



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

RAYSSA JULLIANE DE CARVALHO

**EFEITO INIBITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. FRENTE A
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E ÁCIDO LÁTICAS DE IMPORTÂNCIA
EM QUEIJO DE COALHO**

JOÃO PESSOA – PB

2015

RAYSSA JULLIANE DE CARVALHO

**EFEITO INIBITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. FRENTE A
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E ÁCIDO LÁTICAS DE IMPORTÂNCIA
EM QUEIJO DE COALHO**

JOÃO PESSOA – PB

2015

RAYSSA JULLIANE DE CARVALHO

**EFEITO INIBITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. FRENTE A
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E ÁCIDO LÁTICAS DE IMPORTÂNCIA EM
QUEIJO DE COALHO**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos do Centro de Tecnologia da
Universidade Federal da Paraíba (UFPB) –
Campus I, em cumprimento aos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciência
e Tecnologia de Alimentos.**

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA – PB

2015

C331e Carvalho, Rayssa Julliane de.

Efeito inibitório do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. frente a bactérias patogênicas e ácido láctico de importância em queijo de coalho / Rayssa Julliane de Carvalho.- João Pessoa, 2015.

73f.

Orientador: Evandro Leite de Souza

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT

RAYSSA JULLIANE DE CARVALHO

Efeito inibitório do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. frente a bactérias patogênicas e ácido lácticas de importância em queijo de coalho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – Campus I, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Dissertação _____ em ____ / ____ /2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza – Orientador
Departamento de Nutrição/Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira – Membro interno
Unidade Acadêmica de Saúde/Universidade Federal de Campina Grande

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima – Membro externo
Departamento de Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal da Paraíba

*As minhas queridas avós, Ana Carvalho e Júlia Bila (in
memorian),
Exemplos de amor, simplicidade e força.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu imensurável amor, pelas bênçãos inestimáveis, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho certo nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À Universidade Federal da Paraíba, pelo suporte e estrutura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPB, seu corpo docente e funcionários, pela oportunidade e presteza.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao professor Evandro Leite de Souza, pela orientação, por acreditar em meu potencial durante a realização do Mestrado, pelos ensinamentos e pelo suporte e disponibilização de recursos e infraestrutura de laboratório.

À Professora Marciane Magnani, pelos valiosos ensinamentos transmitidos, pela confiança em mim depositada, pela sua dedicação e amizade.

À Professora Maria Lúcia da Conceição, pela recepção carinhosa no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DN/CCS/UFPB), amizade e gentileza.

Às Professoras Maria Elieidy Gomes de Oliveira e Edeltrudes de Oliveira Lima, membros da banca examinadora, pela valiosa contribuição.

Ao Professor Juliano De Dea Lindner, pela contribuição metodológica.

À Professora Janneyre Ferreira Maciel, pela abertura concedida para utilização do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DEA/CT/UFPB).

Aos meus pais, Bernardina Carvalho e Paulo Carvalho, meus maiores exemplos, pela educação, pelas palavras de encorajamento, pelas orações, por estarem sempre presentes na minha vida. Muito obrigada meus amores!

Às minhas irmãs Thayssa Carvalho, Laryssa Carvalho e Kênia Carvalho, pela amizade e incentivo. Meu amor por vocês é inestimável. Minha vida não teria sentido se vocês não fizessem parte dela.

A Herbert Nunes, meu namorado, por todo amor, carinho, amizade e incentivo. O meu eterno agradecimento por me ajudar a conquistar esse sonho.

À Geany Targino, amiga fiel, companheira de trabalho desde a graduação, meu muito obrigada pela amizade insubstituível, por dividir todo trabalho durante os experimentos, pelos momentos inesquecíveis vividos ao seu lado, por me fazer sorrir nos momentos mais difíceis.

A Allan Caldas, Allanna Caldas, Allinne Caldas, Allysson Caldas, Hamlet Amorim, Larissa Amorim, Mariana Oliveira e Raimundo Pereira, amigos especiais, sempre presentes em minha vida, pela amizade, carinho, preocupação, ajuda e por todos os momentos que já vivemos juntos.

Aos amigos Danilo Xavier, Estefânia Garcia e Jossana Sousa, por compartilharem seus conhecimentos, pelos conselhos e amizade. Não tenho palavras para agradecer-los.

Às amigas Carine Maciel, Narciza Arcanjo, Renata Maynard e Taliana Bezerra, pela valiosa amizade, por todos os momentos compartilhados, pela força, apoio e palavras de incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DN/CCS/UFPB), Adassa Tavares, Ana Júlia Athayde, Caroline Junqueira, Ingrid Dantas, Isabella Medeiros, Jessica Bezerra, Kataryne Árabe, Nelson Justino, Neyrijane Targino e Vanessa Gonçalves, pelo carinho, cooperação, e pelos bons momentos de convívio.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e torceram pelo meu sucesso, muito obrigada!

"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."

Ayrton Senna

Carvalho R. J. **Efeito inibitório do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. frente a bactérias patogênicas e ácido lácticas de importância em queijo de coalho.** 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. Orientador: Prof. Evandro Leite de Souza.

RESUMO

O queijo de coalho é obtido por coagulação enzimática através da ação da renina ou enzimas específicas, assim como pelo uso de culturas de bactérias ácido-lácticas (BAL) iniciadoras, que contribuem positivamente para os aspectos organolépticos deste produto. Algumas características físico-químicas desse tipo de queijo, como elevada umidade e pH, favorecem o crescimento de bactérias patogênicas, frequentemente associadas a surtos alimentares, como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. O desenvolvimento destes patógenos no queijo coalho pode ser evitado pela adição de antimicrobianos sintéticos; entretanto, o crescente interesse dos consumidores por alimentos mais naturais, livres ou com baixos níveis de aditivos químicos, tem direcionado as pesquisas sobre compostos naturais com propriedades antimicrobianas que possam ser usados na indústria de alimentos. O óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (OETV), popularmente conhecido como tomilho, tem atividade antimicrobiana reconhecida contra bactérias patogênicas, porém não existem informações sobre seu efeito sobre bactérias de interesse tecnológico, como culturas lácticas iniciadoras, utilizadas no processamento de queijos. Considerando tais aspectos, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito inibitório do OETV sobre cepas de *Lactococcus* frequentemente utilizadas no processamento de queijo de coalho, bem como sobre cepas das bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Para isso, foram determinados os valores da concentração inibitória mínima (CIM) do OETV, e os efeitos do OETV sobre a viabilidade das células bacterianas foram determinados em caldo base-queijo e em amostras de queijo de coalho. Os principais constituintes do OETV, identificados por CG-MS, foram timol (43,19%) e p-cimeno (28,55%). O valor da CIM de OETV foi de 2,5 µL/mL frente a *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e de 1,25 µL/mL contra a *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* em co-cultura. Nos ensaios em caldo base-queijo contendo OETV na concentração de 1,25 µL/mL, após 24 h, foi observada uma queda de aproximadamente 1 log UFC/mL nas contagens de células viáveis de *L. monocytogenes* e de *Lactococcus* spp. Na mesma concentração, o OETV não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *S. aureus*. Somente nos ensaios com o OETV a 5 µL/mL, a contagem de células viáveis de *S. aureus* e *L. monocytogenes* apresentou um decréscimo acentuado ao longo do tempo, com as curvas de tempo de morte semelhante àquela obtida para a co-cultura láctea quando exposta ao OETV a 2,5 µL/mL. O OETV a 5 µL/mL provocou uma forte diminuição no número de células viáveis da co-cultura láctica, com contagens de 2 log UFC/mL após 12 h de exposição. Nos ensaios com o queijo de coalho adicionado de OETV a 1,25 µL/g não houve redução na contagem de células viáveis da co-cultura láctica ou das bactérias patogênicas ensaiadas. Porém, a concentração 2,5 µL/g, o OETV provocou uma redução na contagem de células viáveis de todas as bactérias ensaiadas ao longo de 72h de exposição, que variou de 0,3-1,0 log UFC/g. Os resultados sugerem que as concentrações de OETV necessárias para controlar bactérias patogênicas em queijo de coalho devem ser cuidadosamente consideradas, pois podem apresentar efeitos negativos sobre o crescimento e sobrevivência das bactérias que compõem o fermento láctico.

Palavras-chave: tomilho, atividade antimicrobiana, fermento láctico, patógenos alimentares, queijo de coalho.

Carvalho R. J. **Inhibitory effect of the essential oil from *Thymus vulgaris* L. against pathogenic and lactic acid bacteria of importance in coalho cheese.** 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. Orientador: Prof. Evandro Leite de Souza.

ABSTRACT

Coalho cheese is obtained by enzymatic coagulation by the action of renin or specific enzymes, as well as using starter lactic acid bacteria (LAB) cultures that positively contribute to organoleptic aspects of the product. Some physicochemical characteristics of this cheese, as high moisture and pH, favor the growth of pathogenic bacteria frequently associated to outbreaks, such as *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The development of these pathogens in coalho cheese could be avoided by the adding of synthetic additives, however the growing interest of consumers for natural foods, free or containing low levels of chemical additives, have led the research of natural compounds with antimicrobial properties that can be used in food industry. The essential oil from *Thymus vulgaris* L. (TVEO), popularly known as thyme, possesses recognized antimicrobial activity against pathogenic bacteria, however there is no information about its effect on bacteria of technological interest, such as starter lactic acid cultures, used cheese manufacture. Considering these aspects, this study was performed to evaluate the inhibitory effect of TVEO on *Lactococcus* strains commonly used in coalho cheese processing as well as on pathogenic strains *S. aureus* and *L. monocytogenes*. For this, the values of minimum inhibitory concentration (MIC) of TVEO were determined against the test strains and the effects of TVEO on bacterial cell viability were assessed in cheese-based broth and in cheese samples. The main constituents of TVEO identified by CG-MS, were thymol (43.19%) and *p*-cymene (28.55%). The MIC value MIC of TVEO was 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ against *S. aureus* and *L. monocytogenes*, and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ against *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* in co-culture. In the assays in cheese-based broth containing TVEO at 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ after 24 h, a decrease of approximately 1 log CFU/mL in the viable cell counts of *L. monocytogenes* and *Lactococcus* spp. was observed. At the same concentration, the TVEO presented no inhibitory effects on the growth of *S. aureus*. Only when TVEO was incorporated in growth media at 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ viable cell counts of *S. aureus* and *L. monocytogenes* presented a sharp decrease over time, showing kill-time curves shape similar to that obtained when starter co-culture was exposed to TVEO at 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. TVEO at 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ decrease 2 log CFU/mL the viable cell counts of the starter co-culture after 12 h of exposure. In the assays with coalho cheese added of TVEO at 1.25 $\mu\text{L}/\text{g}$ no reduction in viable cells counts of co-culture or pathogenic bacteria was observed. However, OETV at 2.5 $\mu\text{L}/\text{g}$ caused a decrease in viable cell counts of all tested bacteria tested after 72 h of exposure, varying from 0.3 to 1.0 log CFU/g. The results suggest that TVEO concentrations required to control pathogenic bacteria in coalho cheese should be carefully considered, since they can have negative effects on the growth and survival of lactic bacteria of the lactic fermentum.

Keywords: thyme, antimicrobial activity, lactic ferment, food pathogens, coalho cheese.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Espécie vegetal <i>Thymus vulgaris</i> L. | 28 |
| Figura 2 - Esquema de organização da microplaca utilizada na determinação da Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. frente a cepas de <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | 33 |

ARTIGO

| | |
|---|----|
| Figure 1 - Viable cell counts of <i>S. aureus</i> (A), <i>L. monocytogenes</i> (B) and mesophilic starter co-culture (C) in <i>coalho</i> cheese based-broth at 37 °C as a function of <i>Thymus vulgaris</i> L. essential oil concentration: (○): 0 μL/mL; (▲): 1.25 μL/mL; (□): 2.5 μL/mL; (×): 5.0 μL/mL. Detection limit of the test: 2.0 log CFU/mL | 71 |
| Figure 2 - Viable cell counts of <i>S. aureus</i> (A), <i>L. monocytogenes</i> (B) and <i>Lactococcus</i> spp. (C) in semi-solid <i>coalho</i> cheese model at 10 °C as a function of <i>Thymus vulgaris</i> L. essential oil concentration: (○): 0 μL/mL; (▲): 1.25 μL/mL; (□): 2.5 μL/mL. Detection limit of the test: 2.0 log CFU/mL. | 72 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Estudos que demonstram o efeito inibitório do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> L. frente a diferentes micro-organismos. | 29 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Parâmetros microbiológicos do queijo de coalho utilizado como substrato para o crescimento das cepas teste | 34 |
| Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos do queijo de coalho e do caldo base-queijo utilizado como substrato para o crescimento bacteriano | 34 |

ARTIGO

| | |
|--|----|
| Table 1 - CG-MS analysis of the essential oil from <i>Thymus vulgaris</i> L. | 70 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| BAL | bactérias ácido lácticas |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> |
| OE | óleo essencial |
| OETV | óleo essencial <i>Thymus vulagris</i> L |
| CaCl ₂ | cloreto de cálcio |
| BLI | bactérias lácticas iniciadoras |
| BLNI | bactérias lácticas não iniciadoras |
| UFC | unidades formadoras de colônias |
| ABHI | ágar infusão de cérebro e coração |
| CBHI | caldo infusão de cérebro e coração |
| DO | densidade óptica |
| CIM | concentração inibitória mínima |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 QUEIJO DE COALHO | 18 |
| 2.2 MICRO-ORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA EM QUEIJO DE COALHO. | 20 |
| 2.2.1 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | 21 |
| 2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> | 21 |
| 2.2.3 <i>Listeria monocytogenes</i> | 23 |
| 2.3 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS. | 24 |
| 2.4 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Thymus vulgaris</i> L. .. | 25 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 3.1 MATERIAIS | 30 |
| 3.1.1 Óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. | 30 |
| 3.1.2 Cepas bacterianas | 30 |
| 3.2 MÉTODOS | 30 |
| 3.2.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. | 30 |
| 3.2.2 Preparo do inóculo | 31 |
| 3.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima | 32 |
| 3.2.4 Amostras de queijo de coalho e obtenção do caldo base-queijo | 33 |
| 3.2.5 Efeito do OETV sobre a viabilidade bacteriana em caldo base-queijo | 35 |
| 3.2.6 Efeito do OETV sobre a viabilidade bacteriana em queijo de coalho | 35 |
| 3.2.7 Análise Estatística | 36 |
| REFERÊNCIAS | 37 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 48 |
| 4.1 ARTIGO | 48 |
| ANEXO A | 73 |

1 INTRODUÇÃO

O queijo de coalho é um alimento tipicamente brasileiro e amplamente difundido na região nordeste do Brasil (QUEIROGA et al., 2013). Segundo a legislação vigente, entende-se por queijo de coalho, “o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas, sendo comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação”. É classificado como um queijo de média à alta umidade, de massa semicozida ou cozida, apresentando um teor de gordura no extrato seco entre 35% e 60% (BRASIL, 1997).

