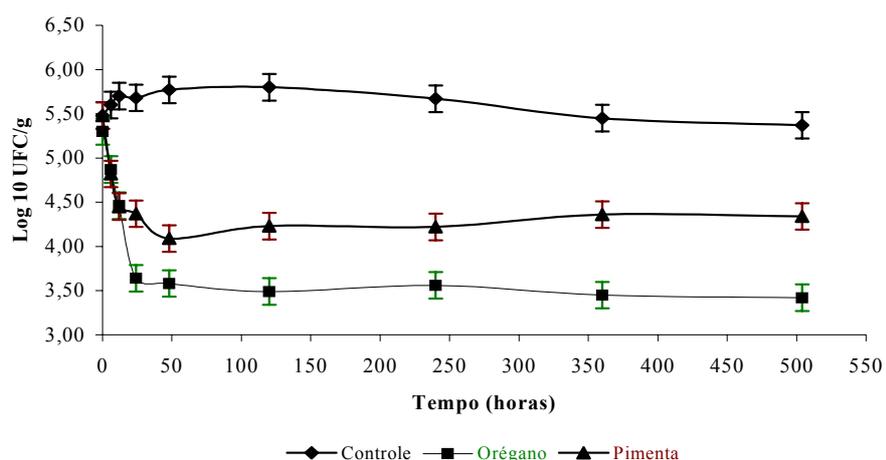


FIGURA 8 Efeito dos óleos essenciais de orégano (1%) e pimenta-do-reino preta (5%) sobre a concentração de *E. coli* em ricota armazenada a 7°C.

Os alimentos são substâncias complexas constituídas de proteínas, lipídios, carboidratos e sais minerais, dentre outros. Esses constituintes alteram o pH e potencial de oxirredução, fatores que influenciam os constituintes dos óleos essenciais (Burt, 2004). Além disso Smith-Palmer, Stewart & Fyfe (2001)

demonstram que as proteínas reagem formando complexos com os compostos fenólicos dos óleos essenciais, evitando a união dos últimos com a membrana celular dos microrganismos. A ricota utilizada neste estudo teve um considerável conteúdo protéico ao redor de 8% e de gordura de 10%, o que poderia explicar a diminuição da atividade dos óleos essenciais estudados.

Autores sugerem que parte dos óleos essenciais migra para a fração lipídica, diminuindo sua concentração na fase aquosa e seu contato com o microrganismo (Juven et al., 1994). Gill et al. (2002) também sugerem que o óleo permaneça localizado nas partes hidrofóbicas do alimento, evitando assim o contato com as células encontradas nas partes hidrofílicas. Há também a atuação do efeito sinérgico entre os fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento (Mendoza-Yepes et al., 1997; Koutsoumanis, Lambropoulou & Nychas, 1999; Skandamis & Nychas, 2000; Fisher & Phillips, 2006).

Devido às interferências, sobre o efeito inibitório dos óleos essenciais nos microrganismos, pelos constituintes dos alimentos, normalmente, concentrações maiores de óleo essencial são necessárias para se obter bons resultados. A inibição de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco espanhol ocorreu apenas após adição, na massa do queijo, de concentrações maiores de um agente conservante à base de óleos essenciais (DMC), sendo o mesmo produto incapaz de inibir *E. coli* O 157:H7. Porém, em testes *in vitro*, essa bactéria se mostrou susceptível ao óleo (Mendoza-Yepes et al., 1997). O efeito dos óleos essenciais de limão, laranja e bergamota e alguns de seus componentes também foi menos efetivo em reduzir a concentração de *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O 157:H7, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *S. aureus*, quando inoculados em folhas de repolho ou em pele de frango (Fisher & Phillips, 2006). Singh et al. (2003) demonstraram, ao avaliarem o efeito dos óleos de tomilho e cravo-da-índia sobre *Listeria monocytogenes*, que houve diferença significativa

na eficácia dos óleos, entre as amostras de cachorro quente com baixo e alto teor de gordura.

Estudos avaliando o efeito sinérgico dos fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos com os óleos essenciais, também têm sido realizados. Koutsoumanis, Lambropoulou & Nychas (1999) em estudo com um aperitivo grego à base de ovas de bacalhau adicionado de 2% de óleo essencial de orégano, ressaltaram a influência do pH do produto para redução a população de *Salmonella enteritidis*, em 5 ciclos logarítmicos, após 6 dias de estocagem, não tendo sido observado o aumento da população da bactéria após esse período. Outro aperitivo tradicional grego, salada de berinjela, também foi estudada quanto às influências dos fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento. *E. coli* O 157:H7 foi inoculada na salada, que foi tratada com diferentes concentrações de óleo essencial de orégano, pH ajustado com suco de limão e estocada, sob diferentes temperaturas, tendo a concentração da bactéria no produto sido alterada de acordo com as combinações realizadas (Skandamis & Nychas, 2000).

