

ANA LÚCIA DA SILVA

EFEITOS DO CARVACROL SOBRE O CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL

Dissertação apresentada á Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586e
2019 Silva, Ana Lúcia da, 1977-
Efeitos do carvacrol sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal / Ana Lúcia da Silva. – Viçosa, MG, 2019.
x, 31f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Pêna.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.26-31.

1. Queijo. 2. Carvacrol. 3. Microbiologia - Modelos matemáticos. 4. Controle biológico. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

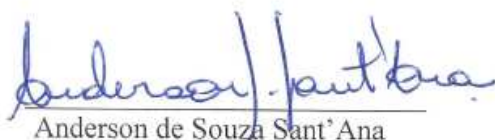
CDD 22 ed. 641.37356

ANA LÚCIA DA SILVA

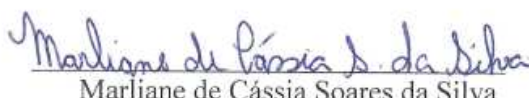
EFEITOS DO CARVACROL SOBRE O CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL

Dissertação apresentada á Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do Título de Magister Scientiae.

APROVADA: 09 de julho de 2019.



Anderson de Souza Sant'Ana



Marliane de Cássia Soares da Silva

(Coorientadora)



Wilmer Edgard Luera Peña

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por caminhos diferentes dos traçados por mim, me trouxe novamente a esta Instituição, e me proporcionou mais esta conquista.

Ao meu marido Jucinei, pela paciência, esforço e dedicação, sempre me apoiando e acreditando nos meus sonhos.

Aos meus filhos Hemily e Gabriel pela paciência e contribuição nos momentos difíceis.

A minha irmã Irene pelo apoio e orientação no início deste projeto. A minha irmã Marta, pelo carinho e dedicação aos meus filhos, me apoiando sempre.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wilmer Edgard, por sua simplicidade, paciência e disposição em transmitir seu conhecimento.

Aos coorientadores, Prof. Dr. Regina Célia e Dra. Marliane, pelos ensinamentos e apoio na elaboração deste trabalho.

Ao prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana por participar da banca avaliadora.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas oportunidades concedidas.

A todos do laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, pela amizade e convívio diário.

A Rafaela pela ajuda nas disciplinas, e a Adeline pela ajuda durante todo o experimento. Obrigada por compartilharem seus conhecimentos e pelo incentivo.

Ao Elvécio, Nivea, Nélio, Vinicius, Evandro, Solimar, Monique, Rosângela, Gean e Gustavo, que contribuíram com empréstimo de equipamentos ou troca de conhecimento.

As minhas amigas Talita, Bianca e Zé Flávio por todo o incentivo, amizade, apoio e troca de experiências.

Enfim a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo geral:.....	2
2.2. Objetivos específicos:	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. Segurança microbiológica de queijos.....	3
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
3.2.1. Fatores que afetam o crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i>	5
3.3. Uso de óleos essenciais como agente antimicrobiano.....	6
3.4. Tecnologia de barreiras	7
3.5. Microbiologia preditiva.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1. Delineamento experimental.....	9
4.2. Preparo de materiais.	10
4.3. Concentração mínima inibitória do carvacrol sobre o <i>S. aureus</i>	11
4.4. Produção do queijo Minas frescal e análises microbiológicas	11
4.6. Ação antimicrobiana do carvacrol no queijo.....	13
4.7. Análises dos dados e modelagem matemática	13
4.8. Validação do modelo.....	14
5.1. Concentração mínima inibitória (MIC) do carvacrol frente ao <i>S. aureus</i> ...	14

5.2. Efeito do carvacrol sobre o crescimento do <i>S. aureus</i> em queijo minas frescal a diferentes temperaturas de estocagem ao longo de 20 dias.	16
5.3. Análises dos dados e modelagem matemática	20
5.3.2. Validação do modelo.....	24
6. CONCLUSÃO	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação da população de *S. aureus* em queijos com adição de diferentes concentrações de carvacrol (0; 0,06; 0,125 e 0,25 $\mu\text{L g}^{-1}$) incubados a temperatura de 7 °C, em função do tempo.