Na elaboração de queijos a coagulação do leite pode ser realizada pelo uso de fermentos ou culturas de bactérias lácticas, definidas como uma preparação microbiana contendo números elevados de células de um ou mais gêneros e espécies de bactérias ácido lácticas (BAL). Essas BAL são responsáveis pela produção de ácido láctico por meio da fermentação da lactose, provocando o abaixamento do pH do leite de 6,6 para aproximadamente 4,6, o que, em consequência, causa a coagulação do leite. Esta acidificação alcançada também contribui no desenvolvimento das propriedades sensoriais dos produtos obtidos, bem como tem sido relacionada a maior estabilidade microbiológica ao longo do armazenamento em decorrência da produção de compostos capazes de inibir microorganismos deteriorantes e/ou patogênicos nestes substratos (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). Espécies do gênero *Lactococcus* constituem as principais bactérias responsáveis pela acidificação do leite, de modo que das cinco espécies conhecidas, a única que contribui significativamente na produção de queijos é *Lactococcus lactis*, sendo as subespécies mais importantes *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* (SMIT; SMIT; ENGELS, 2005; TURCHI et al., 2013).

Além de ser fonte de BAL, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar, em especial, os queijos frescos artesanais por serem, na maioria das vezes, elaborados a partir de leite cru, associados, frequentemente, à práticas impróprias de manipulação (LEITE, 2012). Entretanto, a contaminação com bactérias patogênicas pode ocorrer também em queijos produzidos com leite pasteurizado, devido em sua maioria à contaminação pós-pasteurização. A contaminação microbiana desses produtos assume relevância para a indústria pelas perdas econômicas, e para a saúde pública em decorrência do risco de veicularem bactérias patogênicas, que podem estar envolvidas em surtos alimentares (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

Dentre os micro-organismos patogênicos frequentemente encontrados em queijos de coalho, destaca-se *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. A bactéria *L. monocytogenes* é amplamente distribuída no ambiente e tem sido frequentemente encontrada em unidades de processamento de alimentos (MELO; ANDREW; FALEIRO, 2015). As principais fontes de infecção causada por *L. monocytogenes* são os queijos, produtos de aves, produtos de carne bovina, legumes, frutos do mar e saladas (MARTÍN et al., 2014). De acordo com a *European Food Safety Authority* (EFSA), infecções causadas por *L. monocytogenes* estão associadas a uma taxa de letalidade de aproximadamente 12%, que é considerada uma das maiores taxas entre as doenças de origem alimentar (GILLISS et al., 2013). Considerando a incidência de *L. monocytogenes* em produtos lácteos, a legislação brasileira (ANVISA, 2001) estabelece ausência deste patógeno em 25 g de amostra. Branco et al. (2003), avaliando amostras de queijo de coalho industrial armazenados sob refrigeração observaram a presença desta bactéria em 19% das amostras analisadas. Por sua vez, Sousa et al. (2000) detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 20% das amostras de queijo de coalho artesanal comercializadas em João Pessoa-PB.

A contaminação por *S. aureus* ocorre, muitas vezes, devido à utilização de leite cru e condições higiênico-sanitárias inadequadas durante e após pasteurização (MIRANDA et al., 2009). *S. aureus* é uma bactéria reconhecida como agente patogênico envolvido em um grande número de surtos de intoxicação alimentar em todo o mundo (LV et al., 2014). Dados da EFSA revelam que os queijos se destacam dentre os alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar causadas em decorrência da ingestão de toxinas estafilocócicas (KADIROĞLU; KOREL; CEYLAN, 2014; ZELENY, et al., 2015). Elevadas contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* e *S. aureus* têm sido detectadas em diversos estudos com queijos de coalho produzidos no Nordeste brasileiro (BORGES et al., 2003; FEITOSA et al., 2003; BRUNO et al., 2005). Na maioria destes estudos, os queijos foram classificados como impróprios para o consumo humano, dada a constatação de níveis de contaminação superiores aos permitidos pela legislação vigente - 10^3 UFC/g (ANVISA, 2001).

Tendo conhecimento da potencial ocorrência de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em amostras de queijo de coalho, bem como considerando o possível impacto desses patógenos sobre a saúde e bem estar dos consumidores, torna-se de interesse a busca por procedimentos que controlem o crescimento destes agentes neste substrato em particular. Considerando a crescente busca dos consumidores por alimentos cada vez mais naturais, livres ou com baixos níveis de aditivos químicos, o uso de conservantes derivados do chamado “metabolismo

secundário” vegetal têm atraído pesquisadores de diversas áreas (BARROS et al., 2009). Dentre estes produtos, os óleos essenciais (OEs) de plantas e seus constituintes têm sido amplamente avaliados como possíveis candidatos para uso como antimicrobianos em sistemas de conservação de alimentos.

Produzidos por mais de 17.000 espécies de plantas aromáticas, geralmente pertencentes a famílias Lamiaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Zingiberaceae e Asteraceae (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012), os OEs representam uma mistura complexa de vários componentes como terpenos, terpenóides, fenilpropenos e fenólicos (VOON; BHAT; RUSUL, 2012). Em especial, o óleo essencial obtido da espécie vegetal *Thymus vulgaris* L., popularmente conhecido como tomilho, tem revelado destacável propriedade antimicrobiana de amplo espectro, geralmente relacionada a seus principais constituintes majoritários mais frequentes, os quais são timol, p-cimeno e carvacrol (KOHYAMA et al., 2015; NEZHADALI et al., 2014; RAMOS et al., 2012).

Embora a capacidade de um composto ou componente em inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes seja de grande importância no desenvolvimento de sistemas de conservação de alimentos, também se deve atentar para os seus possíveis efeitos sobre os micro-organismos de interesse tecnológico, utilizados no processamento de produtos fermentados, a exemplo de queijos. Tal preocupação se baseia no fato de que uma elevada inibição de bactérias tecnológicas por parte do composto ou componente antimicrobiano testado pode possivelmente repercutir em problemas ao longo do processamento e armazenamento ou mesmo perdas das características particulares do produto obtido. Considerando tais aspectos, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. sobre a viabilidade celular de cepas das bactérias tecnológicas *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* em co-cultura aplicada no processamento de queijo de coalho, bem como de cepas das bactérias patogênicas *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUEIJO DE COALHO

O queijo é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas A e B. É um dos alimentos mais nutritivos que se conhece, dado que um queijo com 48% de gordura contém aproximadamente 25% de proteína, significando que, em termos de valor proteico, 210 g desse produto equivalem a 300 g de carne (OLIVEIRA, 2012).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), queijo é “o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes”. A legislação complementa essa definição, reservando o nome queijo exclusivamente para produtos cuja base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de outra origem (BRASIL, 1996).

Dentre as variedades de queijos, o queijo de coalho é um dos mais tradicionais queijos produzidos e consumidos no Nordeste brasileiro, principalmente nos Estados do Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba. Suas características organolépticas peculiares são responsáveis pela expansão comercial do produto, sendo encontrado praticamente em todos os Estados da Federação. Segundo a legislação vigente (BRASIL, 1997), entende-se por queijo de coalho, “o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação”.

A origem do nome queijo de coalho deve-se ao fato de ter sido tradicionalmente elaborado com leite coagulado pela ação de coalho animal, o qual caracteriza-se por pedaços do estômago de pequenos animais, que quando devidamente preparados são conhecidos como coagulador ou abomaso (AQUINO, 1983). A Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, Instrução Normativa nº 30 de 26/06/2001, define este produto como um queijo de consistência semidura e elástica, com textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras. Apresenta cor branca amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, com aroma, também ligeiramente ácido, que lembra massa de

queijo coagulada. O queijo de coalho possui forma cilíndrica ou retangular, com peso entre 0,5 a 1,5 kg, sendo consumido fresco ou curado (BRASIL, 2001; SILVA et al., 2010).

A fabricação de queijos envolve procedimentos gerais e alguns específicos de acordo com o tipo de produto. Entre as etapas, ou mesmo durante elas, pode haver variações relativas no tempo de descanso da massa, tempo de mexeduras, diferenças de temperaturas, tempo de dessoragem e, também, diferenças na condição de maturação. Esses fatores determinam a textura, aroma e sabor de cada queijo, influenciando as suas diferenças e características particulares (CURI; BONASSI, 2007).

Segundo Laguna e Landim (2003), a fabricação de queijos compreende as seguintes etapas básicas: 1. Coagulação do leite: pode ser feita diretamente pela flora microbiana do leite, ou pela adição de cultivo bacteriano apropriado (coalho ou fermento). Após um período de tempo, o leite fermentado transforma-se na coalhada; 2. Corte da coalhada, para liberação do lacto soro; 3. A massa obtida é colocada em formas e prensada, ou não, dependendo do queijo; 4. O queijo é salgado e, em seguida, embalado.

O coalho, utilizado em todos os tipos de queijo, exceto nos frescos, tipo “cottage”, tem como função a coagulação da caseína presente no leite. A principal enzima responsável por essa ação é a renina, uma fosfoproteína de ação proteolítica presente no estômago de ruminantes jovens, a qual atua hidrolisando ligações peptídicas da caseína, transformando-a em *para*-caseína que precipita em presença de íons Ca^{2+} formando, então, a coalhada. Este processo é dependente da temperatura, do pH e do teor de cálcio do leite. A temperatura ótima de ação do coalho é em torno de 40 °C, mas costuma-se utilizar temperaturas ligeiramente mais baixas (em torno de 35 °C) para evitar que a coalhada se torne muito rígida. Outro método de coagulação da caseína consiste na adição de ácido ao leite em quantidade suficiente para igualar o pH do meio ao ponto isoelétrico da proteína (pH 4,5). Neste pH, as micelas de caseína agregam-se e precipitam, porém esse método fornece queijos de qualidade inferior aos produzidos pelo método enzimático (OLIVEIRA, 2012; PEREDA et al., 2005; PERRY, 2004).

Durante o processo de formação da coalhada podem ser adicionados, conforme a necessidade e o interesse do produtor, aditivos como cloreto de cálcio (CaCl_2), nitratos, corantes, etc. O CaCl_2 aumenta o teor de íons Ca^{2+} no leite, acelerando a coagulação da caseína e auxiliando na formação do coágulo. O CaCl_2 é utilizado, principalmente, quando o teor de proteína no leite não é o ideal (OLIVEIRA, 2012; PEREDA et al., 2005).

Para fabricação de produtos lácteos fermentados podem-se utilizar culturas definidas - um número conhecido de cepas conhecidas - ou culturas mistas nas quais se tem um número desconhecido de cepas. As culturas mesofílicas utilizadas, definidas ou mistas, são constituídas, principalmente, de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *lactis*; por sua vez, as culturas termofílicas mais comuns são compostas de *Streptococcus thermophilus* e bacilos lácticos como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ou *L. helveticus* (PEREDA et al., 2005; PERRY, 2004). Assim, sob a ótica bioquímica, a microbiota dos queijos pode ser dividida em dois grupos: bactérias lácticas iniciadoras (BLI) e micro-organismos secundários. As BLI são responsáveis pela transformação de lactose em ácido láctico durante a preparação do queijo. Suas enzimas também contribuem na maturação, estando envolvidas na proteólise e na conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis pelas propriedades organolépticas do produto (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Os micro-organismos secundários compreendem as bactérias lácticas não iniciadoras (BLNI), que se multiplicam no interior da maioria das variedades de queijos, e outras bactérias, leveduras e/ou fungos que crescem, tanto no interior, quanto na parte externa dos queijos. Entre estes micro-organismos estão os proteolíticos, lipolíticos e os produtores de gás (PERRY, 2004; BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

2.2 MICRO-ORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA EM QUEIJO DE COALHO

Na elaboração de queijos, a coagulação do leite pode ser realizada pelo uso de fermentos ou culturas lácteas, definidas como uma preparação microbiana contendo números elevados de células de um ou mais gêneros e espécies de bactérias ácido lácticas (BAL) (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). De acordo com López-Díaz et al. (2000), *Lactococcus* são as principais bactérias responsáveis pela acidificação do leite. Das cinco espécies conhecidas, a única que contribui significativamente na produção de queijos é o *L. lactis*, sendo as subespécies mais importantes *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* (SMIT; SMIIT; ENGELS, 2005; TURCHI et al., 2013).

Além de ser fonte de BAL, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar, em especial, os queijos frescos artesanais por serem, na maioria das vezes, elaborados a partir de leite cru. Porém, a presença de patógenos pode ocorrer também em queijos produzidos com leite pasteurizado, devido à contaminação pós-pasteurização. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria,

pelas perdas econômicas; como para a saúde pública, pelo risco de veicularem micro-organismos patogênicos, que podem estar envolvidos em surtos alimentares (GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Dentre os patógenos contaminantes de alimentos frequentemente envolvidos em surtos decorrentes de alimentos contaminados, destacam-se *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, prevalentes dentre os micro-organismos patogênicos isolados de queijo de coalho. Abaixo são apresentadas algumas informações a respeito das principais bactérias iniciadoras utilizadas na produção de queijo de coalho, bem como das bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

2.2.1 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*

O gênero *Lactococcus* foi criado com o objetivo de reclassificar espécies dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Presentes em diversos ecossistemas, como plantas, pele de animais e diferentes tipos de alimentos, os micro-organismos desse gênero apresentam-se em forma de cocos Gram-positivo, microaerofílicos e homofermentativos, com produção exclusiva de ácido láctico L (+) (CASALTA; MONTEL, 2008).

Devido às suas propriedades tecnológicas, algumas espécies de *Lactococcus* são amplamente utilizadas na indústria de produtos lácteos, como queijos e coalhada, tendo como função principal o desenvolvimento de atividades acidificantes e proteolíticas, e, conseqüentemente, de textura, sabor e aroma, de modo a contribuir positivamente para a percepção sensorial do produto (SMIT; SMIIT; ENGELS, 2005). Cavalcante et al. (2004) ao empregarem uma mistura de cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* isoladas de leite cru na elaboração de queijo de coalho a partir de leite pasteurizado, obtiveram boa aceitação pelos consumidores, quando avaliados sensorialmente.

Espécies de *Lactococcus* podem atuar como bioconservadores, por meio da produção de compostos antimicrobianos, como os ácidos orgânicos e bacteriocinas. Estudos descrevem cepas bacteriocinogênicas de *Lactococcus* que apresentaram atividade antimicrobiana contra diversos patógenos contaminantes de alimentos (HELLAL et al., 2012).

2.2.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcae, juntamente com os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Já foram caracterizadas mais de 50 espécies e subespécies desse gênero (PODKOWIK; BYSTRON; BANIA, 2012). Apresenta formas esféricas (cocos), Gram e catalase-positivas, medindo cerca de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, as

quais podem apresentar-se isoladas, aos pares, em cadeias curtas, ou grupos em forma de cachos irregulares. Os membros dessa espécie são imóveis, não esporulados, geralmente não-encapsuladas, anaeróbios facultativos, porém, desenvolvem-se melhor em atmosfera aeróbia, e agem sobre carboidratos produzindo ácidos por meio de metabolismo respiratório e fermentativos (SANTOS et al., 2007).

Em meio sólido, as colônias são circulares-convexas, com 2 a 3 mm de diâmetro, de coloração branca ao amarelo-dourado, com halo de hemólise ao redor (QUINN et al., 2005). Podem ser isoladas em meios seletivos como o ágar Baird Parker, apresentando-se de coloração negra, circundadas por um halo de precipitação (interno) e outro transparente (externo) (FACCIOLI, 2010).