4.3 Avaliação do crescimento da cultura mista *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* inoculada em ricota

Em alimentos processados, é comum a presença de *S. aureus*, relacionada com surtos por intoxicação estafilocócica; porém, em alimentos crus e fermentados, este microrganismo não é capaz de desenvolver-se e produzir toxina devido à alta quantidade e diversidade da microbiota competitiva. O presente experimento foi realizado para estudar a possível interação entre *S. aureus* e *E. coli*, quando inoculados na ricota e adicionados de óleo essencial. Nas condições testadas no estudo, percebeu-se que não houve diferença entre os tratamentos e os controles, podendo concluir que não apresentou-se efeito no crescimento para nenhuma das bactérias testadas (Figura 9 e 10).

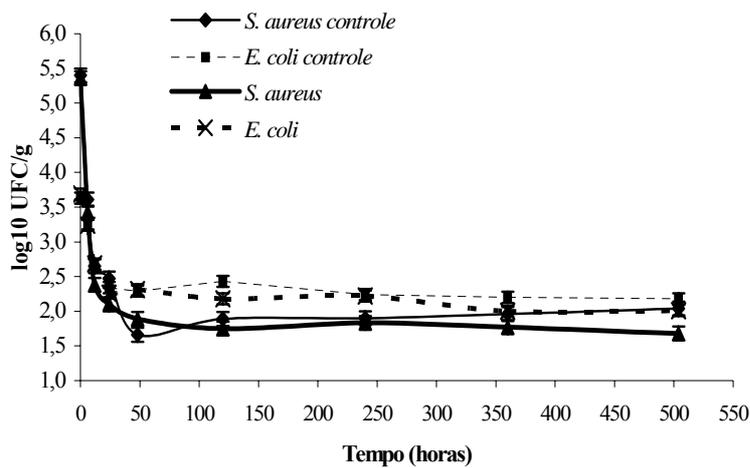


FIGURA 9 Efeito da interação no crescimento de *S. aureus* e *E. coli* adicionados de óleo essencial de orégano.

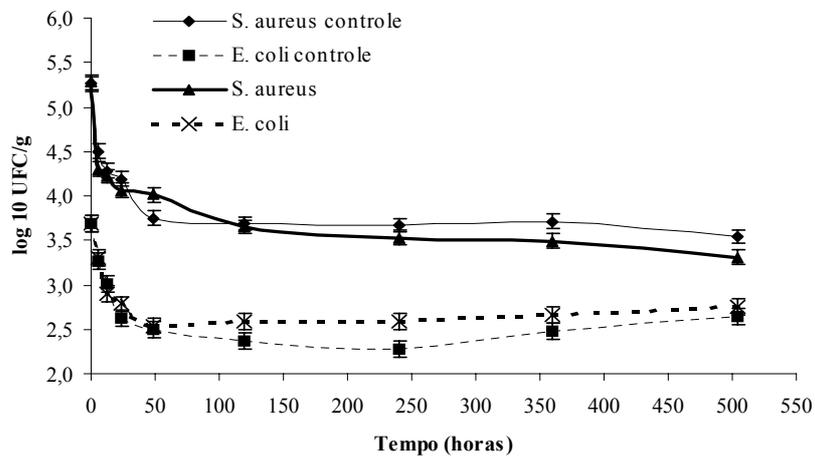


FIGURA 10 Efeito da interação no crescimento de *S. aureus* e *E. coli* adicionados de óleo essencial de pimenta do reino preta.

Estes resultados coincidiram com os apresentados por Noleto et al. (1987), que avaliaram o crescimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxina em diferentes concentrações celulares de culturas mistas, *in vitro* e em um produto à base de carne. Os autores observaram que, *in vitro*, o microorganismo em estudo foi capaz de crescer e produzir enterotoxina quando a população de *E. coli* foi menor em 3 e 4 ciclos logarítmicos, ou igual à população de *S. aureus*. Na matriz alimentar, o microorganismo *S. aureus* só cresceu e produziu toxina quando a população de *E. coli* foi menor em 4 ciclos logarítmicos. *E. coli* é considerado um microorganismo mais comensal, com poucas exigências nutricionais e com tempo de geração menor do que *S. aureus*, o que lhe permitiu superar a população deste último. Estes autores observaram, então, que o crescimento de *S. aureus* é influenciado grandemente pela sua concentração inicial e pela concentração inicial da biota competitiva. No presente trabalho foram inoculados 10^5 UFC/g de *S. aureus* e 10^3 UFC/g de *E. coli* na ricota, o que poderia explicar o comportamento semelhante.

Trabalhos mais recentes sobre o efeito no crescimento de *S. aureus* e *E. coli* têm-se dedicado ao estudo em bactérias ácido lácticas. Competição por nutrientes e ou produção de metabólitos ativos são a causa do importante efeito inibitório dessas bactérias (Devlieghere et al., 2004).