Figura 2. Avaliação da população de *S. aureus* em queijos com adição de diferentes concentrações de carvacrol (0; 0,06; 0,125 e 0,25 $\mu\text{L g}^{-1}$) incubados a temperatura de 10 °C, em função do tempo.

Figura 3. Avaliação da população de *S. aureus* em queijos com adição de diferentes concentrações de carvacrol (0; 0,06; 0,125 e 0,25 $\mu\text{L g}^{-1}$) incubados a temperatura de 20 °C, em função do tempo.

Figura 4. Avaliação da população de *S. aureus* em queijos com adição de diferentes concentrações de carvacrol (0; 0,06; 0,125 e 0,25 $\mu\text{L g}^{-1}$) incubados a temperatura de 30 °C, em função do tempo.

Figura 5. Probabilidade de crescimento do *S. aureus* em amostras de queijos em função do carvacrol, temperatura e tempo de estocagem. (a) 7 °C e (b) 12 °C.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema fatorial para avaliar o crescimento do *S. aureus* frente aos seguintes parâmetros (concentração de carvacrol, temperatura, e tempo).

Tabela 2. Concentração mínima inibitória do carvacrol frente ao *S. aureus* (ATCC 6538).

Tabela 3. Crescimento do *S. aureus* em queijo Minas frescal.

Tabela 4. Coeficientes das variáveis significativas do modelo probabilístico de crescimento/ não crescimento de *S. aureus*.

Tabela 5. Verificação do modelo probabilístico de crescimento do *S. aureus* em queijo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
APPCC	Análises de pontos críticos controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BHI	Brain Heart Infusion
CLSI	Clinical and Laboratory Standart Institute
GRAS	Generally Recognized as Safe
μL	Microlitro
μG	Micrograma
mL	Mililitro
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MRS	Mann Rogosa Sharpe
nm	Nanômetro
PMP	<i>Pathogen Modeling Program</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VRB	Vermelho violeta bile

RESUMO

SILVA, Ana Lúcia da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Efeitos do carvacrol sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal.** Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña. Coorientadores: Marliane de Cássia Soares da Silva e Regina Célia Santos Mendonça.

O carvacrol, uma substância natural, extraída dos óleos essenciais de orégano (*Oreganum vulgare*) possui ação antimicrobiana comprovada. Estudos recente tem mostrado a presença de *S. aureus* em queijos frescos, quando em altas contagens estes microrganismos podem produzir toxinas que causam doenças. Diante disso este estudo buscou avaliar a aplicação do carvacrol no queijo Minas Frescal, tendo como objetivos: a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) do carvacrol frente ao *S. aureus*; Avaliar o efeito do carvacrol sobre o crescimento de *S. aureus* em queijo Minas Frescal, a diferentes temperaturas e tempo de estocagem; e através da microbiologia preditiva prever a probabilidade de crescimento/não crescimento do microrganismo no produto. Obteve-se a MIC pela técnica da microdiluição em caldo, utilizando microplacas de poliestireno de 96 poços, sendo realizadas a leitura da densidade ótica por 24 h a 600 nm. Após a obtenção da MIC ($0,125 \mu\text{L g}^{-1}$) foram escolhidas 4 concentrações (0, MIC/2, MIC e MIC*2) para a aplicação no produto. O produto foi incubado a 7 °C temperatura recomendada para estocagem e a 10, 20 e 30 °C, simulando excesso de temperatura de estocagem. O queijo foi então analisado nos tempos 5, 10 15 e 20 dias, para avaliar a ação antimicrobiana do carvacrol. As análises microbiológicas foram realizadas utilizando plaqueamento em ágar Baird parker pela técnica de microgotas. Foram considerados crescimento quando a contagem foi superior a 0,5 log da quantidade inoculada, caso contrário não crescimento. Aos dados de crescimento foram atribuídos valores binários de 0 (não crescimento) e 1 (crescimento), estes dados foram usados para construção do modelo, que foi construído através do software Minitab versão 1.2. O modelo foi validado através de parâmetros diferentes dos usados na construção do modelo. O carvacrol foi eficiente no controle do *S. aureus*, reduzindo em até 1,4 ciclos log a contagem bacteriana no queijo. A concentração de carvacrol e a temperatura influenciaram no crescimento de *S. aureus* no queijo. Combinações de baixas temperaturas e concentração de carvacrol acima da concentração mínima inibitória ($0,25 \mu\text{L g}^{-1}$) foram eficazes para reduzir a probabilidade de crescimento do microrganismo. E o modelo testado foi capaz de prever a resposta microbiana em 92,19% dos ensaios realizados. O modelo probabilístico de regressão logística implementado é uma ferramenta importante na quantificação dos efeitos do carvacrol, tempo