A bactéria *S. aureus*, classificada como mesófila, apresenta crescimento ótimo em temperaturas entre 35 e 41 °C, porém consegue crescer e se multiplicar entre 6 e 48,5 °C (RODRIGUEZ-CATURLA et al., 2012). Para a produção de enterotoxinas, esta bactéria requer temperaturas entre 10 e 46 °C, com valores ótimos entre 40 e 45 °C (AYCICEK; CAKIROGLU; STEVENSON, 2005).

S. aureus tem a capacidade de manter-se viável em baixa atividade de água (Aa – 0,83 a 0,86), elevadas concentrações de cloreto de sódio (até 20%), e dentro de uma faixa de pH de 4 a 10, com um ótimo entre 6 e 7, sendo, portanto, capaz de se desenvolver em uma ampla variedade de alimentos (RODRIGUEZ-CATURLA et al., 2012). Seu habitat é amplo, podendo ser encontrado no ar, em fezes, esgotos e, principalmente, na mucosa nasal do homem e de animais, o que favorece sua transmissão aos alimentos por manipuladores, geralmente portadores assintomáticos, e por animais, principalmente o gado leiteiro com mastite (STAMFORD et al., 2006).

Algumas cepas de *S. aureus* são capazes de produzir enterotoxinas dentro de matrizes alimentares, causando intoxicação alimentar estafilocócica (ARGUDIN et al., 2010), que consiste em uma gastroenterite resultante da ingestão de 100 a 200 ng de toxinas pré-formadas em alimentos. Essa quantidade de toxina é alcançada quando a contagem de *S. aureus* ultrapassa 10^5 e 10^6 UFC/g de alimento (BENNETT, 2005). As enterotoxinas de *S. aureus* são divididas em 5 tipos sorológicos “clássicos” (SEA, SEB, SEC, SED, and SEE). A enterotoxina SEA é considerada como a principal causa de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica nos Estados Unidos, Japão, França e Reino Unido (CARFORA et al., 2015).

Os alimentos frequentemente envolvidos em intoxicação alimentar estafilocócica incluem produtos cárneos, aves, ovos, leite e produtos lácteos (HAMADI et al., 2014), ou

seja, alimentos com elevado teor protéico, que requerem manipulação durante o processamento, muitas vezes associada ao aquecimento e/ou armazenamento inadequado destes produtos (ALABOUDI et al., 2012; HUMMERJOHANN et al., 2014; WALLIN-CARLQUIST et al., 2010).

Elevadas contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* e *S. aureus* já foram relatados em amostras de queijos de coalho produzidos no Nordeste brasileiro (BORGES et al., 2003; FEITOSA et al., 2003; BRUNO et al., 2005). Na maioria deles, os queijos foram classificados como impróprios para o consumo humano, dada a constatação de níveis de contaminação superiores aos permitidos pela legislação vigente, o qual é de 10^3 UFC/g (ANVISA, 2001).

2.2.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria são bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, em forma de bastonetes que medem de 0,5 a 2,0 micrômetros (μm) de comprimento por 0,5 μm de diâmetro (LIU, 2006; JAY, 2005). Possuem a capacidade de se multiplicar em uma vasta faixa de temperatura, que varia de 0 °C a 42 °C, e se movimentam com o auxílio de flagelos (FORSYTHE, 2010).

Bactérias do gênero *Listeria* são classificadas em oito espécies (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii* e *L. rocourtiae*), sendo que duas destas espécies são consideradas patogênicas: *L. monocytogenes*, patogênica para humanos; e *L. ivanovii*, patogênica principalmente para animais, tais como ovinos e bovinos (MONTVILLE; MATTHEWS, 2008).

L. monocytogenes é um micro-organismo que se multiplica em valores de pH baixos, em torno de 4,4, podendo ser inibida por ácidos orgânicos, como ácido acético, cítrico e láctico, na concentração de 0,1%. Seu crescimento é acentuado em valores de atividade de água (*aw*) maiores ou iguais a 0,97, podendo sobreviver em valores bem mais baixos, em torno de 0,83. Possui capacidade de se desenvolver em temperaturas que variam de - 4° a 50 °C, apresentando crescimento ótimo entre 30 e 37 °C. Determinadas concentrações de sal, em torno de 6,5%, também permitem seu crescimento (OLIVEIRA, 2011). Devido a essa habilidade de crescer e suportar condições adversas de temperatura, pH, concentração de sal, etc., este se torna um micro-organismo importante tratando-se das enfermidades causadas pela ingestão de produtos alimentícios contaminados (FORSYTHE, 2010), já que tais condições são utilizadas pelas indústrias alimentícias como barreiras para o crescimento de micro-organismos patogênicos (GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Além disso, *L. monocytogenes*

possui facilidade de colonização de superfícies e formação de biofilmes sobre equipamentos da indústria de alimentos e ali permanecer por longos períodos de tempo (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Diversos alimentos são suscetíveis à contaminação por *L. monocytogenes*, porém este micro-organismo tem sido frequentemente encontrado em leite cru, queijos, carnes frescas, frango, frutos do mar, frutas e produtos vegetais, tendo prevalência em leite e produtos lácteos (NIGHTINGALE; WINDHAM; WIEDMANN, 2005). São necessários apenas 10^2 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por grama ou mililitro de alimento para causar a listeriose (JEMMI; STEPHAN, 2006), sendo a dose infectante influenciada tanto pela susceptibilidade do hospedeiro quanto pela linhagem envolvida (McLAUCHLIN et al., 2004).

2.3 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

No sistema de produção de alimentos, torna-se fundamental que medidas sejam tomadas com o intuito de assegurar a inocuidade e estabilidade dos seus produtos finais, buscando a obtenção de um produto final com elevada qualidade nutricional, atrelada a uma longa vida útil. A qualidade dos alimentos pode ser afetada por alterações de ordem física, química ou microbiológica (FORSYTHE, 2010). Porém, as alterações microbiológicas são as mais importantes, devido à alta intensidade em que ocorrem, repercutindo em risco para o consumidor ou alterações nas características próprias do produto, tornando-o inaceitável para o consumo. Assim, deve-se considerar a contaminação microbiana tanto sob os aspectos de deterioração e consequentes perdas econômicas, bem como sob os aspectos de segurança aos consumidores quando considerada a ocorrência de doenças veiculadas por alimentos (DVAs), as quais representam um problema de saúde pública (HOLLEY; PATEL, 2005).

A conservação de alimentos tem progressivamente se tornado mais complexa devido ao contínuo surgimento de novos alimentos que requerem longa e estável vida de prateleira e um alto grau de proteção contra micro-organismos patogênicos (SOUZA, 2005). Muitos dos agentes químicos atualmente utilizados como conservantes de alimentos, com objetivo de evitar o desenvolvimento de micro-organismos, têm sido amplamente questionados quanto às implicações na saúde dos consumidores e ao favorecimento do desenvolvimento de tolerância por parte dos micro-organismos, principalmente quando considerado a utilização de quantidades não letais a espécies contaminantes (ÁLVAREZ-ORDÓNEZ et al., 2009). Alguns estudos têm detectado aumento da resistência microbiana em cepas de bactérias isoladas de alimentos, tais como *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e

Salmonella frente a diferentes antibióticos de uso clínico, incluindo ampicilina, metilicina, bacitracina, cloranfenicol e cefalotina (BANERJEE; SAKKAR, 2004; CARFORA, et al., 2015).

Neste contexto, tem ocorrido uma pressão sobre a indústria alimentícia para uma progressiva diminuição do uso de agentes conservantes químicos em seus produtos, o que consequentemente tem demandado a adoção de novas alternativas para uso na conservação de alimentos. Adicionalmente, os consumidores têm exigido alimentos mais naturais e/ou com baixos níveis de aditivos químicos, porém com alta qualidade organoléptica e longa vida de prateleira (BARROS et al., 2009). Assim, opções inovadoras e emergentes para o alcance da segurança microbiológica dos alimentos, como o uso de bacteriocinas, culturas protetoras, quitosana e compostos vegetais (extratos e óleos essenciais) têm sido avaliadas (LI et al., 2011; MALHEIROS et al., 2010; PUSHKALA; PARVATHY; SRIVIDYA, 2012).

Óleos essenciais extraídos de plantas são potencialmente ativos frente a muitos patógenos, pois são fontes de compostos antimicrobianos, sendo que muitos estudos tem comprovado a sua atividade inibitória frente a diferentes patógenos de origem alimentar. Diversos autores têm estudado a atividade antimicrobiana dos condimentos e/ou especiarias, assim como de seus óleos essenciais, que progressivamente têm sido adicionados aos alimentos como aromatizantes (SOUZA et al., 2005).

2.4 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L.

Nas plantas, etapas do processo vital, como crescimento, reprodução, envelhecimento e defesas contra agentes causadores de doenças são asseguradas e controladas pelas transformações químicas realizadas pelo metabolismo primário e secundário (BRAZ FILHO, 2010; GOMES, 2014). Os compostos envolvidos no metabolismo primário das plantas são macromoléculas que possuem uma distribuição universal e têm função fundamental para sua sobrevivência, como por exemplo, celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares, entre outras substâncias. Já os compostos envolvidos no metabolismo secundário, são moléculas de baixo peso molecular que não possuem uma distribuição universal nos vegetais, pois não são necessárias a todos eles (GOMES, 2014; SIMÕES, 2007). Tais compostos desempenham funções importantes (proteção, atração de polinizadores, adaptações ao estresse ambiental ou defesa química contra micro-organismos, insetos, herbívoros e outras plantas) desenvolvidas ao longo do período evolutivo. Entre estes metabólitos secundários, os principais grupos de

compostos encontrados com atividade biológica são os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (PEREIRA et al., 2008).

Óleos essenciais são misturas complexas de vários componentes químicos bioativos como terpenos, terpenóides, fenilpropenos e fenólicos. Estes componentes, que são responsáveis pela fragrância das plantas e por muitas de suas atividades biológicas, podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou glandulares. A designação de “óleo” é devida a algumas características físico-químicas como a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Sua principal característica é a volatilidade, diferenciando-os dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes. São caracterizados por possuírem dois ou três componentes majoritários, com concentração bastante elevada, quando comparados com os demais compostos presentes somente em traços (PRAKASH et al., 2015; VOON; BHAT; RUSUL, 2012).

Os óleos essenciais são extraídos de diversas plantas aromáticas que na maioria das vezes são cultivadas em países de clima temperado a quente. A produção desses óleos pode ser influenciada por diversos fatores ambientais (índice pluviométrico, temperatura, sazonalidade, tipo de solo, altitude e ciclo vegetativo da planta). Essa variação da produção e da composição química dos óleos essenciais também pode se modificar de acordo com alguns procedimentos, como secagem, época de colheita, tipo de adubação, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Conhecidos pelas propriedades antissépticas, além da sua fragrância, os óleos essenciais vêm sendo usados na produção de embalagens ativas, como analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, anestésicos tópicos e como antimicrobianos (BAKKALI et al., 2008).

O estudo da atividade *in vitro* de óleos essenciais e seus constituintes sobre bactérias deteriorantes e patogênicas tem sido realizado por diversos autores (OUSSALAH et al., 2007; LIOLIOS et al., 2009; AZERÊDO et al., 2012; SOUZA et al., 2013; LUZ et al., 2014; ABDOLLAHZADEH, 2014). Embora escassos, estudos têm sido realizados em matrizes alimentares, como salsichas (BUSATTA et al., 2008); alface e cenoura (SINGH et al., 2002); peixes (ABDOLLAHZADEH, 2014); presunto (GILL et al., 2002); carne (SOLOMAKOS et al., 2008); chocolates (KOTZEKIDOU et al., 2008); arroz (ULTEE et al., 2000) e frutas (ROLLER; SEEDHAR, 2002).

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais não são completamente compreendidos. A inibição do crescimento ou sobrevivência dos micro-organismos podem, em parte, ser

devido a sua hidrofobicidade, fato que permite sua passagem pela parede celular e membrana citoplasmática, destruindo a estrutura dos polissacarídeos, lipídios e fosfolipídios, provocando um dano à membrana, fator responsável, em parte, pela citotoxicidade que apresentam na célula alvo (BURT, 2004). Ainda, em decorrência da ação de óleos essenciais algumas moléculas lipofílicas podem se acumular na bicamada lipídica e distorcer a interação lipídio-proteína (BAKKALI et al., 2008). As células também poderiam alterar a permeabilidade da membrana, como um mecanismo de reação, para evitar a entrada de algumas moléculas. A ação dos óleos essenciais pode provocar vários eventos celulares destacando-se a sensibilização da dupla camada fosfolipídica, com perturbação na função e na composição da membrana plasmática, a inativação do mecanismo enzimático, a inibição do transporte de elétrons para produção de energia e da síntese de componentes celulares, assim como o extravasamento de material citoplasmático, lise e eventual morte celular (BURT, 2004).

Devido as suas propriedades antimicrobianas, os óleos essenciais são promissores para uso na conservação de alimentos (BOUHDID et al., 2010). Assim, diversos óleos essenciais e seus componentes têm sido aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em alimentos e bebidas (FDA, 2009). Dentre eles, destacam-se àqueles obtido do gênero *Thymus* L. (Labiatae), conhecidos popularmente como tomilho. *Thymus* L., que compreende cerca de 350 espécies de plantas herbáceas perenes e sub-arbustos, é predominantemente encontrado na região do Mediterrâneo, Ásia, Sul da Europa e Norte de África (MAKSIMOVIC et al., 2008).

Existem vários ecótipos de tomilho, que diferem nas suas características morfológicas e na composição do óleo essencial, embora todos sejam caracterizados por um forte odor penetrante e, por vezes, um sabor pronunciado balsâmico e picante (BALLESTER-COSTA et al., 2013; RUIZ-NAVAJAS et al., 2012). As espécies desse gênero possuem propriedades farmacológicas e aromáticas, sendo comumente utilizadas no setor de fitoterapia. Além disso, é utilizado como condimentos em vários alimentos e é um dos gêneros mais utilizados na medicina popular, devido a sua ação estimulante sobre todas as funções do organismo (VIUDA-MARTOS et al., 2011). Dentre as espécies encontradas no gênero *Thymus* estão *T. zygis*, *T. mastichina*, *T. capitatus*, *T. piperella*, *T. moroderi* e *T. vulgaris*. Estas espécies de tomilho são amplamente utilizadas na indústria de alimentos, com sabor e aroma bastante aceitos pelos consumidores (BALLESTER-COSTA et al., 2013; FORNARI et al., 2012; RUIZ-NAVAJAS, et al., 2012).

A procura do óleo essencial de espécies de *Thymus* é crescente (HAZZIT et al., 2009), estando entre os dez melhores do mundo, principalmente por também ser usado como conservante para fins alimentares, devido ao seu potencial antimicrobiano (EHIVET et al., 2011). Dentre eles, destaca-se àquele obtido da espécie *Thymus vulgaris* L., proveniente da Europa e cultivada no sul e sudeste do Brasil. *T. vulgaris* é um subarbusto perene, ereto, ramificado, aromático, de 20-30 cm de altura, com ramos levemente cobertos de pêlos brancos e de folhas simples, pequenas, de forma oval e de coloração verde escura (Figura 1) (ROCHA, 2013).