5 CONCLUSÕES

- Os óleos essenciais testados comprovaram ter ação antimicrobiana. O óleo essencial de orégano foi mais ativo sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
- A inibição no desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, quando inoculadas em cultura mista pela adição de óleo essencial de orégano, foi de 68,7% e 45,5%, respectivamente e, pela adição de pimenta-do-reino preta, de 37,3% e 25,5%, respectivamente.
- Não foi verificada ação sinérgica entre as bactérias, quando inoculadas em cultura mista e o óleo essencial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANANG, D. M.; RUSUL, G.; BAKAR, J.; LING, F. H. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4 °C. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 8, p. 961 - 969, Aug. 2007.
- ANUNCIAÇÃO, L. L. C.; LINARDI, W. R.; DO CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. Production of staphylococcal enterotoxin A in cream-filled cake. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 259 - 263, July 1995.
- ARIDOGAN, B. C.; BAYDAR, H.; KAYA, S.; DEMIRCI, M.; OZBASAR, D.; MUMUCU, E. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Some Essential Oils. **Archives Pharmacal Research**, Seoul, v. 25, n. 6, p. 860 - 864, Dec. 2002.
- ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKASAWA, H.; KOSAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and the powered skim milk. **Epidemiology Infection**, New York, v. 130, n. 1, p. 33 - 40, Feb. 2003.
- BAGAMBOULA, C. F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 1, p. 33-42, Feb. 2004.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 1 - 10, Oct. 2000.
- BAYDAR, H.; SAGDIC, O.; OZKAN, G.; KARADOGAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* e *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 3, p. 169 - 172, Apr. 2004.
- BEHME, R. J.; SHUTTLEWORTH, R.; McNABB, A.; COLBY, W. D. Identification of Staphylococci with a Self-Educating System Using Fatty Acid

Analysis and Biochemical Tests. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 12, p. 3075 - 3084, Dec. 1996.

BERGDOLL, M. S. Staphylococcal intoxications. In: DOYLE, M. P. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: INC, 1989. p. 463 - 523.

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

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

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 4, p. 223 - 253, Aug. 2004.

CANILLAC, N.; MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 3, p. 261 - 268, Jun. 2001.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, London, v. 93, n. 2, p. 223 - 226, Nov. 2005.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, June 2002.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider—Connecticut and New York, October 1996. **Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 46, n. 1, p. 4 - 8, Jan. 1997.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection Associated With Eating Fresh Cheese Curds—Wisconsin, June 1998. **Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. 40, p. 911 - 913, Oct. 2000.

CERQUEIRA, A. M. F.; GUTHA, B. E. C.; JOAQUIM, R. M.; ANDRADE, J. R. C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 70, n. 1 - 2, p. 111 - 121, Oct. 1999.

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

DAFERERA, J. D.; ZIOGAS, B. N.; M. G. POLISSIOU. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, n. 1, p. 39-44, Feb. 2003.

DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 165-180, Nov. 1987.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFERGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 1-2, p. 1 - 17, Jul. 2001.

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

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 1, p. 16 - 34, Jan. 2000.

DO CARMO, L. S.; DIAS R. S.; LINARD, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 1, p. 9 - 14, Feb. 2002.

DOBRINDT, U. (Patho-) Genomics of *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 295, n. 6-7, p. 357 - 371, Oct. 2005.

DONTOROU, C.; PAPADOPOULOU, C.; FILIOUSSIS, G.; ECONOMOU, V.; APOSTOLOU, I.; ZAKKAS, G.; SALAMOURA, A.; KANSOUZIDOU, A.; LEVIDIOTOU, S. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n.3, p. 273 - 279, May. 2003.

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

EDWARDS-JONES, V.; BUCK, R.; SHAWCROSS, S. G.; DAWSON, M. M.; DUNN, K. The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. **Burns**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 772 - 777, Dec. 2004.

EVENSON, M. L.; HINDS, M. W.; BERNSTEIN, R. S.; BERGDOLL, M. S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 311-316, Dec. 1988.

FARKYE, N. Y. Acid and Acid/ Rennet curd-cheeses Part C. Acid -heat Coagulated Cheeses. In: FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 3. ed. London: Elsevier Academic Press, 2004. v. 2, p. 343 - 348.

FERREIRA, A.; PROENÇA, C.; SERRALHEIRO, M.L.M.; ARAÚJO, M.E.M. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 108, n.1 -3, p. 31 - 37, Nov 2006.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and food systems. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, n. 6, p. 1232-1240, Dec. 2006.

FUEYO, J. M.; MARTIN, M. C.; GONZALES-HEVIA, M. A.; MENDOZA, M. C. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam. v. 67, n. 1-2. p. 139 - 145, Jul. 2001.

FUEYO, J. M., MENDOZA, M. C., MARTIN, M. C. Enterotoxins and toxic shock syndrome in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetics findings. **Microbes and Infection**. Paris, v. 7, n. 2, p. 187 - 194, Feb. 2005.

FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 3, p. 260-267, May 2006.

FURTADO, M. M. **Tecnologia em queijos: Manual Técnico para produção industrial de queijos**. Campinas, 1994, 118p.

GILL, A. O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. A. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham . **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 83 - 92, Feb. 2002.

GONZALEZ - FANDOS, M. E.; SIERRA, M.; GARCIA - LOPEZ. M. L.; GARCIA - FERNANDEZ, M. C. The influence of manufacturing and drying conditions on the survival and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus* in two Spanish dry sausages (chorizo and salchichón). **Meat Science**, Barking, v. 52, n. 4, p. 411 - 419, Aug. 1999.