e temperatura de estocagem para controle microbiológico de *S. aureus* em queijos. Assim o carvacrol poderá ser uma alternativa no controle de *S.aureus* em queijos Minas Frescal, necessitando de mais estudos.

ABSTRACT

SILVA, Ana Lúcia da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Effects of carvacrol on growth of *Staphylococcus aureus* in fresh cheese.** Adviser: Wilmer Edgard Luera Peña. Co-Advisers: Marliane de Cássia Soares da Silva and Regina Célia Santos Mendonça.

Carvacrol, a natural substance extracted from oregano (*Oreganum vulgare*) essential oils has a proven antimicrobial action. Recent studies have shown the presence of *S. aureus* in fresh cheeses, when at high counts these microorganisms can produce disease causing toxins. Therefore, this study aimed to evaluate the application of this compound in Minas Frescal cheese, with the following objectives: the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of carvacrol against *S. aureus*; To evaluate the effect of carvacrol on *S. aureus* growth in Minas Frescal cheese, at different temperatures and storage time; and through predictive microbiology predict the probability of growth / non-growth of the microorganism in the product. The MIC was obtained by the broth microdilution technique using 96-well polystyrene microplates and the optical density was read for 24 h at 600 nm. After obtaining MIC ($0.125 \mu\text{L g}^{-1}$) 4 concentrations were chosen (0, MIC / 2, MIC and MIC * 2) for application to the product. The product was incubated at 7°C recommended storage temperature and at 10, 20 and 30°C , simulating excess storage temperature. The cheese was then analyzed at 5, 10 15 and 20 days to evaluate the antimicrobial action of carvacrol. Microbiological analyzes were performed using Baird parker agar plating by the microtrop technique. Growth was considered when the count was greater than 0.5 log of the inoculated amount, otherwise no growth. The growth data were assigned binary values of 0 (non-growth) and 1 (growth). These data were used to build the model, which was built using Minitab version 1.2 software. The model was validated through different parameters from those used in the model construction. Carvacrol was effective in controlling *S. aureus*, reducing by up to 1.4 log cycles the bacterial count in cheese. Carvacrol concentration and temperature influenced *S. aureus* growth in cheese. Combinations of low temperatures and carvacrol concentration above the minimum inhibitory concentration ($0.25 \mu\text{L g}^{-1}$) were effective in reducing the likelihood of microorganism growth. And the model tested was able to predict the microbial response in 92.19% of the assays performed. The probabilistic logistic regression model implemented is an important tool to quantify the effects of carvacrol, storage time and temperature for microbiological control of *S. aureus* in cheese. Thus, carvacrol may be an alternative for controlling *S. aureus* in Minas Frescal cheeses, requiring further studies.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas Frescal, é o terceiro queijo mais consumido no Brasil, segundo a Associação Brasileira da Indústria de Queijos, este produto atrai interesse das pequenas indústrias devido ao alto rendimento (5 a 6 L. Kg⁻¹) e ao fato de utilizar um processo de fabricação bastante simples.

De modo geral, a contaminação do produto pode ocorrer por falhas no beneficiamento do leite, como tratamento térmico inadequado, higienização dos equipamentos insatisfatória, excessiva manipulação, armazenamento incorreto, má conservação do queijo e falhas na distribuição.

Embora ferramentas da qualidade como boas práticas de fabricação (BPF) e Análises de pontos críticos de controle (APPCC), tenham sido implantados pelas indústrias com objetivo de fornecer segurança aos alimentos, relatos de contaminação dos queijos Minas Frescal continuam ocorrendo.