Figura 1 – Espécie vegetal *Thymus vulgaris* L.



Fonte: ROCHA (2013)

O óleo essencial de *Thymus vulgaris* (OETV) possui forte atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitário, espasmolítica e antioxidante decorrentes, principalmente, da presença dos isômeros timol e carvacrol (ROCHA, 2013; BAGAMBOULA et al., 2004), principais constituintes do OETV. Eles representam os monoterpenos com maior potência bactericida presente na composição de muitos óleos essenciais, devido à sua natureza fenólica (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNY, 2006). Esses dois componentes podem causar vários danos a célula microbiana, incluindo desintegração da membrana externa, alterações na permeabilidade da membrana celular,

diminuição do conteúdo de ATP intracelular, perda de variadas substâncias, tais como íons, ácidos nucleicos e aminoácidos, e depleção de proteínas envolvidas na divisão celular (DI PASQUA et al., 2010).

Estudos vêm demonstrando que o OETV é uma fonte de compostos antimicrobianos alternativos na inibição de diferentes micro-organismos de interesse em alimentos, como sumarizado no Quadro 1.

Quadro 1 – Estudos que demonstram o efeito inibitório do óleo essencial de *T. vulgaris* L. frente a diferentes micro-organismos.

| Micro-organismos alvo | Estudo |
|---|--------------------------------------|
| <i>Listeria monocytogenes; Escherichia coli.</i> | PROESTOS et al., 2005. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa; Staphylococcus aureus; Escherichia coli; Shigella sonnei.</i> | BONZIN et al., 2006. |
| <i>Salmonella enteritidis; Salmonella typhimurium; Escherichia coli; Shigella sonnei; Listeria monocytogenes; Staphylococcus aureus.</i> | ROTA et al., 2008. |
| <i>Aspergillus ochraceus; Penicillium expansum; Penicillium verrucosum.</i> | NGUEFACK et al., 2009. |
| <i>Bacillus cereus; Staphylococcus aureus; Escherichia coli.</i> | TOHIDPOUR et al., 2010. |
| <i>Bacillus subtilis; Staphylococcus aureus; Staphylococcus epidermidis; Escherichia coli; Pseudomonas aeruginosa.</i> | ALMAQTARI; ALGHALIBI; ALHAMZY, 2011. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa; Salmonella enteritidis.</i> | MILLEZI et al., 2012. |
| <i>Listeria innocua; Serratia marcescens; Pseudomonas fragi; Pseudomonas fluorescens; Aeromonas hydrophila; Shewanella putrefaciens; Achromobacter denitrificans; Enterobacter amnigenus; Enterobacter gergoviae; Alcaligenes faecalis.</i> | BALLESTER-COSTA et al., 2013 |
| <i>Staphylococcus aureus; Listeria monocytogenes; Pseudomonas aeruginosa.</i> | NEZHADALI et al., 2014. |
| <i>Aspergillus flavus</i> | KOHIYAMA et al., 2015 |

Tendo o conhecimento da eficácia antimicrobiana do OETV sobre o crescimento/desenvolvimento de micro-organismo patogênicos e deteriorantes, é possível prever sua eficácia como conservantes de alimentos. Porém, deve-se considerar os possíveis efeitos sobre micro-organismos benéficos, aqueles de interesse tecnológico, utilizados no processamento de produtos lácteos fermentados, a exemplo dos queijos. Tal preocupação se baseia no fato de que o OETV pode inibir esses micro-organismos benéficos, afetando a qualidade dos produtos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba; Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba; Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL) da Universidade Federal da Paraíba.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Óleo essencial de *Thymus vulgaris* L.

O óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (OETV) foi obtido da empresa nacional Ferquima Indústria e Comércio Ltda (Vagem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). Os dados relacionados ao óleo essencial, tais como nome, aparência, cor, odor, impurezas, densidade e índice de refração foram informados através de laudo técnico emitido pelo fornecedor (ANEXO A). As soluções do OETV foram preparadas em caldo infusão de cérebro e coração (CBHI, Himedia, Índia) e em caldo base-queijo, com concentrações variando de 40 a 0,312 µl/mL. Para a solubilização do OETV foi utilizado o tween 80 (1% v/v, Sigma-Aldrich, EUA) (MONTE et al., 2014).

3.1.2 Cepas bacterianas

A cultura láctea composta pelos micro-organismos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R-704, lote 3122631) foi obtido da Christian Hansen Brasil® (Valinhos, Minas Gerais, Brasil). As cepas de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 6538 foram obtidas da Coleção de Micro-organismos de Referência, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). As cepas estoque de todas as bactérias ensaiadas foram mantidas em criotubos a -80 °C.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L.

A identificação dos constituintes do OETV foi realizada por meio da utilização de Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu). Os compostos foram separados em uma coluna RTX capilar ®-5MS (30 m × 0,25

mm x 0,25 µm), de modo que a programação da temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi iniciada a 60 °C, seguida de uma rampa de 3 °C/minuto até atingir 240 °C, concluindo em tempo de corrida equivalente a 60 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e o gás hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 0,99 mL/minuto. O espectrômetro de massa foi operado por impacto de elétrons com uma temperatura da fonte de 200 °C, e com energia de ionização de 70V, variação de scan de m/z 40 a m/z 500.

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

3.2.2 Preparo do inóculo

A padronização do inóculo bacteriano foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Wiegand, Hilpert e Hancock (2008) e McMahon et al. (2008). Para tanto, as cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas em placas contendo ágar infusão de cérebro e coração (ABHI, Himedia, Índia) e incubadas *overnight* a 37 °C (18 – 24 h). Em seguida, uma única colônia foi cultivada em 5 mL de CBHI e cultivadas *overnight* a 37 °C com agitação (250 rpm). A massa celular obtida foi colhida por centrifugação (4500 g, 15 min, 4 ° C), lavada duas vezes em solução salina (NaCl 0,85% p/v) estéril e re-suspensa em CBHI estéril. As suspensões bacterianas obtidas foram submetidas a diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) em CBHI. A densidade óptica a 600 nm (DO600) da cultura bacteriana de cada diluição foi determinada em espectrofotômetro.

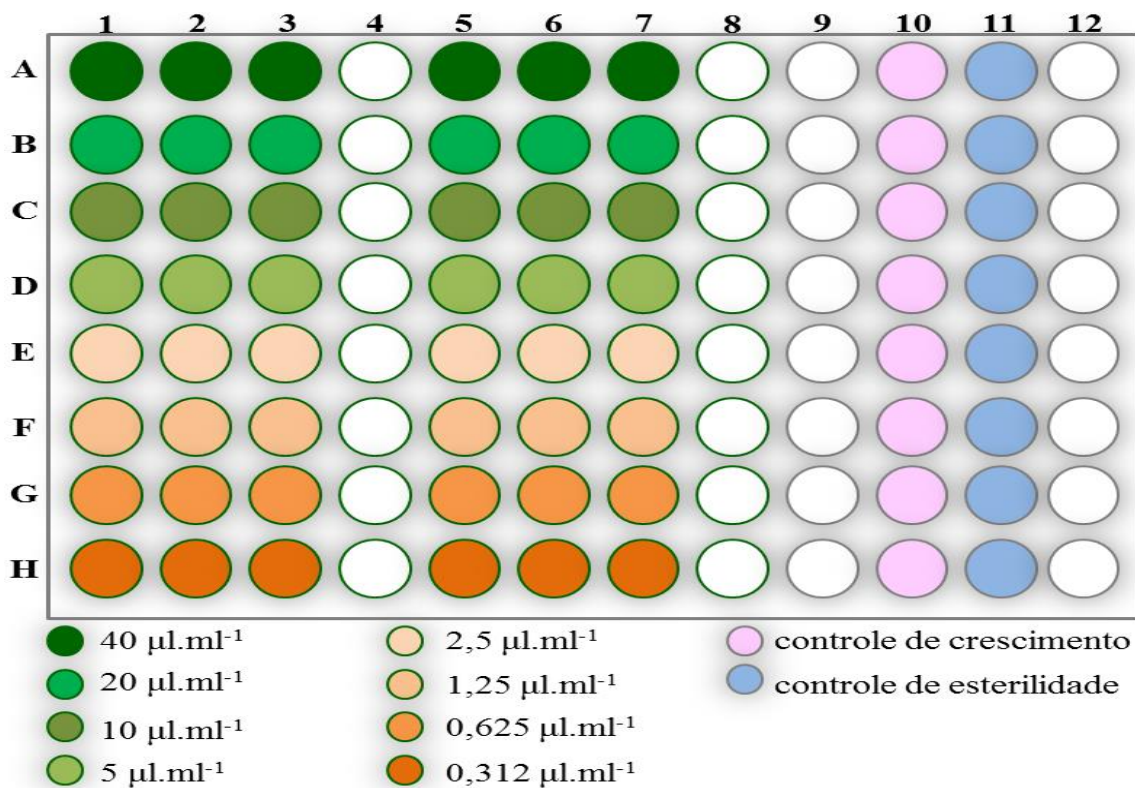
Para a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada diluição, um volume de 0,1 mL da suspensão de micro-organismos foi inoculado na superfície de placas de Petri contendo ABHI, e espalhado com auxílio de alça Drigalsky estéril. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e, em seguida, a contagem do número de células viáveis foi determinada e expressa em UFC/mL. Com o número de colônias obtido, sendo corrigido pela respectiva diluição, foi determinado o número de células contidas no tubo onde foi encontrado valor de DO600 de 0,1 para *S. aureus* e *L. monocytogenes*; e de 0,8 para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, ambos correspondendo a, aproximadamente, 8 log UFC/mL.

3.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima

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

Inicialmente, uma suspensão de células da cepa bacteriana testada contendo, aproximadamente, 8 log UFC/mL foi diluída (1:100) em solução salina (NaCl a 0,85% p/v) estéril, resultando em um inóculo de, aproximadamente, 6 log UFC/mL. Um volume de 50 µL do inóculo obtido foi adicionado a cada poço contendo 50 µL de CBHI adicionado de diferentes concentrações do OETV, variando de 40 a 0,312 µl/mL. Simultaneamente, foi preparado o controle de crescimento (positivo) e de esterilidade (negativo) (Figura 2). O sistema foi agitado e incubado a 37 °C por 24 horas, envolto com filme plástico para evitar a desidratação microbiana e garantir que não houvesse a volatilização do OETV. Após o período de incubação, foram adicionados 30 µL de resazurina (0,01%) (Inlab, Brasil), preparada em solução aquosa, em todos os poços. A microplaca foi reincubada a 37 °C por 20 minutos, quando então foi realizada a leitura visual (MONTE et al., 2014). A manutenção da cor azul nos poços foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano, enquanto o desenvolvimento de cor rosa ou incolor foi interpretada como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento das cepas, ou seja, a menor concentração do óleo essencial capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 2 - Esquema de organização da microplaca utilizada na determinação da Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. frente a cepas de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*.



A partir da determinação dos valores de CIM foram escolhidas as diferentes concentrações do OETV aplicadas nos ensaios de avaliação da viabilidade celular das cepas teste, quando inoculadas em caldo base-queijo e em amostras de queijo de coalho.

3.2.4 Amostras de queijo de coalho e obtenção do caldo base-queijo

O estudo do efeito do OETV sobre a viabilidade bacteriana foi realizado em caldo base-queijo, com o objetivo de simular as condições ambientais que o micro-organismo encontra na matriz alimentar, e em amostras de queijo de coalho. As amostras de queijo de coalho (duas unidades de 500 g, do mesmo lote, dentro do prazo de validade para consumo, produzidas por coagulação enzimática) utilizadas para a elaboração do caldo base-queijo e nos ensaios de viabilidade celular bacteriana foram adquiridos de um supermercado de varejo local, em João Pessoa (Brasil). A qualidade microbiológica do queijo de coalho utilizado no estudo foi avaliada seguindo os padrões sanitários estabelecidos pela Resolução RDC nº12 de 02/01/2001 (BRASIL, 2001), onde estabelece a pesquisa de Coliformes totais e termotolerantes (45 °C), *Staphylococcus* coagulase positiva (*S. aureus*), *Salmonella* spp. e *L.*

monocytogenes. As análises microbiológicas foram realizadas segundo metodologias descritas pela *American Public Health Association* (APHA, 2001), sendo que os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1. Os dados obtidos revelaram uma satisfatória qualidade sanitária do produto avaliado paralelo a não detecção das bactérias patogênicas avaliadas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) no estudo. Também foram realizadas contagens de *Lactococcus* spp., utilizando meio seletivo ágar M17 (Himedia, Índia), obtendo contagens de, aproximadamente, 3 log UFC/g de queijo.

Tabela 1 - Parâmetros microbiológicos do queijo de coalho utilizado como substrato para o crescimento das cepas teste.

| Coliformes totais (NMP/g) | Coliformes a 45 °C (NMP/g) | <i>Salmonella</i> spp./25g | <i>S. coagulase-positiva</i> (UFC/g) | <i>L. monocytogenes</i> /25g |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| 2.4 x 10 ² | < 3 | Ausência | < 1 x 10 ¹ | Ausência |

Para a obtenção do caldo base-queijo, 160 g de queijo de coalho, previamente macerado, foram adicionadas a 1000 mL de água destilada e homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro estéril durante 5 minutos. Em seguida, a mistura foi colocada em banho-maria termostatizado a 42 °C durante 50 minutos. Na sequência, a mistura foi submetida à filtração através da utilização de bomba a vácuo. O filtrado obtido (caldo base-queijo) foi esterilizado em autoclave (121 °C por 15 min a 121 Pa) e, por fim, armazenado em alíquotas de 50 mL a -20 °C (NEVIANI et al., 2009). Quando necessário, uma alíquota foi descongelada sob refrigeração (7 ± 1 °C) e utilizada para os ensaios. A caracterização físico-química (umidade, carboidratos, proteínas, lipídios e conteúdo mineral) do queijo de coalho utilizado na obtenção do caldo, assim como do caldo obtido foi realizada por meio da utilização de métodos padrão (AOAC, 2012). Os valores dos parâmetros avaliados na caracterização do queijo e do caldo base-queijo utilizados como substratos para o crescimento microbianos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos do queijo de coalho e do caldo base-queijo utilizado como substrato para o crescimento bacteriano.

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

3.2.5 Efeito do OETV sobre a viabilidade bacteriana em caldo base-queijo

O comportamento de cada cepa bacteriana foi observado em caldo base-queijo adicionado de diferentes concentrações (1,25 µL/mL, 2,5 µL/mL e 5 µL/mL) do OETV ao longo de 24 horas de exposição. Inicialmente, 150 µL da suspensão bacteriana (~8 log UFC/mL) foram inoculados em 2850 µL do caldo base-queijo estéril contendo o OETV nas concentrações finais desejadas. Os diferentes sistemas, com contagem final de células viáveis de, aproximadamente, 6 log UFC/mL, foram agitados durante 30 segundos e submetidos à incubação a 37 °C durante 24 h. Em intervalos de 0 (logo após a homogeneização do sistema), 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas após a incubação, uma alíquota de 100 µL de cada sistema foi diluída seriadamente em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v), e, em seguida, 20 µL de cada diluição foram inoculados, utilizando a técnica da microgota, em placas com ágar M17 (Himedia, Índia), para contagem de *Lactococcus* spp.; ágar Baird Parker (Himedia, Índia) suplementado com 50 mL/L de emulsão de gema de ovo contendo telurito de potássio (3,5%) (Himedia, Índia), para contagem de *S. aureus*; e ágar *Listeria* contendo suplemento seletivo *Listeria* II (Himedia, Índia), para contagem de *L. monocytogenes*. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 - 48 horas. Após o período de incubação, realizou-se a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Sistemas controle, sem a adição do OETV, foram ensaiados similarmente.