GONZÁLEZ-MONTALVO, B.; CAPITA, R.; GUEVARA-FRANCO, J. A.; PRIETO, M.; ALONSO-CALLEJA, C. Influence of oxygen exclusion and temperature on pathogenic bacteria levels and sensory characteristics of packed ostrich steaks throughout refrigerated storage. **Meat Science**, Barking, v. 76, n. 2, p. 201 - 209, June 2007.

GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPATHEODOROU, K. The fate of *Escherichia coli* O157:H7 in Myzithra, Anthotyros, and Manouri whey cheeses during storage at 2 and 12°C. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 5, p. 565 - 570, Oct. 2001.

GUTIERREZ, C.; ABEE, T.; BOOTH, I. R. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 233 - 244, Dec. 1995.

HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; DE BONT, J. A. M. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 12, n.10, p. 409 - 415, Oct. 1994.

HEUVELINK, A. E.; VAN DEN BIGGELARR, F. L.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.; HERBES, R. G.; HUYBEN, R.; NAGELKERKE, N.; MELCHERS, W. J.; MONNES, L. A.; DE BOER, E. Occurrence of verocytotoxinproducing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 12, p. 3480 - 3487, Dec. 1998.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, p. 787.

ICSMF. **Microorganismos de los Alimentos I**. Su significado e metodos de enumeracion. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. v. 1, p. 439.

INTERNATIONAL PEPPER COMMUNITY, IPC (2003). Pepper market review. <http://www.peppertrade.com.br/IPC-REPORT2003.htm>.

ISLAM, M.; DOYLE, M. P.; PHATAK, S. C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 1, p. 63 - 70, Jan. 2005.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; NGASSOUM, M. B.; GEISSLER, M. Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction-gas chromatography, solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and olfactometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 976, n. 1-2, p. 265-275, Nov. 2002.

JØRGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LØVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 267 - 272, Nov. 2005.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factores that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of applied Bacteriology**, Washington v.76, n.6, p.626-631, Jun. 1994.

KAIPAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N. Y.; SHWIMMER, A.; PYORALA, S.; PELKONEN, S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 37 - 46, Feb. 2002.

KARATZAS, A. K.; KETS, E.P.W.; SMID, E. J.; BENNIK, M. H. J. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 463 - 469, March 2001.

KLOSS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV. Staphylococcus Rosenback 1884, 18 AL, 8 Nom. Cons. Opin. 17 Jud. Comm. 1958, 153). In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Williams, 1986. v. 2.

KOUTSOUMANIS, K.; LAMBROPOULOU, K.; NYCHAS, G.-J. E. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 49, n. 1-2, p. 63-74 Aug. 1999.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 107 - 117, Jan. 2000.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. -J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453 - 462, Sept. 2001.

LEISTNER, L. Shelf stable products and intermediate moisture foods based on meat. In: ROCKLAND, L.; BEUCHAT, L. B. **Water activity theory and application to food**. New York: Marcel Dekker, 1987, p. 295 - 328.

LEMAY, M. -J.; CHOQUETTE, J.; DELAQUIS, P. J.; GARIÉPY, C.; RODRIGUE, N.; SAUCIER, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 217 - 226, Oct. 2002.

LIRA, W. M.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 4, p. 861-866, Oct. 2004.

LUES, J. F. R.; VAN TONDER, I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 4, p. 326 - 332, May 2007.

LUUKKONEN, J.; KEMPPINEN, A.; KÄRKI, M.; LAITINEN, H.; MÄKI, M.; SIVELÄ, S.; TAIMISTO, A.; RYHÄNEN, E. The effect of a protective culture and exclusion of nitrate on the survival of enterohemorrhagic *E. coli* and *Listeria* in Edam cheese made from Finnish organic milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 5, p. 449 - 457, May 2005.

MADANI, N. B.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 2 - 3, p. 139 - 145, Jan. 1998.

MATAN, N.; RIMKEEREE, H.; MAWSON, A. J.; CHOMPREEDEA, P.; HARUTHAITHANASAN, V.; PARKER, M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 180 - 185, March 2006.

McEVOY, J. M.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J. J.; THOMSON-CARTER, F. M.; GARVEY, P.; McGUIRE, L.; BLAIR, I. S.; McDOWELL, D. A. The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n.2, p. 256 - 266, Aug. 2003.

MEJLHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fresh products. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 27 - 31, Jan. 2002.

MENDONÇA, A, T. Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa. 2004. 72p. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MENDOZA-YEPES, M. J.; SANCHEZ-HIDALGO, L. E.; MAERTENS, G., MARIN-INIESTA, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 17, n. 1, p. 47-55, June 1997.

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

MOREIRA, M.R.; PONCE, A. G., DEL VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 38, n. 5, p. 565-570, Aug. 2005.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142 - 201, Jan. 1998.

NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 49, n. 1, p. 1-32, Mar. 1985.