Os principais microrganismos envolvidos na contaminação são: *Listeria monocytogenes* (APOLINÁRIO et al., 2014), *Salmonella spp.*, (ZEGARRA et al., 2009), Coliformes termo tolerantes e *Staphylococcus aureus* (VINHA et al., 2018). Sendo o *Staphylococcus aureus* um dos patógenos mais envolvido nesses relatos, devido à grande manipulação no processo de fabricação e o alto teor de umidade do queijo.

A legislação brasileira não permite o uso de conservantes sintéticos em queijos frescos, por isso medidas alternativas para inibir a presença de patógenos em queijo Minas têm sido reportadas em trabalhos recentes, tais como o uso de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* (CAMARGO, 2011), uso de óleo essencial incorporado a embalagens no controle de Coliformes termo tolerantes e *S. aureus* (MEDEIROS, 2016) e também o uso de quitosana para controle de *S. aureus* (SOUZA, 2010).

Nesse contexto, o carvacrol, uma substância extraída dos óleos essenciais de orégano (*Oreganum vulgare*) aparece como alternativa no controle microbiano em queijos, devido a sua ação antimicrobiana, baixa toxicidade, de fácil decomposição no ambiente e ainda é considerado GRAS para aplicação em alimentos (BURT, 2004). Vários estudos mostraram o efeito do carvacrol na inibição dos microrganismos como *Salmonella ssp.* (GOMES, 2017), *S. aureus* (YOONJEE; KANG; CHANG ; RYU, 2017) e leveduras (SOUZA, 2007). Mas poucos são os estudos em matrizes alimentares, dessa forma este estudo buscou avaliar com enfoque probabilístico os efeitos do carvacrol, temperatura e tempo de estocagem no controle do crescimento do *S. aureus* em queijo Minas frescal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Avaliar o efeito do carvacrol no crescimento do *S. aureus* em queijo Minas Frescal utilizando a microbiologia preditiva.

2.2. Objetivos específicos:

- Determinar a concentração mínima inibitória do carvacrol frente ao *S. aureus*;
- Avaliar o efeito do carvacrol sobre o crescimento de *S. aureus* em queijo Minas Frescal, a diferentes temperaturas de estocagem ao longo de 20 dias;
- Construir um modelo probabilístico de crescimento/não crescimento de *S. aureus* em queijo Minas Frescal em função da concentração de carvacrol, temperatura e tempo de estocagem.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Segurança microbiológica de queijos

O queijo Minas Frescal pode ser definido como queijo fresco obtido pela coagulação do leite, com enzimas coagulantes, adicionado ou não de bactérias lácticas específicas, leite em pó, creme, sólidos de origem láctea, cloreto de sódio e cloreto de cálcio (BRASIL, 1997). É considerado um queijo semi-gordo com teor de gordura no extrato seco de 25,0 a 44,9 % e de alta umidade acima de 55,0 % (BRASIL, 1997; BRASIL, 2004). O alto teor de umidade e sua composição, aliadas a ausência de competidores biológicos, favorecem o crescimento de microrganismos patogênicos em queijos frescos (ALARCÓN, 2007).

Vários trabalhos demonstram a presença de bactérias patogênicas em queijos frescos: *Listeria monocytogenes* (APOLINÁRIO et al., 2014) *Salmonella spp* (ZEGARRA et al., 2009) e *S. aureus* (VINHA et al., 2018). A presença desses microrganismos nesses alimentos se deve a condições higiênicas inadequadas em toda a cadeia produtiva ou uso de leite cru. Surto de intoxicação estafilocócica têm sido atribuídos ao consumo de produtos lácteos, principalmente queijos em vários países (CARMO et al., 2002).

O *Staphylococcus aureus* é o causador da mastite em vacas, doença bastante comum nos rebanhos leiteiros (SILVA et al., 2010), sendo constantemente envolvido nas contaminações de queijos, especialmente queijo Minas Frescal artesanal, devido à sua elaboração com leite cru. Como tem grande capacidade de formar biofilmes e resistência à dessecação podem ser facilmente encontrado em equipamentos e assim constituir fonte de contaminação (BERGDOLL; 2005). Além de ser veiculado também pelos manipuladores, quando não usam equipamentos de proteção como luvas e máscaras causando uma pós-contaminação do produto.