3.2.6 Efeito do OETV sobre a viabilidade bacteriana em queijo de coalho

O estudo do efeito do OETV sobre a viabilidade das bactérias teste quando inseridas no queijo de coalho, foi realizado através do método de contagem de células viáveis ao longo de 72 h de armazenamento (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001).

O comportamento das cepas microbianas quando inseridas no queijo de coalho frente a diferentes concentrações (1,25 µL/mL e 2,5 µL/mL) de OETV foi avaliado ao longo de 72 horas de armazenamento em temperatura de refrigeração. Quatro sistemas diferentes (denominados de 0 h, 24 h, 48 h e 72 h de exposição) contendo 20 g de queijo de coalho macerado, 10 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v) estéril, 1 mL de suspensão bacteriana (~8 log UFC/mL) e OETV nas concentrações finais desejadas foram preparados e homogeneizados durante 30 segundos. Outros sistemas foram preparados sem adição de OETV (sistemas de controle). Os sistemas (com contagem final de células viáveis de,

aproximadamente, 6 log UFC/mL) foram incubados a 10 °C (temperatura de armazenamento do queijo de coalho). Em cada tempo de exposição pré-estabelecido, 70 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v) estéril foram adicionados aos sistemas e homogeneizados. Em seguida, diluições em série (10^{-1} a 10^{-5}) foram realizadas em solução salina estéril, e 20 µL de cada diluição foram dispensados em placas com com ágar M17 (Himedia, Índia), para contagem de *Lactococcus spp.*; ágar Baird Parker (Himedia, Índia) suplementado com 50 mL/L de emulsão de gema de ovo contendo telurito de potássio (3,5%) (Himedia, Índia), para contagem de *S. aureus*; e ágar *Listeria* contendo suplemento seletico *Listeria* II (Himedia, Índia) para contagem de *L. monocytogenes*, utilizando a técnica da microgota. Os sistemas controle, sem a adição de OETV, foram ensaiados de forma semelhante. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 - 48 h. Os resultados foram expressos como log UFC/g.

3.2.7 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (repetições), sendo os resultados expressos como médias dos ensaios. Para os ensaios de determinação da CIM, os resultados foram expressos como valores modal, porque os valores de CIM foram os mesmos em todas as repetições (McMAHON et al., 2008). Nos ensaios de viabilidade celular, a análise estatística foi realizada para determinar as diferenças significativas ($p < 0,05$) utilizando ANOVA seguido pelo teste post hoc. de Tukey. O software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia) foi utilizado para a execução da análise estatística dos dados.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 177-183, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>. Acesso em 25 de agosto de 2014.
- AL.MAQTARI, M. A. A.; ALGHALIBI, S. M.; ALHAMZY, E. H. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus vulgaris* from Yeme. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 342-349, 2011.
- ALABOUDI, A. R.; JARADAT, Z. W.; SHATNAWI, M. M. Biotypes and enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from camel's meat in Jordan. **British Microbiology Research Journal**, v. 2, n. 1, p. 23-25, 2012.
- ÁLVAREZ-ORDÓNEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; BERNARDO, A.; LÓPEZ, M. A comparative study of thermal and acid inactivation kinetics in fruit juices of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Senftenberg grown at acidic conditions. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 9, p. 1147-1155, 2009.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 2001. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA. 676 p.
- AOAC. 2012. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist** (18th eds.). Washington. DC USA.
- AQUINO, F. T. M. **Produção de queijo de coalho no Estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento**. 1983. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1983.
- ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.
- AYCICEK, H.; CAKIROGLU, S.; STEVENSON, T. H. Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. **Food Control**, v. 16, n. 6, p. 531-534, 2005.
- AZERÊDO, G. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; STAMFORD, T. L. M.; SOUZA, E. L. The cytotoxic effect of essential oils from *Origanum vulgare* L. and/or *Rosmarinus officinalis* L. on *Aeromonas hydrophila*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 4, p. 293-297, 2012.
- BAGAMBOULA, C. F.; UYTTENDAELE, 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**, v. 21, n. 1, p.33-42, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALLESTER-COSTA, C.; SENDRA, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. **Industrial Crops and Products**, v. 50, n.1, p. 304-311, 2013.

BANERJEE, M.; SARKAR, P. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic micro-organisms from spices. **Food Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 335-342, 2004.

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

BENNETT, R. W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 6, p. 1264-1270, 2005.

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

BONZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SIMIN, N.; ANACKOV, G. Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 1822-1828, 2006.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de Coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – Boletim do CEPPA**, v. 21, n. 1, p. 31- 40, 2003.

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

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 393-408, 2003.

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

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

BRASIL. Portaria nº_352 de 1997 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 1997. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2194>>. Acesso em 21 novembro 2014.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRUNO, L. M.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; CARVALHO, J. D. G.; ANDRADE, A. A. Avaliação microbiológica de queijos de coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 217-220, 2005.

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

BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSIA, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R. A.; CORAZZA, F. C.; CORAZZA, M. L.; VLADIMIR, J.; OLIVEIRA, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, n.1, p. 207-211, 2008.

CARFORA, V.; CAPRIOLI, S.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicilin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **International Dairy Journal**, v. 42, n. 1, p. 12-15, 2015.

CASALTA, E.; MONTEL, M. C. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 271-273, 2008.

CAVALCANTE, J. F. M.; SILVA, R. F. N.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; CECON, P. R. Queijo Coalho produzido com “pool” de culturas lácticas isoladas de leite cru da região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p. 211-214, 2004.

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

CURI, R. A.; BONASSI, I. A. Elaboração de um queijo análogo ao pecorino romano produzido com leite de cabra e coalhada congelados. **Ciência e agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 171-176, 2007.

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

EHIVET, F. E.; MIN, B.; PARK, M. K.; OH, J. H. Characterization and antimicrobial activity of sweet potato starch-based edible film containing origanum (*Thymus capitatus*) oil. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 178–184, 2011.

FACCIOLI, P.Y. **Detecção molecular de *Staphylococcus aureus* e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração e sob temperatura ambiente**. 2010. 132 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2010.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Antimicrobial resistance: a growing threat, 2009**. Disponível em < www.fda.gov > Acesso dia 15 de dezembro de 2014.

FORNARI, T.; RUIZ-RODRIGUEZ, A.; VICENTE, G.; VÁRQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. Kinetic study of the supercritical CO₂ extraction of different plants from *Lamiaceae* family. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 64, n.1, p.1-8, 2012.

FORSYTHE, S. J. **The Microbiology of Safe Food**. 2nd. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. 496 p.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. Listeria: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 1-15, 2007.

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

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

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, M. S. **Atividades biológicas dos óleos essenciais de três espécies do gênero *Citrus* e de seus componentes majoritários**. 2014, 126 f. Tese (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2014.

- HAMADI, F.; ASSEME, F.; ELABED, S.; BENSOUDA, S.; MABROUKI, M.; LATRACHE, H. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. **Food Control**, v. 38, n. 4, p. 104-108, 2014.
- HAZZIT, M.; BAALIOUAMER, A.; VERISSIMO, A. R.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 714–721, 2009.
- HELLAL, A.; AMROUCHE, L.; FERHAT, Z.; LARABA, F. Characterization of bacteriocin from *Lactococcus* isolated from traditional Algerian dairy products. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 177-185, 2012.
- HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121-129, 2001.
- HOLLEY, R.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273-292, 2005.
- HUMMERJOHANN, J.; NASKOVA, J.; BAUMGARTNER, A.; GRABER, H. U. Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1305-1312, 2014.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. 2005. **Modern food microbiology**. 7th ed. New York (NY): Springer.
- JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Révue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties**, v. 25, n. 2, p. 571-580, 2006.
- KADIROĞLU, P.; KOREL, F.; CEYLAN, C. Quantification of *Staphylococcus aureus* in white cheese by the improved DNA extraction strategy combined with TaqMan and LNA probe-based Qpcr. **Journal of Microbiological Methods**, v. 105, n.1, p. 92-97, 2014.
- KOHIYAMA, C. Y.; RIBEIRO, M. M. Y.; MOSSINI, S. A. G.; BANDO, E.; BOMFIM, N. S.; NERILO, S. B.; ROCHA, G. H. O.; GRESPLAN, R.; MIKCHA, J. M. G.; MACHINSKI, M. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v. 173, n. 15, p. 1006-1010, 2015.
- KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATSI, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and the fate of inoculated pathogens in chocolate. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 119-127, 2008.
- LAGUNA, L. E.; LANDIM, F. G. S. **Iniciando um Pequeno Grande Negócio Agroindustrial de Leite de Cabra e Derivados**. Embrapa Caprinos, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. – Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.
- LEITE, B. M. **Aspectos epidemiológicos e econômicos da certificação de propriedades leiteiras como livres de brucelose e tuberculose bovina**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado

em Saúde Animal). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

LI, X.; SHI, X.; WANG, M.; DU, Y. Xylan chitosan conjugate – A potential food preservation. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 520-525, 2011.

LIOLIOS, C. C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINO, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food chemistry**, v. 112, n. 1, p. 77-83, 2009.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, a important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 645–659, 2006.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO, B. Lactic acid isolates from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.

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

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

MAKSIMOVIC, Z.; STOJANOVIC, D.; SOSTARIC, I.; DAJIC, Z.; RISTIC M. Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 11, p. 2036–2041, 2008.

MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D. J. SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 175-178, 2010.

MARTÍN, B.; PERICH, A.; GÓMEZ, D.; YANGÜELA, J.; RODRÍGUEZ, A.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. **Food Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 119-127, 2014.

McLAUHLIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 15-33, 2004.

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

MELO, J.; ANDREW, P. W.; FALEIRO, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. **Food research International**, v. 67, n. 1, p. 75-90, 2015.

MILLEZI, A. F., CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICCOLI, R. B. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 167-172, 2012.

MIRANDA, J. M.; MONDRAGÓN, A.; VÁZQUEZA, C. A.; FENTE, A.; CEPEDA, A.; FRANCO, C. M. Microbiological quality and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from conventional and organic “Arzúa-Ulloa” cheese. **CyTA - Journal Food**, v. 7, n. 2, p. 103-110, 2009.

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

MONTVILLE, T. J.; MATTHEWS, K. R. **Food Microbiology**: Na Introduction. 2 ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2008. 428 p.

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

NEZHADALI, A.; NABAVI, M. RAJABIAN, M.; AKBARPOUR, M.; POURALI, P.; AMINI, F. Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and *in vitro* antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2014.

NGUEFACK, J.; DONGMO, J. B.; DAKOLE, C. D.; LETH, V.; VISMER, H. F.; TORP, J.; GUEMDJOM, E. F. N.; MBEFFO, M.; TAMGUE, O.; FOTIO, D.; AMVAM ZOLLO, P. H.; NKENGFACK, A. E. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 2, p. 151-156, 2009.

NIGHTINGALE, K. K.; WINDHAM, K.; WIEDMANN, M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5537-5551, 2005.

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

OLIVEIRA, M. M. M. **Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica**. 2011. 138 f. (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

OUSSALAH, M.; CAILIET, 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**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Queijos**. In: Tecnologia de Alimentos. Alimentos de origem animal. v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 85-103.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R. MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2008.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PODKOWIK, M.; BYSTRON, J.; BANIA, J. Prevalence of antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from ready-to-eat meat products. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 2, p. 233-237, 2012.

PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. **Food Control**, v. 47, n.1, p. 381-391, 2015.

PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G. J. E.; KOMAITIS, M. RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1190-1195, 2005.

PUSHKALA, R.; PARVATHY, K. R.; SRIVIDYA, N. Chitosan powder coating, a novel simple technique for enhancement of shelf quality of carrot chreds stored in macro perforated LDPE packs. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 16, n. 1, p. 11-20, 2012.

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

QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2005. 512 p.

RAMOS, M.; JIMÉNEZ, A.; PELTZER, M.; GARRIGÓS, M. C. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 513-519, 2012.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. **Annual Review of Entomology**, v. 57, n. 1, p. 405-424, 2012.

ROCHA, B. C. A. **Extração e caracterização do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

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

ROLLER, S.; SEEDHAR, P. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwi fruit at 4°C and 8°C. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 390-394, 2002.

ROTA, M. C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19, n. 7, p. 681-687, 2008.

RUIZ-NAVAJAS, Y.; VIUDA-MARTOS, M.; SENDRA, E.; PEREZ-ALVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. Chemical characterization and antibacterial activity of *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oils, two *Thymus* endemic species from southeast of Spain. **Food Control**, v. 27, n. 2, p. 294-299, 2012.

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

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

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. Da UFRGS, 2007. 1104 p.

SINGH, N.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; STROSHINE, L. 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**, v. 35, n. 8, p. 720-729, 2002.

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

SOLOMAKOS, N.; GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; BOTSOGLOU, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 80, n. 2, p. 159-166, 2008.

SOUSA, S.; LIMA, A. W. O.; SOUSA, C. P. **Isolamento de espécies de *Listeria* em queijo de massa crua tipo coalho comercializada na cidade de João Pessoa – PB.** In: Anais do 17º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000. Fortaleza: SBCTA, 2000. p. 4.145.

SOUZA, E. L. ; LIMA, E. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUSA, C. P. Inhibition action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 2, n. 2, p. 245-250, 2005.

SOUZA, E. L.; AZERÊDO, G. A.; SOUSA, J. P.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; STAMFORD, T. L. M. Cytotoxic Effects of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils Alone and Combined at Sublethal Amounts on *Pseudomonas fluorescens* in a Vegetable Broth. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 2, p. 163-171, 2013.

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

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n.1, p.1236-1243, 2007.

TOHIDPOUR, A.; SATTARI, M.; OMIDBAIGI, R.; YADEGAR, A.; NAZEMI, J. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 142-145, 2010.

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

ULTEE, A.; SLUMP, R. A.; STEGING, G.; SMID, E. J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 5, p. 620-624, 2000.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Spices as functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 13-28, 2011.

VOON, C. H.; BHAT, R.; RUSUL, G. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 1, p. 34–55, 2012.

WALLIN-CARLQUIST, N.; MÁRTA, D.; BORCH, E. RADSTROM, P. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1, p. S69-S74, 2010.

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

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E.; POKORNY, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **Europeans Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 9, p. 776-793, 2006.