NOLETO, A. L. S.; MALBURG, L. M.; BERGDOLL, M. S. Production of Staphylococcal Enterotoxin in Mixed Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 10, p. 2271 - 2274, Oct. 1987.

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

OKPEKON, T.; YOLOU, S.; GLEYE, C.; ROBLLOT, F.; LOISEAU, P.; BORIES,; GRELLIER, P.; FRAPPIER, F.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 90, n. 1, p. 91 - 97, Jan. 2004.

OKSUZ, O.; ARICI, M.; KURULTAY, S.; GUMUS, T. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 6, p. 453 - 456, Sept. 2004.

OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil—an essential oil from *Ocimum basilicum* L.—against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 105 - 110, July 2003.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414 - 420, May 2007.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BIST, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WEGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 597-673, Oct. 1997.

PENNEY, V.; HENDERSON, G.; BLUM, C.; JOHNSON-GREEN, P. The potential of phytopreservatives and nisin to control microbial spoilage of minimally processed fruit yogurts. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 369-375, Sept. 2004.

PEREIRA, J. L.; DO CARMO, L. S.; SANTOS, E. J.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in a metropolitan area of South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 406-409, Dec. 1994.

PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. **Food Science and Technology International**, London, v. 7, n. 2, p. 105 - 116, Apr. 2001.

PRADHAN, K.; VARIYAR, P.; BANDEKAR, J. Antimicrobial Activity of Novel Phenolic Compounds from Green Pepper (*Piper nigrum* L). **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 32, n. 2, p. 121 - 123, March 1999.

RAMOS, J. L.; DUQUE, E.; RODRIGUEZ-HERVA, J.; GODOY, P.; HAIDOUR, A.; REYES, F.; FERNANDEZ-BARRERO, A. Mechanisms for Solvent Tolerance in Bacteria. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, n. 7, p. 3887 - 3890, Feb. 1997.

RYU, J. -H.; DENG, Y.; BEUCHAT, L. R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dried beef powder as affected by water activity, sodium chloride content and temperature. **Food Microbiology**, London, v. 16, n. 3, p. 309 - 316, June 1999.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 458 - 461, Oct. 1988.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and

antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 4, p. 621 - 632, Aug. 2005.

SAĞDIÇ, O.; ÖZCAN, M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. **Food Control**, Guildford, v. 14, n. 3, p. 141-143, Apr. 2003.

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**, Guildford, v. 15, n. 7, p. 549-557, Oct. 2004.

SAINZ, T.; PÉREZ, J.; VILLASECA, J.; HERNÁNDEZ, U.; ESLAVA, C.; MENDOZA, G.; WACHER, C. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 357 - 367, Dec. 2005.

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 1-19, Aug. 1990.

SIMS, G. R.; GLENISTER, D. A.; BROCKLEHURST, T. F.; LUND, B. M. Survival and growth of food poisoning bacteria following inoculation into cottage cheese varieties. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. p. 173 - 195, Nov. 1989.

SINGH, A.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; SINGH, N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 36, n. 8, p. 787 - 794, Dec. 2003.

SINGH, N.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; STROSHINE, R. L. Efficacy of Chlorine Dioxide, Ozone, and Thyme Essential Oil or a Sequential Washing in Killing *Escherichia coli* O157:H7 on Lettuce and Baby Carrots. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 35, n. 8, p. 720 - 729, Dec. 2002.

SKALTSA, H. D.; DEMETZOS, C.; LAZARI, D.; SOKOVIC, M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. **Phytochemistry**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 743 - 752, Oct. 2003.

SKANDAMIS, P. A.; 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 concentration. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1646-1653, Aug. 2000.

SMITH -PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 4, p. 463 - 470, Aug. 2001.

SMITH -PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 26, n. 2, p. 118-122, Feb. 1998.

SOKMEN, S.; GULLUCE, M.; AKPULAT, H. A.; DAFERERA, D.; TEPE, B.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; SAHIN, F. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 8, p. 627 - 634, Dec. 2004.

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**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 409 - 413, May 2007.

STERMITZ, F. R.; BEESON, T. D.; MUELLER, P. J.; HSIANG, J. F.; LEWIS, K. *Staphylococcus aureus* MDR efflux pump inhibitors from a *Berberis* and a *Mahonia* (sensu strictu) species. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 793 - 798, Aug. 2001.

SU, Y. - C.; WONG, A. C. L. Identification and Purification of a New Staphylococcal Enterotoxin, H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4 p. 1438 - 1443, Apr. 1995.

SU, Y. - C.; WONG, A. C. L. Production of staphylococcal enterotoxin H under controlled pH and aeration. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 39, n. 1- 2, p. 87 - 91, Jan. 1998.

TATINI, S. R. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. **Journal of Milk Food Technology**, Ames, v. 36, n. 11, p. 559-663, Nov. 1973.

TAORMINA, P.J.; BEUCHAT, L.R.; SLUTSKER, L.M. Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 5, p. 626 - 634, Sept/ Oct. 1999.

VALERO, M.; FRANCÉS, E. Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 1, p. 68 - 73, Feb. 2006.

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

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Foodborne Pathogens**. London: Wolfe Publishing, 1991. 557.