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece limites de $5 \times 10^2 \text{ UFC.g}^{-1}$ de *S. coagulase positiva*, para queijo de alta umidade, entretanto vários trabalhos demonstram contagem acima deste limite.

Estudos realizados em Uberlândia investigou a presença de *S. aureus* em queijos adquiridos em feiras livres, 100 % das amostras estavam com contagem acima dos limites estabelecidos pela legislação (REZENDE et al., 2010). Também em Minas Gerais um surto foi relatado em Manhuaçu, envolvendo 50 indivíduos que consumiram queijo Minas Frescal artesanal contaminado com contagem acima de 10^5 UFC g^{-1} de *S. aureus* (CARMO et al., 2002).

O controle e a eliminação do patógeno em alimentos pode ser feito através da implantação de programas de qualidade como APPCC e BPF (SOARES et al.; 2002), além destas medidas para eliminar *S. aureus* em queijos poderiam ~~ser acrescentadas~~ ser acrescentada a pasteurização do leite e também a adição de substâncias antimicrobianas.

3.2. *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é o microrganismo patogênico mais frequentemente isolado no leite cru (ZECCONI, 2000). No período de 2000 a 2015, *S. aureus* foi o agente etiológico responsável por 7,7 % dos surtos de intoxicação alimentar ocorridos no Brasil (BRASIL, 2015). Esses microrganismos encontram-se amplamente distribuídos nas superfícies corporais do homem e de outros animais, assim como no solo, na água, em plantas e objeto (LIMA 2015).

Atualmente, o gênero *Staphylococcus* compreende 33 espécies, das quais 17 são encontradas em seres humanos. As principais espécies de *Staphylococcus* encontrados em seres humanos são *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, sendo *S. aureus* o único patogênico (CASSETTARI, 2005).

~~*S. taphylococcus*~~ *aureus* são bactérias gram-positivas, apresentam-se em forma de cocos, que variam de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis e não esporulado, apresentam-se isolados, em pares ou em cachos devido à divisão celular que ocorrem em vários planos (SANTOS et al., 2007). Estes microrganismos são catalase e coagulase positivos, além de fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose, como em anaerobiose (MARQUES et al., 2006).

A capacidade de resistir a diferentes condições ambientais determina a facilidade com que este microrganismo pode se desenvolver em uma ampla variedade de alimentos (CARMO et al., 2002). E durante o seu crescimento podem ainda produzir toxinas.

Essas toxinas são proteínas simples, de baixo peso molecular (27,5 a 30,4 kDA), resistente às enzimas gástricas o que permite sua passagem pelo trato gástrico intestinal (LEE; BERGDOLL, 2002). São ainda termo resistentes, podem ser destruídas a temperatura entre 98,9 °C por 68,5 min e 126,7 °C por 6,2 minutos (FOOD DRUG ADMINISTRATION, 2001).

As enterotoxinas produzidas pelo *S. aureus* podem causar choque tóxico e estão comumente associadas com intoxicações alimentares e diversas formas de alergias e doenças autoimunes (BALABAN, 2000). A capacidade de produzir uma ou mais toxina é encontrada

em 30 a 50 % das cepas de *S. aureus* (CARDOSO et al., 2000) o que mostra a importância de controlar este microrganismo.

Existem vinte tipos diferentes de enterotoxina EE produzidas pelos *S. ~~taphylococcus~~ aureus* conhecidas, SEA-SEE e SEG-SEU; entretanto, cinco tipos de enterotoxinas incluindo SEA-SED são as mais frequentemente relacionadas a quadros de intoxicação alimentar, enquanto as enterotoxinas SEH, SEG e SEI têm sido associadas á doenças gastroentéricas.(FEITOSA et al., 2017).