ZELNY, R.; EMTEBORG, H.; CHAROUD-GOT, J.; SCHIMMEL, H.; NIA, Y.; MUTEL, I. OSTYN, A.; HERBIN, S.; HENNEKINNE, J. A. Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: Feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. **Food Chemistry**, v. 168, n. 1, p. 241-246, 2015.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO: Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in *coalho* cheese-mimicking models

Artigo submetido a Food Microbiology (Fator de Impacto 3,374)

Dear Dr. de Souza,

Thank you for sending your manuscript Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in *coalho* cheese-mimicking models for consideration to Food Microbiology. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for Food Microbiology to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can be viewed here: http://journalinsights.elsevier.com/journals/0740-0020/review_speed

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Food Microbiology, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".
3. Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".
3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/FM>

Many thanks again for your interest in Food Microbiology.

Kind regards,

Dr.Mary-Lou Tortorello

Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in *coalho* cheese-mimicking models

Running title: Antibacterial effects of thyme on cheese

Rayssa Julliane de Carvalho¹, Geanny Targino de Souza², Vanessa Gonçalves Honório², Jossana Pereira de Sousa¹, Marciane Maganani², Evandro Leite de Souza^{1*}

¹ *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

² *Laboratory of Microbial Process in Microbiology, Department of Food Engineering, Center of Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

* Author for correspondence: Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

E-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Tel: + 55 83 3216 7807; Fax: + 55 83 3216 7094

Abstract

In the present study, we assessed the effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil (TVEO) on *S. aureus* and *L. monocytogenes*, pathogenic bacteria frequently associated with fresh or low-ripened cheeses (e.g., Brazilian *coalho* cheese), and on a starter co-culture comprising *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*, which are used for the production of *coalho* cheese. To measure these effects, we determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and assessed bacterial cell viability in cheese-based broth (37 °C) and in a semi-solid cheese model (10 °C). The MIC value for TVEO was 2.5 µL/mL against *S. aureus* and *L. monocytogenes*, while the MIC was 1.25 µL/mL against the starter co-culture. The TVEO (5 and 2.5 µL/mL) sharply reduced the viable counts of all assayed bacteria in cheese broth over 24 h; although, at 5 µL/mL, TVEO more severely affected the viability of the starter co-culture compared with pathogenic bacteria. The addition of 1.25 µL/g of TVEO in the semi-solid cheese model did not reduce the viable counts of all assayed bacteria. At 2.5 µL/g, TVEO slightly decreased the viable counts of *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *Lactococcus* spp. in the semi-solid cheese model over 72 h. The final counts of *Lactococcus* spp. in a semi-solid cheese model containing 2.5 µL/mL TVEO were lower than those of pathogenic bacteria under the same conditions. These results suggest that the doses of TVEO used to control pathogenic bacteria in fermented dairy products should be cautiously considered for potential negative effects on the growth and survival of starter cultures.

Keywords: *Thymus*, antimicrobial activity, pathogenic bacteria, technological culture, low-ripened cheese.

1. Introduction

Coalho is a semi-hard, medium- to high-moisture cheese of the northeast region of Brazil (Queiroga et al., 2013) primarily produced from raw or pasteurized cow milk (Oliveira et al. 2012). This cheese possesses high yield and good acceptance among consumers (Garcia et al., 2012) and is produced through simple technology following milk coagulation using rennet or proper coagulating enzymes, which are occasionally complemented with selected lactic acid bacteria (starter culture) (Brasil, 1997).

Lactococcus species are the major lactic acid bacteria responsible for the acidification of milk during the production of cheeses (López-Díaz et al., 2000). Among the five known *Lactococcus* species, the only bacteria that significantly contribute to the production of cheeses is *L. lactis* (Teuber, 1995), and *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* are the most important bacteria for this technological use (Fox et al., 2000). Milk acidification through *Lactococcus* also contributes to the development of improved sensory properties (i.e., taste, flavor and texture) in cheeses (Mills et al., 2010). Moreover, the presence of *Lactococcus* in cheeses has been associated with the increased microbial stability of the products during storage, producing substances (e.g., organic acids, bacteriocins, fat and amino-acid metabolites) for the inhibition of spoilage and pathogenic microorganisms (Coelho et al., 2014).

Cheese is considered a vehicle for foodborne pathogens, in particular, handmade fresh cheeses primarily produced from raw milk. However, this contamination can also occur in cheese produced with pasteurized milk, reflecting post-pasteurization contamination (Brooks et al., 2012; Quero et al., 2014). The microbial contamination of this product is relevant for industry due to economic losses and for public health due to the risk of transmitting potentially pathogenic microorganisms to consumers (Gandhi and Chikindas, 2007). *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* are involved in many foodborne outbreaks, and

these bacteria are considered dangerous threats to the safety of fresh and low-ripened cheeses (Pimentel-Filho et al., 2014). Unripened or low-ripened cheeses infected with *L. monocytogenes* have been associated with major outbreaks of listeriosis worldwide (Coelho et al., 2014). According to reports, 345 foodborne outbreaks in 2011 in Europe were caused by staphylococcal enterotoxins, primarily involving the consumption of cheeses, eggs and mixed foods (Zeleny et al., 2015).

Considering the potential of fresh or low-ripened cheeses to harbor pathogenic bacteria, particularly *L. monocytogenes* and *S. aureus*, and the potential impact of these bacteria on food safety, the development of new and effective compounds or procedures for controlling pathogenic bacteria in these products has received much attention from research and industry. The antimicrobial activity of essential oils (EOs) and compounds found therein is promising for the use of these substances on food conservation systems (Bouhdid et al., 2010), such as those used in dairy products (Asensio et al., 2015; Olmedo et al., 2013). Many EOs and their individual constituents are considered Generally Recognized as Safe (GRAS) at doses typically used in foods (Burt, 2004; Sousa et al., 2012) and have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for use in foods and drinks (FDA, 2009). The essential oil from *Thymus vulgaris* L. (TVEO) has been considered as candidate for use in foods. The efficacy of TVEO in inhibiting a range of pathogenic and/or spoiling food-related bacteria in *in vitro* systems has previously been reported (Ballester-Costa et al., 2013; Kohiyama et al., 2015; Nezhadali et al., 2014). However, studies verifying the inhibitory effects of TVEO against food-related bacteria in food-mimicking systems or even in food matrices are lacking. Moreover, information concerning the effect of TVEO toward starter bacteria commonly used in cheese production remains scarce or nonexistent.

Although the capability of this compound to inhibit the growth and survival of pathogenic and/or spoiling microorganisms must be deeply considered to develop an

innovative food conservation system, the potential inhibitory effects of this compound on beneficial bacterial commonly applied or existing in foods, including those used for technological purposes in fermented products (e.g., mesophilic starter lactic acid bacteria), must also be reconciled. This consideration reflects the fact that the inhibition of technologically beneficial bacteria in foods using an antimicrobial compound could result in unsatisfactory processing or even changes in the desired characteristics of the obtained products. There are only a few reports concerning the effects of spices and/or EOs on starter cultures (e.g., lactic acid bacteria) (Janssen et al., 1987; Kivanç et al., 1991; Shelef, 1983).

Thus, in the present study, we assessed the effects of TVEO toward the pathogenic bacteria *S. aureus* and *L. monocytogenes* and a mesophilic starter co-culture comprising *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*, which are used in the production of *coalho* cheese (Brasil, 1997). These effects were measured (and compared) through the determination of the minimum inhibitory concentration and the assessment of the bacterial cell viability over time in a cheese-based broth and a semi-solid cheese model.

2. Materials and methods

2.1. Essential oil

TVEO (batch 178; density at 20 °C, 0.918; refractive index at 20 °C, 1.501, extracted through steam distillation) was purchased from Ferquima Ind. Com. Ltd. (São Paulo, Brazil). The TVEO solutions were prepared in brain heart infusion broth – BHI (Himedia, India) at a range of concentrations (80 – 0.312 µL/mL) using Tween 80 (1%, v/v; Sigma–Aldrich, USA) as an emulsifier (Monte et al., 2014). At the highest assayed concentration (1%, v/v), Tween 80 presented no inhibitory effect against the assayed bacterial strains.

2.2. Microorganisms and growth conditions

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

Inocula of the pathogenic bacteria strains or the starter co-culture used in antimicrobial testing were obtained after preparing suspensions in sterile saline solution (0.85% NaCl p/v), from overnight cultures grown in BHI agar at 37 °C. Each strain or the starter co-culture was grown in BHI broth at 37 °C for 18 – 20 h (late exponential growth phase), harvested through centrifugation (4500 g, 15 min, 4 °C), washed twice in sterile saline solution and re-suspended in BHI broth to obtain standard cell suspensions at which the OD reading at 660 nm (OD₆₆₀) was 0.1 and 0.8 to provide viable cell counts of approximately 8 log CFU/mL for pathogenic strains and starter co-cultures, respectively (McMahon et al., 2008; Wiegand et al., 2008).

2.3. The identification of TVEO constituents

The constituents in TVEO were identified through gas chromatography coupled to mass spectrometry – GC-MS (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu). Analysis through GC-MS was performed under the following conditions: a RTX-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm x 0.25 µm); program temperature: 60–240 °C (3 °C/min); injector temperature: 250 °C; detector temperature: 220 °C; carrier gas: helium adjusted to 0.99 mL/min speed; ionizing energy: 70 eV; and mass range (m/z): 40-500. The spectra bank of GC/MS, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database (Version 1.7) was used to identify the individual essential oil

constituents. The quantification of the constituents was obtained after normalizing the areas of each detected constituent, expressed as a percentage area (%).

2.4. Cheese samples and preparation of cheese-based broth

The effects of TVEO on bacterial cell viability were examined using a *coalho* cheese-based broth and a semi-solid *coalho* cheese model to simulate the environmental conditions of the microorganisms in the studied food matrix. The *coalho* cheese samples (two units of 500 g from the same batch, produced using only enzymatic coagulation with chymosin, without the addition of mesophilic lactic acid culture) used to prepare the cheese-broth and assays using the semi-solid cheese model were purchased from a local retail supermarket in João Pessoa (Brazil). The cheese samples were assessed for hygienic-sanitary conditions according to the current sanitary standards of the Brazilian legislation (Brasil, 2001), which establishes the limits of total and thermotolerant coliforms (45 °C), coagulase-positive *Staphylococcus* (*S. aureus*), *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. Moreover, the counts of *Lactococcus* spp. in these cheese samples were monitored. The microbiological analyses were performed according to the standard methods described elsewhere (APHA, 2001), and the obtained data showed a satisfactory sanitary quality for the cheeses samples according to the established criteria, highlighting the absence of *L. monocytogenes* and *S. aureus*. The viable *Lactococcus* spp. counts in the cheese samples were consistently near 3 log CFU/mL.

To obtain the cheese-based broth, 160 g of *coalho* cheese (previously macerated) was added to 1000 mL of sterile distilled water and hand-mixed using a sterile glass stem for 5 min to ensure even homogenization. Subsequently, the mixture was placed in a thermostatic water bath (42 °C, 50 min) and vacuum-filtered using Whatman no. 1 filter paper. The obtained filtrate was sterilized through autoclaving (121 °C, 1.1 atm, for 15 min) (Neviani et

al., 2009). The filtered broth was stored in 50-mL aliquots at -20 °C, and when required, an aliquot was thawed under refrigeration (7 ± 1 °C) and used for subsequent assays.

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

2.5. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of TVEO

A microtiter plate assay was used to determine the MIC of TVEO according to the standard method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), with minor modifications (CLSI, 2006; Wiegand et al., 2008). Approximately 50 μ L of TVEO solution (40 – 0.312 μ L/mL) was dispensed into each well of a 96-well microplate. Subsequently, 50 μ L of bacterial suspension (6 log CFU/mL) were added to each well. The microplate was loosely wrapped with cling wrap to prevent bacterial dehydration and TVEO volatilization. Each plate included controls without TVEO. The system was incubated at 37 °C for 24 h. Subsequently, a 30- μ L aliquot of resazurin (0.01 g/100 L, w/v) (Inlab, Brazil), prepared in aqueous solution, was added to each well. The color changes were visually assessed after 20 min at 37 °C. Bacterial growth was indicated as color changes from purple to pink (or colorless). The MIC values were confirmed as the lowest concentrations capable of inhibiting bacterial growth.

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

The effects of different TVEO concentrations (1.25, 2.5 and 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) on the cell viability of each tested bacterial suspension (each pathogenic bacterium or starter co-culture) when inoculated in *coalho* cheese-broth were assessed over 24 h using the viable cell count method. Initially, 150 μL of the tested bacterial suspension (approximately 8 log CFU/mL) was inoculated into 2850 μL of separated cheese-broth samples containing TVEO at the desired final concentrations. The different systems (final viable cell counts of approximately 6 log CFU/mL) were gently hand-shaken for 30 s, and subsequently incubated at 37 °C for 24 h. At intervals of 0 (just after homogenization), 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h of post-incubation (exposure time), an aliquot of 100 μL of each system was serially diluted in sterile saline solution, and subsequently 20 μL of each dilution was added to M17 agar base (Himedia, India) to count viable *Lactococcus* spp., Baird Parker agar (Himedia, India) supplemented with 50 mL/L of egg yolk emulsion containing potassium tellurite (3.5%) (Himedia, India) to count *S. aureus* and *Listeria* Agar Base containing selective supplement for *Listeria* II (Himedia, India) to count *L. monocytogenes*, using a microdrop inoculation technique (Herigstad et al., 2001). Control systems without the addition of TVEO were similarly assayed. The plates were incubated at 37 °C for 24 - 48 h. Plates inoculated with aliquots collected from broth containing TVEO were incubated for an additional 24 h at an adequate temperature compared with samples collected from control assays. The results are expressed as log CFU/mL.

2.7. Effects of TVEO on bacterial cell viability in semi-solid cheese-model

The effects of different TVEO concentrations (2.5 and 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) on the cell viability of each tested bacterial suspension (each pathogenic bacterium or starter co-culture) inoculated in *coalho* cheese samples were assessed over 72 h using the viable cell count procedure. Four different systems (0, 24, 48 and 72 h of exposure) containing 20 g of

macerated *coalho* cheese (taken from the same macerate cheese pool), 10 mL of sterile saline solution, 1 mL of the tested bacterial suspension (approximately 8 log CFU/mL) and the desired final concentration of TVEO were prepared and mixed using a sterile glass stem for 5 min to ensure even homogenization (final viable cell counts of approximately 6 log CFU/mL). The systems were incubated at 10 °C (proper storage temperature of *coalho* cheese). At each pre-established exposure time, 70 mL of sterile saline solution were added to the corresponding system (0 h - just after homogenization of the system, 24, 48 or 72 h), homogenized and serially diluted (10^{-1} – 10^{-5}) in sterile saline solution. Subsequently, 20- μ L aliquots of each dilution were dispensed onto M17 agar base (Himedia, India) to count viable *Lactococcus* spp., Baird Parker agar (Himedia, India) supplemented with 50 mL/L of the egg yolk emulsion containing potassium tellurite (3.5%) (Himedia, India) to count viable *S. aureus* and *Listeria* Agar Base containing selective supplement for *Listeria* II (Himedia, India) to count viable *L. monocytogenes*, using the microdrop inoculation technique (Herigstad et al., 2001). Control systems without the addition of TVEO were similarly assayed. The plates were incubated at 37 °C for 24 - 48 h. Plates inoculated with aliquots collected from cheese-models containing TVEO were incubated an additional 24 h longer at adequate temperature compared with samples collected from control assays. The results are expressed as log CFU/g.