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

VENKAT R., S.; PULLELA, S.; PRAVEEN, B.; KISHORE, K.; CHINA, B.; SURYANARAYANA, U.; MADHUSUDANA, J. Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, Jena, v. 11, n. 7 - 8, p. 697 - 700, Nov. 2004.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY-CRUCHAUDET, C.; BAVAI, C.; MONTET, M. P.; BONIN, V.; DERNBURG, A.; RICHARD, Y. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 83 - 88, Nov. 2005.

WAN, J.; WILCOCK, A. COVENTRY, M. J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 2, p. 152 - 158, Feb. 1998.

WHITE, D. G.; GOLDMAN, J. D.; DEMPSE, B.; LEVY, S. B. Role of the *acrAB* Locus in Organic Solvent Tolerance Mediated by Expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 19, p. 6122 - 6126, Oct. 1997.

WIJNKER, J. J.; KOOP, G.; LIPMAN, L. J. A. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 7, p. 657 - 662, Oct. 2006.

YUCEL, N.; ULUSOY, H. A Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 383-388, May 2006.

ZÁRATE, V. ; BELDA, F.;; PÉREZ, C.; CARDELL, E. Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 7, n. 10, p. 635-641, Oct. 1997.

ANEXOS

TABELA 1A	Análise de variância para o diâmetro do halo de inibição entre <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	51
TABELA 2A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição de <i>S. aureus</i> , em função do tratamento utilizado e da concentração.....	51
TABELA 3A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição de <i>E.coli</i> , em função do tratamento utilizado e da concentração.....	52
TABELA 4A	Análise de variância para a inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , no queijo ricota, no decorrer do experimento.....	52
TABELA 5A	Valores médios da inibição de <i>S.aureus</i> , em função do tratamento utilizado e do tempo de armazenamento.....	53
TABELA 6A	Valores médios da inibição de <i>E. coli</i> , em função do tratamento utilizado e do tempo de armazenamento...	53
TABELA 7A	Análise de variância para o crescimento da cultura mista <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> adicionado de óleo essencial de orégano.....	54
TABELA 8A	Valores médios do crescimento de <i>S. aureus</i> na cultura mista e na cultura única (controle) adicionado de óleo essencial de orégano, em função do tempo de armazenamento.....	54
TABELA 9A	Valores médios do crescimento de <i>E. coli</i> na cultura mista e na cultura única (controle) adicionado de óleo essencial de orégano, em função do tempo de armazenamento.....	55
TABELA 10A	Análise de variância para o crescimento da cultura mista <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> adicionado de óleo essencial de pimenta-do-reino.....	55

TABELA 11A	Valores médios do crescimento de <i>S. aureus</i> na cultura mista e na cultura única (controle) adicionado de óleo essencial de pimenta-do-reino, em função do tempo de armazenamento.....	56
TABELA 12A	Valores médios do crescimento de <i>E. coli</i> na cultura mista e na cultura única (controle), adicionado de óleo essencial de pimenta-do-reino, em função do tempo de armazenamento.....	56

TABELA 1A Análise de variância para o diâmetro do halo de inibição entre *S. aureus* e *E. coli*.

Fonte de variação	Gl	Quadrado Médio (p-valor)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Tratamento (T)	1	87,7502 (<0,0001)	9,4518 (<0,0001)
Concentração (C)	7	12,6211 (<0,0001)	11,7423 (<0,0001)
T x C	7	0,1678 (<0,0001)	1,8380 (<0,0001)
Erro	32	0,0014	0,0010
CV (%)		0,75	1,07

(P<0,05).

TABELA 2A Valores médios do diâmetro do halo de inibição de *S. aureus*, em função do tratamento utilizado e da concentração.

Concentração ¹ (%)	Tratamentos ²		Médias (Erro-padrão)
	Orégano	Pimenta	
0,5	3,30 a H (0,02)	0,00 b F (0,02)	1,65 G (0,02)
1	6,20 a G (0,02)	3,30 b E (0,02)	4,75 F (0,02)
5	6,27 a F (0,02)	4,07 b D (0,02)	5,17 E (0,02)
10	6,87 a E (0,02)	4,40 b C (0,02)	5,63 D (0,02)
20	7,03 a D (0,02)	4,43 b C (0,02)	5,73 C (0,02)
30	7,10 a C (0,02)	4,57 b A (0,02)	5,83 B (0,02)
40	7,40 a A (0,02)	4,50 b B (0,02)	5,95 A (0,02)
50	7,33 a B (0,02)	4,60 b A (0,02)	5,97 A (0,02)
Médias (Erro padrão)	6,44 a (0,01)	3,73 b (0,01)	

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

²Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de t de Student, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 3A Valores médios do diâmetro do halo de inibição de *E.coli* em função do tratamento utilizado e da concentração.

Concentração ¹ (%)	Tratamentos ²		Médias (Erro-padrão)
	Orégano	Pimenta	
0,5	0,00 a G (0,02)	0,00 a E (0,02)	0,00 F (0,01)
1	3,50 a F (0,02)	0,00 b E (0,02)	1,75 E (0,01)
5	3,70 a E (0,02)	3,50 b B (0,02)	3,60 D (0,01)
10	3,90 a D (0,02)	3,57 b A (0,02)	3,73 B (0,01)
20	4,17 a B (0,02)	3,17 b D (0,02)	3,67 C (0,01)
30	4,03 a C (0,02)	3,27 b C (0,02)	3,65 C (0,01)
40	4,30 a A (0,02)	3,50 b B (0,02)	3,90 A (0,01)
50	4,00 a C (0,02)	3,50 b B (0,02)	3,75 B (0,01)
Médias (Erro padrão)	3,45 a (0,01)	2,56 b (0,01)	

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com um nível nominal de significância de 5%.

²Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de t de Student, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 4A Análise de variância para a inibição do crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, no queijo ricota, no decorrer do experimento.

Fonte de variação	Gl	Quadrado Médio (p-valor)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
Tratamento (T)	2	55,8157 (<0,0001)	18,9643 (<0,0001)
Tempo (Tp)	8	2,4738 (<0,0001)	1,1711 (<0,0001)
T x Tp	16	1,2654(<0,0001)	0,4804 (<0,0001)
Erro	54	0,0771	0,0639
CV (%)		6,85	5,39

(P<0,05).

TABELA 5A Valores médios da inibição de *S.aureus*, em função do tratamento utilizado e do tempo de armazenamento.

Tempo ¹	Tratamentos ²			Médias (Erro-padrão)
	Controle	Orégano	Pimenta	
0	5,30 a B (0,16)	5,30 a A (0,16)	5,21 a A (0,16)	5,27 A (0,09)
6	5,40 a B (0,16)	3,53 c B (0,16)	4,47 b B (0,16)	4,47 B (0,09)
12	5,38 a B (0,16)	2,63 c C (0,16)	4,10 b C (0,16)	4,04 C (0,09)
24	5,42 a B (0,16)	2,50 c C (0,16)	4,01 b C (0,16)	3,98 C (0,09)
48	5,64 a A(0,16)	1,97 c D (0,16)	3,74 b C (0,16)	3,79 D (0,09)
120	5,97 a A(0,16)	1,92 c D (0,16)	3,69 b C (0,16)	3,86 C (0,09)
240	5,84 a A(0,16)	1,81 c D (0,16)	3,75 b C (0,16)	3,80 D (0,09)
360	5,45 a B (0,16)	1,87 c D (0,16)	3,72 b C (0,16)	3,68 D (0,09)
504	4,96 a B (0,16)	1,94 c D (0,16)	3,82 b C (0,16)	3,57 D (0,09)
Médias (Erro padrão)	5,49 a (0,05)	2,61 c (0,05)	4,06 b (0,05)	

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, com um nível de significância de 5%.

²Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.

TABELA 6A Valores médios da inibição de *E. coli*, em função do tratamento utilizado e do tempo de armazenamento.

Tempo ¹	Tratamentos ²			Médias (Erro-padrão)
	Controle	Orégano	Pimenta	
0	5,48 a A (0,15)	5,30 a A (0,15)	5,48 a A (0,15)	5,42 A (0,08)
6	5,60 a A (0,15)	4,87 b B (0,15)	4,82 b B (0,15)	5,10 B (0,08)
12	5,70 a A (0,15)	4,46 b B (0,15)	4,45 b C (0,15)	4,87 B (0,08)
24	5,68 a A (0,15)	3,64 c C (0,15)	4,37 b C (0,15)	4,56 C (0,08)
48	5,77 a A (0,15)	3,58 c C (0,15)	4,09 b C (0,15)	4,48 C (0,08)
120	5,80 a A (0,15)	3,49 c C (0,15)	4,23 b C (0,15)	4,51 C (0,08)
240	5,67 a A (0,15)	3,56 c C (0,15)	4,22 b C (0,15)	4,48 C (0,08)
360	5,45 a A (0,15)	3,45 c C (0,15)	4,36 b C (0,15)	4,42 C (0,08)
504	5,37 a A (0,15)	3,42 c C (0,15)	4,34 b C (0,15)	4,38 C (0,08)
Médias (Erro padrão)	5,61 a (0,05)	3,97 c (0,05)	4,48 b (0,05)	

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott com um nível de significância de 5%.

²Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.

TABELA 7A Análise de variância para o crescimento da cultura mista *S. aureus* e *E. coli*, adicionado de óleo essencial de orégano.

Fonte de variação	Gl	Quadrado Médio (p-valor)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Microorganismo (M)	1	0,3220 (0,0034)	0,0711 (0,0735)
Tempo (Tp)	8	8,6639 (<0,0001)	1,8231 (<0,0001)
M x Tp	8	0,0501 (0,1788)	0,0177 (0,5663)
Erro	36	0,0326	0,0209
CV (%)		7,10	5,68

(P<0,05).

TABELA 8A Valores médios do crescimento de *S. aureus* na cultura mista e na cultura única (controle) adicionado de óleo essencial de orégano, em função do tempo de armazenamento.