2.8. Statistical analysis

All assays were performed in three independent experiments in triplicate, and the results are expressed as an average of the assays. For MIC determination assays, the results are expressed as modal values because the MIC values were the same in all repetitions (McMahon et al., 2008). For the viable cell counts assays, statistical analysis was performed to determine significant differences ($p \leq 0.05$) using ANOVA, followed by post-hoc Tukey's

test. Sigma Stat 3.5 computer software (Jandel Scientific Software, San Jose, California) was used for the statistical analysis of the data.

3. Results and Discussion

The GC–MS analysis of TVEO identified 24 different constituents (Table 1). The constituents detected at the highest amounts in TVEO were thymol (43.19%), *p*-cymene (28.55%), γ -terpinene (6.36%), linalool (5.57%) and carvacrol (3.14%). Other constituents, such as α -pinene (2.60%), myrcene (1.4%), eucalyptol (1.29%), camphor (1.72%) and caryophyllene oxide (1.43%), were detected in minor amounts. A variety of other constituents were detected in amounts lower than 1%. These findings are similar to the results of Al.Maqtari et al. (2011), who examined the same essential oil. However, previous studies have also demonstrated great variation in the amounts of compounds often detected as major constituents in samples of TVEO, such as 17.4–71% thymol; 10–56% *p*-cymene, 2.6–85.5% limonene and 12.1–24.5% carvacrol (Burt, 2004; Omidbeygi et al., 2007; Razzaghi-Abyaneh et al., 2008; Sacchetti et al., 2005). The variability in composition among different EO samples obtained from the same vegetal species might reflect differences in the raw materials (dried or fresh) used for extraction, variable ecological and geographical conditions, the age of the plant, harvesting time and methods used for extraction (Kohiyama et al., 2015). These variations in the chemical profile of OEs might influence the antibacterial activity spectrum and intensity (e.g., MIC values and decrease in bacterial cell population) of these substances.

The MIC value obtained for TVEO against both *S. aureus* and *L. monocytogenes* was 2.5 μ L/mL, while the MIC against the mesophilic starter co-culture comprising *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* was 1.25 μ L/mL. Regarding the observed MIC values, the assayed mesophilic starter culture presented higher sensitivity to TVEO compared with both *L. monocytogenes* and *S. aureus*. The MIC of TVEO toward the starter co-culture

was one-fold lower than the MIC toward the assayed pathogenic bacteria. Initially, the higher sensitivity of the bacteria comprising the tested starter co-culture was cautiously considered because there is a well-accepted intrinsic two-fold variability in the results achieved for MIC assays, determined through dilution in media (Smith et al., 2007). The MIC values of TVEO against *L. monocytogenes* and *S. aureus* obtained in the present study were similar to the findings of previous studies of the same essential oil and target bacteria (Al.Maqtari et al., 2011; Nezhadali et al., 2014; Tohidpour et al., 2010); however, to the best of our knowledge, there are no studies determining the MIC values of TVEO against lactic acid bacteria.

Some authors have associated the strong antimicrobial activity of TVEO (regarding the low MIC values often detected) with the particular profile of major constituents in this substance (Carović-Stanko et al., 2010). The activity rank of the EOs individual constituents possessing the highest antimicrobial properties is phenols > aldehydes > ketones > alcohols > ethers > hydrocarbons (Ballester-Costa et al., 2013). This classification supports the low MIC values, i.e., effective antibacterial activity (Van Vuuren, 2008), observed for the TVEO examined in the present study because thymol (monoterpene possessing a phenolic ring) was a major constituent. The primary site of the toxic action of EOs in bacterial cells is the cytoplasmic membrane, and this action has been associated with the hydrophobicity of the individual constituents of EOs, facilitating the partitioning of these constituents into the bacterial lipid bilayer, thereby disturbing the bacterial structure and increasing permeability to protons, ions and other cell constituents. Particularly, thymol (major constituent of TVEO) damages the bacterial cytoplasmic membrane, resulting in the collapse of the proton motive force, depletion of the ATP pool and eventual cell death (Ballester-Costa et al., 2013; Nowak et al., 2012).

Considering that most of the available studies have considered the inhibitory effects of EOs toward pathogenic microorganisms to determine potential doses to use as antimicrobials

in foods, the MIC value of TVEO against the assayed pathogenic bacteria was selected as a major parameter for the selection of the different TVEO concentrations used in assays of bacterial survival (cell viability) in cheese-based broth over time (at 37 °C). Thus, the assays to observe the effects of TVEO on bacterial cell viability were performed using cheese-based broth containing 1.25 (1/2 x MIC), 2.5 (MIC) or 5 µL/mL (2 x MIC) TVEO (Fig. 1 A-C). Observing the microbial behavior in food-based broth might be useful for studies on food matrices because these liquid models might facilitate the optimization of the final application of EOs and closely reflect the conditions in food products.

The effect of 1.25 µL/mL TVEO on the cell viability of *L. monocytogenes* and starter co-culture in cheese-based broth was similar, with reductions of approximately 1 log CFU/mL in initial counts (zero time) after 24 h of exposure (Fig. 1B and 1C). This TVEO concentration showed no decrease in the viable cell counts of *S. aureus* in cheese-based broth after 24 h of exposure, as the viable cell counts were similar ($p > 0.05$) over the assessed time intervals (Fig. 1A). When TVEO was added to the cheese-based broth at 2.5 µL/mL, a decrease in the viable cells counts of 0.9 log CFU/mL and 1.3 log CFU/mL for *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively, was observed after 24 h of exposure. However, at 2.5 µL/mL, TVEO sharply decreased the viable cell counts of the assayed starter co-culture from 4 h of exposure, and viable cell counts near 2 log CFU/mL were observed after 24 h of exposure (a reduction of approximately 4 log cycles in the initial counts). When TVEO was added to the growth medium at 5 µL/mL, the viable cell counts of *S. aureus* and *L. monocytogenes* presented a sharp decrease over time, with kill-time curves similar to those obtained for the mesophilic co-culture after exposure to TVEO at 2.5 µL/mL. At 5 µL/mL, TVEO decreased the viable cell counts of the starter co-culture to 2 log CFU/mL after 12 h of exposure, although a 3 log cycle reduction of the initial population (> 99.99%) was detected after 8 h of exposure. Systems containing TVEO consistently presented lower viable cell counts ($p \leq$

0.05) over time compared with control assays, except for the *S. aureus* counts in broth containing TVEO at 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Bacterial cells cultivated in control systems presented a slight increase in the viable cell counts over the assessed time interval (0.3 – 0.7 log increase after 24 h compared with initial counts – time zero). These results suggested that at 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, TVEO established a bactericidal effect [≥ 3 log CFU/mL reduction of initial count, i.e., ≥ 99.99 killed] (Laplante, 2007) against the starter co-culture after 24 h of exposure, and this effect was only observed toward both *S. aureus* and *L. monocytogenes* when TVEO was tested at 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (after 24 h). Moreover, at 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, TVEO showed a bactericidal effect against the starter co-culture after 12 h of exposure. Overall, the assayed co-culture presented greater sensitivity than *S. aureus* and *L. monocytogenes* when cultivated in cheese-based broth.

Considering that the incorporation of TVEO at 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in the cheese-based broth severely affected ($> 99.99\%$ of reduction of initial viable cell counts) the viability of the bacteria comprising the tested mesophilic starter co-culture in a shorter exposure time compared with *S. aureus* and *L. monocytogenes*, assays of bacterial survival in a semi-solid *coalho* cheese model (at 10 °C) were performed over 72 h using TVEO at 1.25 and 2.5 $\mu\text{L}/\text{g}$ (Fig. 2 A-C). In contrast with the results of bacterial behavior observed in cheese-broth, the addition of TVEO at 1.25 $\mu\text{L}/\text{g}$ in the semi-solid cheese model did not reduce the viable cells counts of *L. monocytogenes*; however, a slight increase in viable counts was observed from 24 h exposure onward (Fig. 2B). Similar results were obtained for *S. aureus* over time (Fig. 2A). Under similar conditions, the viable cell counts of *Lactococcus* spp. were consistently close to the initial bacterial population (approximately 6 log CFU/mL) added to the growth matrix (Fig. 2C). The incorporation of TVEO at 2.5 $\mu\text{L}/\text{g}$ in the cheese model decreased the viable cell counts of *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *Lactococcus* spp. after 72 h of exposure, which varied from 0.3 to 1.0 log CFU/g with respect to the initial counts. The final viable cell

counts for *Lactococcus* spp. in systems containing TVEO at 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ were lower ($p \leq 0.05$) than the counts observed for *L. monocytogenes*. The results of bacterial behavior in cheese-broth and in the semi-solid cheese model are consistent with the results of the MIC determination assays, suggesting that at lower concentrations, TVEO greater affect *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* compared with *S. aureus* and *L. monocytogenes*. Consistent with results found in cheese-broth, bacteria strains cultivated in semi-solid cheese control systems presented a linear and slight increase in the viable cell counts over the assessed time period.

Overall, the inhibitory effects of TVEO against the tested target bacteria were higher in cheese-based broth than in the semi-solid cheese model. This difference could be associated with the characteristics of each experimental medium used in these assays, because the composition of the food-mimicking system could impact the antimicrobial efficacy of EOs. Systems containing higher amounts of protein and fat, such as the semi-solid cheese-model, decrease the efficacy of EOs (Gutierrez et al., 2008). Proteins can form complexes with phenolic constituents present in EOs, while fatty acids enclose the hydrophobic individual constituents of EOs, making these components unavailable to attack target cells (Burt, 2004). The physical structure of the semi-solid cheese model could also impair the even dispersion of TVEO in the system, making it difficult to make contact with microbial cells in some specific areas (Gutierrez et al., 2008; Gutierrez et al., 2009). Moreover, the higher availability of nutrients in the semi-solid cheese model compared with cheese-based broth might facilitate the rapid repair of damaged bacterial cells (Burt, 2004; Nazer et al., 2005).

Although researchers have suggested that as starter cultures, lactic acid bacteria are relatively resistant to the toxic effects of spices or even some EOs (Kivanç et al., 1991), showing stimulatory effects on these organisms and enhanced acid production (Shelef et al., 1980; Tiwari and Pandey, 1981). In the present study, TVEO decreased the viability of

Lactococcus cells. However, the stimulatory effects of this substance on starter cultures have been associated with natural spices rather than with their EOs, extracts or individual constituents (Kivanç et al., 1991). A previous study showed that the EOs from cumin (300 and 600 ppm) and oregano (150, 300 and 600 ppm) inhibited the growth of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* in synthetic medium for 5 days and inhibited acid production by these bacteria (Kivanç et al., 1991). Other studies assessing the effects of the addition of the EOs from oregano or rosemary on the parameters associated with the fermentation of fresh cheeses during storage have shown that cheeses containing EOs presented higher pH values, lower production of organic acids and low amounts of indicators of chemical oxidation compared with non-flavored cheeses (Asensio et al., 2015; Olmedo et al., 2013) and low total mesophilic bacteria counts (Olmedo et al., 2013). The authors proposed that the addition of the EOs to cheeses presents a protective effect against deterioration during storage, although the potential effects on beneficial lactic acid bacteria typically observed in the studied matrices have not been assessed. Overall, we should consider that the application of TVEO in fermented dairy products (such as, cheeses) in doses enough to control pathogenic bacteria could negatively affect the growth and survival of starter cultures comprising lactic acid bacteria and speculate a potential decrease in acid production, affecting the proper sensory characteristics and safety of the products.

4. Conclusion

TVEO presented inhibitory activity against pathogenic bacteria *S. aureus* and *L. monocytogenes*, which are often associated with *coalho* cheese, and a co-culture comprising *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* used in the manufacture of this product. However, the growth of the starter co-culture was more severely affected by TVEO, considering the MIC values and the behavior of test bacteria when challenged with this

essential oil at different concentrations. Thus, the doses of TVEO proposed to control pathogenic bacteria in fermented dairy products, particularly in cheeses, could be cautiously established because of the potential negative effects on the growth and survival of beneficial lactic acid starter cultures used in the production of these foods.

Acknowledgments

The authors would like to thank the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) for a scholarship awarded to the first author (R.J. de Carvalho).

References

- Al.maqtari, M.A.A., Alghalibi, S.M., Alhamzy, E.H., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus vulgaris* from Yeme. **Turk. J. Biochem.** 36, 342-349.
- American public health association (APHA), 2001. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, fourth ed. Washington, USA.
- Asensio, C.M., Grosso, N.R., Juliani, H.R., 2015. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. **LWT – Food Sci. Technol.** 60, 664-671.
- Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M., 2013. Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. **Ind. Crop. Prod.** 50, 304-311.
- Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M.J., Manresa, A., 2010. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. **J. Appl. Microbiol.** 109, 1139-1149.
- Brazil, 1997. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Ordinance No. 352 of 1997: approves technical regulation for the identity and quality of “coalho” cheese.** Brasília, DF, Brazil: Diário Oficial da União (in Portuguese).
- Brazil, M.S. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Retrieved on 12 August 2014 from <http://www.anvisa.gov.br>

- Brooks, J.C., Martinez, B., Stratton, J., Bianchini, A., Krokstrom, R., Hutkins, R., 2012. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiol.** 31, 154–158.
- Burt, S.A., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **Int. J. Food Microbiol.** 94, 223-253.
- Carović-Stanko, K., Orlić, S., Politeo, O., Strikić, F., Kolak, I., Milos, M., Satovic, Z., 2010. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chem.** 119, 196–201.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.** Approved Standard-Seventh Edition M07-A7. Wayne.
- Coelho, M.C., Silva, C.C.G., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E., Rosa, H.J.D., 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 191, 53-59.
- Food and Drug Administration, 2014. **Antimicrobial resistance: a growing threat, 2009.** Retrieved on 15 December 2014 from <http://www.fda.gov>.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., Mcsweeney, P.L.H., 2000. **Fundamentals of cheese science.** Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Gandhi, M., Chikindas, M.L., 2007. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **Int. J. Food Microbiol.** 113, 1–15.
- Garcia, E.F., Oliveira, M.E.G., Queiroga, R.C.R.E., Machado, T.A.D., Souza, E.L., 2012. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Int. J. Food Sci. Nutr.** 63, 947-956.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **Int. J. Food Microbiol.** 124, 91-97.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiol.** 26, 142-150.
- Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J., 2011. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **J. Microbiol. Methods.** 44, 121–129.
- Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., Baerheim Svendsen, A.B., 1987. Antimicrobial activities of essential oils. A 1976-1986 literature review on possible applications. **Pharm. Weekbl. (Sci.)** 9, 193-197.
- Kivanç, M., Akgül, A., Dogãn, A., 1991. Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. **Int. J. Food Microbiol.** 13, 81-85.

- Kohiyama, C.Y., Ribeiro, M.M.Y., Mossini, S.A.G., Bando, E., Bomfim, N.S., Nerilo, S.B., Rocha, G.H.O., Grespan, R., Mikcha, J.M.G., Machinski, M., 2015. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chem.** 173, 1006-1010.
- Laplante, K.L., 2007. In vitro activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 57, 413-418.
- López-Díaz, T.M., Alonso, C., Román, C., García-López, M. L., Moreno, B., 2000. Lactic acid isolates from a hand-made blue cheese. **Food Microbiol.** 17, 23-32.
- McMahon, M.A.S., Tunney, M.M., Moore, J.E., Blair, I.S., Gilpin, D.F., 2008. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Lett. Appl. Microbiol.** 47, 263-268.
- Mills, S., O'Suillvan, O., Hill, C., Fitzgerald, G., Ross, R.P., 2010. The changing face of dairy starter culture research: from genomics to economics. **Int. J. Dairy Technol.** 63, 149–170.
- Monte, D.F.M., Tavares, A.G., Albuquerque, A.R., Sampaio, F.C., Oliveira, T.C.R.M., Franco, O.L., Souza, E.L., Magnani, M., 2014. Tolerance response of multidrug-resistant *Salmonella entérica* strains to habituation to *Origanum vulgare* L. essential oil. **Front. Microbiol.** 5, 1-6.
- Nazer, A.I., Kobilinsky, A., Tholozan, J.L., Dubois-Brissonnet, F., 2005. Combination of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv, typhimurium: a synergistic effect. **Food Microbiol.** 22, 391-39.
- Neviani, E., De Dea Lindner, J., Bernini, V., Gatti, M., 2009. Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural medium. **Food Microbiol.** 26, 240-245.
- Nezhadali, A., Nabavi, M., Rajabian, M., Akbarpour, M., Pourali, P., Amini, F., 2014. Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and *in vitro* antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. **Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.** 3, 87-92.
- Nowak, A., Kalemba, D., Krala, C., Piotrowska, M., Czyzowska, A., 2012. The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. **Food Microbiol.** 32, 212–216.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist – AOAC,** 2012. 18th eds. Washington, USA.
- Oliveira, M.E.G., Garcia, E.F., Queiroga, R.C.R.E., Souza, E.L., 2012. Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Sci. Agric.** 69, 370-379.

- Olmedo, R.H., Nepote V., Grosso, N.R., 2013. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. **LWT – Food Sci. Technol.** 53, 409-417.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi, H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and cloves essential oil against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control.** 18, 1518-1523.
- Pimentel-Filho, N, J.; Mantovani, H. C.; Carvalho, A. F.; Dias, R. S.; Vanetti, M. C. D., 2014. Efficacy of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. **Int. J. Food Sci. Technol.** 49, 416–422.
- Queiroga, R.C.R.E., Santos, B.M., Gomes, A.M.P., Monteiro, M.J., Teixeira, S.M., Souza, E.L., Pereira, C.J.D., Pintado, M.M.E., 2013. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats' milk and their mixture. **LWT - Food Sci. Technol.** 50, 538–544.
- Quero, G.M., Santovito, E., Visconti, A., Fusco, V., 2014. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk and soft cheeses: Culture-independent versus liquid and solid-based culture-dependent real time PCR approaches. **LWT - Food Sci. Technol.** 28, 11-20.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Yoshinari, T., Rezaee, M.B., Jaimand K., Nagasawa, H., Sakuda, S.H., 2008. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Int. J. Food Microbiol.** 123, 228-233.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chem.** 91, 621-632.
- Shelef, L.A., 1983. Antimicrobial effect of spices. **J. Food Saf.** 6, 29-44.
- Shelef, L.A., Naglik, O.A., Bogen, D.W., 1980. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, Rosemary, and allspice. **J. Food Sci.** 45, 1042-1044.
- Smith, E.C.J., Williamson, E.M., Wareham, N., Kaatz, G.W., Gibbons, S., 2007. Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. **Phytochemistry** 68, 210–217.
- Sousa, J.P., Torres, R.A., Azerêdo, G.A., Figueiredo, R.C.B.Q., Vasconcelos, M.A.S., Souza, E.L., 2012. Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. **Int. J. Food Microbiol.** 158, 9-13.
- Teuber, M., 1995. **The genus Lactococcus.** In: WOOD, B. J.B.; HOLZAPFEL, W. H. The genera of lactic acid bacteria. London: Chapman & Hall. 2, 235-278.

- Tiwari, K. P., Pandey, A., 1981. Effect of some spices on acid production by starter cultures. **J. Food Prot.** 42, 572-576.
- Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., Nazemi, J., 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine** 17, 142-145.
- Van Vuuren, S.F., 2008. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** 119, 462-472.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nat. Protoc.** 3, 163 – 175.
- Zeleny, R., Emteborg, H., Charoud-Got, J., Schimmel, H., Nia, Y., Mutel, I., Ostyn, A., Herbin, S., Hennekinne, J.A., 2015. Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: Feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. **Food Chem.** 168, 241-246.

Table 1CG-MS analysis of the essential oil from *Thymus vulgaris* L.

| Peaks | Compound | Area (%) |
|-------|--------------------------------|----------|
| 1 | tricyclene | 0.15 |
| 2 | α -thujene | 0.05 |
| 3 | α -pinene | 2.60 |
| 4 | camphene | 0.84 |
| 5 | myrcene | 1.40 |
| 6 | pseudolimonene | 0.06 |
| 7 | α -terpinene | 0.06 |
| 8 | <i>p</i> -menth-1-ene | 0.05 |
| 9 | <i>p</i> -cymene | 28.55 |
| 10 | limonene | 0.14 |
| 11 | eucalyptol | 1.29 |
| 12 | linalol | 5.57 |
| 13 | cis-linalol oxide | 0.17 |
| 14 | trans-linalol oxide | 0.20 |
| 15 | γ - terpinene | 6.36 |
| 16 | camphor | 1.72 |
| 17 | isoborneol | 0.20 |
| 18 | borneol | 1.36 |
| 19 | terpinene-4-ol | 0.96 |
| 20 | <i>p</i> -menthane-1,2,4-triol | 0.15 |
| 21 | thymol | 43.19 |
| 22 | carvacrol | 3.14 |
| 23 | caryophyllene | 0.35 |
| 24 | caryophyllene oxide | 1.43 |

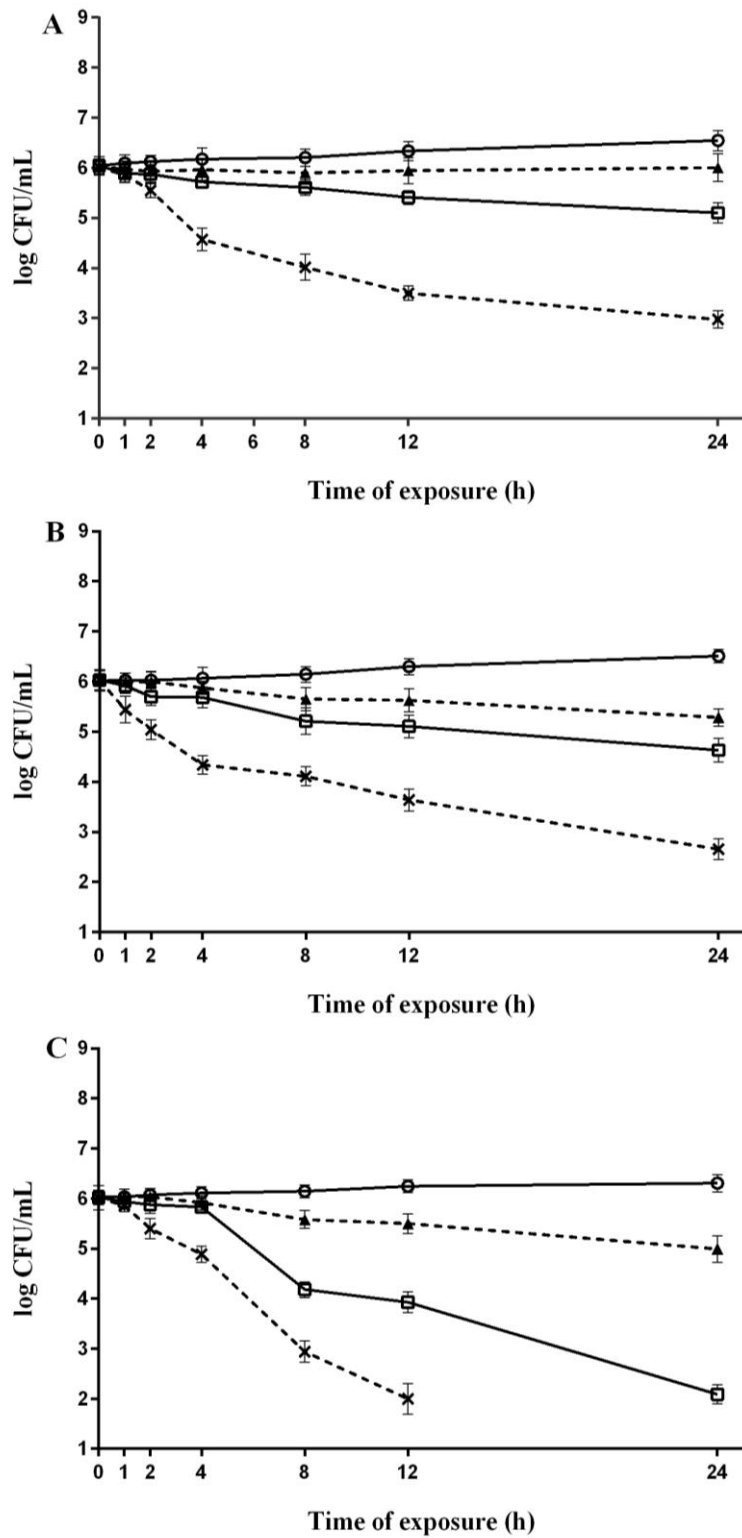


Fig. 1. Viable cell counts of *S. aureus* (A), *L. monocytogenes* (B) and mesophilic starter co-culture (C) in *coalho* cheese based-broth at 37 °C as a function of *Thymus vulgaris* L. essential oil concentration: (○): 0 μL/mL; (▲): 1.25 μL/mL; (□): 2.5 μL/mL; (×): 5.0 μL/mL. Detection limit of the test: 2.0 log CFU/mL.

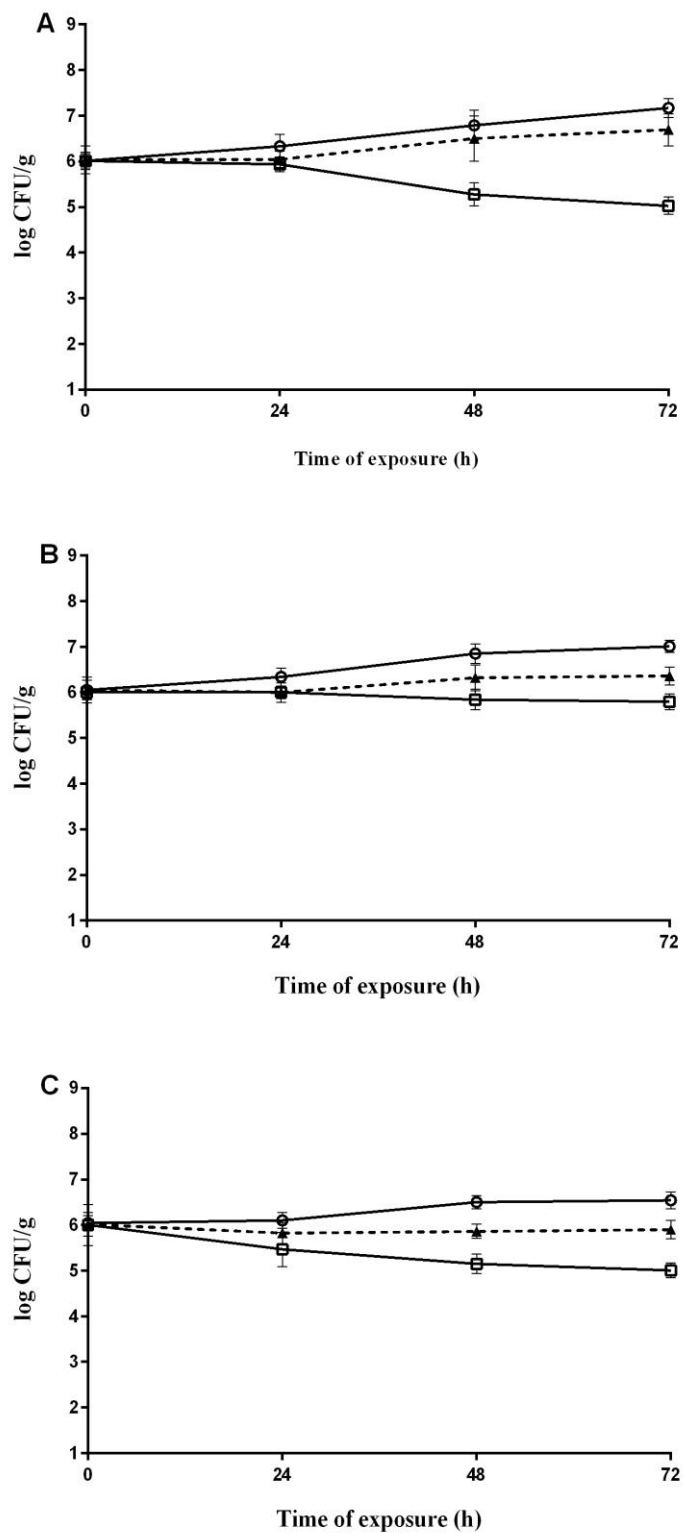


Fig. 2. Viable cell counts of *S. aureus* (A), *L. monocytogenes* (B) and *Lactococcus* spp. (C) in semi-solid *coalho* cheese model at 10 °C as a function of *Thymus vulgaris* L. essential oil concentration: (○): 0 $\mu\text{L/mL}$; (▲): 1.25 $\mu\text{L/mL}$; (□): 2.5 $\mu\text{L/mL}$. Detection limit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

ANEXO A

Relatório técnico do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (OETV)



FERQUIMA

LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Tomilho Branco
(Thymus vulgaris)

| | |
|------------------------|----------------------|
| Lote: 178 | CAS: 8007-46-3 |
| Fabricação: Julho/2013 | Validade: Julho/2015 |

| Itens Controlados | Resultados | Especificações |
|---------------------------|-----------------|-------------------------|
| Aparência | Líquido Límpido | Líquido Límpido |
| Cor | Amarelo Claro | Incolor a Amarelo Claro |
| Impurezas | Isento | Isento |
| Odor | Característico | Característico |
| Densidade (20°C) | 0,918 | 0,900 – 0,940 |
| Índice de Refração (20°C) | 1,501 | 1,490 – 1,510 |
| Rotação Ótica | | [-3,0o ; -0,1o] |
| Data da Análise | 04/09/2013 | |
| Resultado | Aprovado | |
| Principal componente | Timol | |

| Recomendações Especiais | |
|-------------------------|--|
| Manuseio | O uso de óculos de segurança e luvas é recomendável. Não inalar diretamente o produto. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa: o produto pode causar irritação à pele sensível. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra). |
| Incêndio | Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Emite vapores tóxicos em situação de incêndio. |
| Explosividade | Nenhum perigo em condições normais. |
| Uso | Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto. |
| Armazenamento | Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia. |
| Transporte | Líquido Corrosivo. Número de Risco:80. Número da Onu:UN1760. Classe ou Subclasse de Risco:8. Grupo de Embalagem: III |

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754