Tempo	Microrganismo		Médias ¹ (Erro-padrão)
	Cultura mista	Cultura única	
0	5,36 (0,10)	5,40 (0,10)	5,38 A (0,07)
6	3,42 (0,10)	3,61 (0,10)	3,52 B (0,07)
12	2,38 (0,10)	2,65 (0,10)	2,52 C (0,07)
24	2,10 (0,10)	2,47 (0,10)	2,29 D (0,07)
48	1,89 (0,10)	1,66 (0,10)	1,78 E (0,07)
120	1,75 (0,10)	1,89 (0,10)	1,82 E (0,07)
240	1,83 (0,10)	1,90 (0,10)	1,86 E (0,07)
360	1,77 (0,10)	1,96 (0,10)	1,86 E (0,07)
504	1,68 (0,10)	2,04 (0,10)	1,86 E (0,07)
Médias ² (Erro padrão)	2,47 b (0,03)	2,62 a (0,03)	

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, com um nível de significância de 5%.

²Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.

TABELA 9A Valores médios do crescimento de *E. coli* na cultura mista e na cultura única (controle) adicionado de óleo essencial de orégano, em função do tempo de armazenamento.

Tempo	Microrganismo		Médias ¹ (Erro-padrão)
	Cultura mista	Cultura única	
0	3,69 (0,08)	3,63 (0,08)	3,66 A (0,06)
6	3,24 (0,08)	3,26 (0,08)	3,25 B (0,06)
12	2,68 (0,08)	2,67 (0,08)	2,68 C (0,06)
24	2,26 (0,08)	2,34 (0,08)	2,30 D (0,06)
48	2,31 (0,08)	2,29 (0,08)	2,30 D (0,06)
120	2,18 (0,08)	2,43 (0,08)	2,30 D (0,06)
240	2,22 (0,08)	2,24 (0,08)	2,23 D (0,06)
360	2,00 (0,08)	2,20 (0,08)	2,10 E (0,06)
504	2,01 (0,08)	2,18 (0,08)	2,10 E (0,06)
Médias ² (Erro padrão)	2,51 a (0,03)	2,58 a (0,03)	

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, com um nível de significância de 5%.

²Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.

TABELA 10A Análise de variância para o crescimento da cultura mista *S. aureus* e *E. coli* adicionado de óleo essencial de pimenta-do-reino.

Fonte de variação	Gl	Quadrado Médio (p-valor)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Microorganismo (M)	1	0,0929 (0,0267)	0,1462 (0,0156)
Tempo (Tp)	8	1,9688 (<0,0001)	1,0848 (<0,0001)
M x Tp	8	0,0357 (0,0678)	0,0251 (0,3802)
Erro	36	0,0174	0,0226
CV (%)		3,28	5,35

(P<0,05).

TABELA 11A Valores médios do crescimento de *S. aureus* na cultura mista e na cultura única (controle) adicionado de óleo essencial de pimenta-do-reino em função, do tempo de armazenamento.

Tempo	Microrganismo		Médias ¹ (Erro-padrão)
	Cultura mista	Cultura única	
0	5,28 (0,08)	5,26 (0,08)	5,27 A (0,05)
6	4,30 (0,08)	4,50 (0,08)	4,40 B (0,05)
12	4,22 (0,08)	4,28 (0,08)	4,25 C (0,05)
24	4,06 (0,08)	4,19 (0,08)	4,13 C (0,05)
48	4,01 (0,08)	3,75 (0,08)	3,88 D (0,05)
120	3,65 (0,08)	3,69 (0,08)	3,67 E (0,05)
240	3,53 (0,08)	3,67 (0,08)	3,60 E (0,05)
360	3,49 (0,08)	3,71 (0,08)	3,59 E (0,05)
504	3,31 (0,08)	3,54 (0,08)	3,42 F (0,05)
Médias ² (Erro padrão)	3,98 b (0,03)	4,07 a (0,03)	

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, com um nível de significância de 5%.

²Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.

TABELA 12A Valores médios do crescimento de *E. coli* na cultura mista e na cultura única (controle) adicionado de óleo essencial de pimenta-do-reino em função, do tempo de armazenamento.

Tempo	Microrganismo		Médias ¹ (Erro-padrão)
	Cultura mista	Cultura única	
0	3,69 (0,09)	3,69 (0,09)	3,69 A (0,06)
6	3,30 (0,09)	3,27 (0,09)	3,29 B (0,06)
12	2,90 (0,09)	3,01 (0,09)	2,96 C (0,06)
24	2,78 (0,09)	2,63 (0,09)	2,70 D (0,06)
48	2,54 (0,09)	2,50 (0,09)	2,52 E (0,06)
120	2,58 (0,09)	2,36 (0,09)	2,47 E (0,06)
240	2,59 (0,09)	2,27 (0,09)	2,43 E (0,06)
360	2,66 (0,09)	2,48 (0,09)	2,57 E (0,06)
504	2,75 (0,09)	2,64 (0,09)	2,70 D (0,06)
Médias ² (Erro padrão)	2,87 a (0,03)	2,76 b (0,03)	

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, com um nível de significância de 5%.

²Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.