A intoxicação estafilocócica se dá pela ingestão de alimentos contaminados pela toxina liberada pelo microrganismo durante a fase de crescimento (OLIVEIRA, 2010). A intoxicação ocorre quando a contagem é superior a 10^5 UFC g⁻¹ ou presença da enterotoxinas estafilocócicas remanescentes nos alimentos (SANTANA et al., 2010). Porém alguns autores relatam que pode haver produção de toxina com contagens próximas a 10^3 UFC g⁻¹ (CARMO et al., 2002). O período de incubação e a manifestação da doença depende da sensibilidade do indivíduo e geralmente varia de 1 a 6 horas (SILVA et al., 2007). Níveis dessa toxina variando de 0,01 a 0,4 µg g⁻¹ são capazes de afetar indivíduos mais sensíveis (ORWIN et al., 1992).-

A enterotoxina provoca o aumento da perda de líquido, diarreia, e atua também no Sistema nervoso central provocando náuseas e vômitos (ROSENTAL, 2006).

3.2.1. Fatores que afetam o crescimento do *Staphylococcus aureus*.

Entre os fatores intrínsecos que afetam o crescimento dos microrganismos está o pH do alimento, a bactéria da espécie *S. aureus* pode crescer em uma ampla faixa de pH variando 4,5 a 8,5 (VIEIRA; 2016), com pH ótimo de crescimento e produção da toxina em torno da neutralidade.

Em geral a produção de queijo Minas Frescal não envolve adição de culturas lácticas, dessa forma o pH do produto é em torno de 6 (OLIVEIRA et al., 2016), o que torna o produto mais susceptível ao crescimento de *S. aureus*. Em queijos maturados a multiplicação e produção de toxinas podem ser favorecidas pela condição de aerobiose e pH mais elevado na superfície em relação ao interior do queijo (CRETENET et al., 2011).

A temperatura ótima de crescimento do *S. aureus* é em torno de 37 °C, sendo então considerado mesófilo. A temperatura ótima para produção de enterotoxina é de 40 a 45 °C, no entanto pode ser produzida de 10 a 46 °C. São considerados halo tolerantes, pois suportam concentrações de sal de até 7,5 %, o que confere uma vantagem competitiva em relação a

outros patógenos, e também poderia explicar o envolvimento deste microrganismo em intoxicações alimentares (SANTOS et al., 2007).

São anaeróbios facultativos, toleram a presença de oxigênio devido ao fato de possuir a enzima catalase que degrada os radicais livres. O tempo de multiplicação em condições de aerobiose é 2 vezes maior que em condições anaeróbicas, quando em condições ótimas de cultivo laboratorial. A produção de enterotoxinas em condições aeróbicas é maior do que em condições anaeróbicas para um mesmo intervalo de tempo (BELAY; RASOOLY 2002).

A maioria das bactérias cresce bem a atividade de água maiores que 0,9 porém *S. aureus* cresce em até 0,86, havendo relatos de surtos de *S. aureus* causados pela ingestão de leite em pó (ASAO et al., 2003), o que sugere que estes microrganismos possuem alta resistência à baixa atividade de água;

3.3. Uso de óleos essenciais como agente antimicrobiano

Óleos essenciais são substâncias aromáticas, geralmente de odor agradável e intenso, apresentam-se na forma líquida, são encontradas em diferentes vegetais, são solúveis em solventes apolares, e com solubilidade limitada em água. São compostos por diversas substâncias tais como: ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos (WOLFFENBUTTEL, 2007).

O óleo essencial de orégano, cuja espécie chama-se *Oreganum vulgare*, pertence à família das lamináceas, tem como componentes antimicrobianos o timol e o carvacrol (NAZER et al., 2005). Este óleo apresenta boa estabilidade e é muito usado na culinária como condimentos e na medicina como medicamentos (LEAL, 2013). Possuem um amplo espectro antimicrobiano, tanto para bactéria gram negativa quanto para gram positiva (SILVA, 2007).

Os óleos essenciais vêm sendo estudados como uma alternativa natural para conservação de alimentos (SIROLI et al., 2015), atraindo assim o interesse dos consumidores, que estão buscando cada vez mais produtos saudáveis, que ajudem a promover a saúde. Podemos citar como exemplo o aumento de produtos probióticos e prebióticos disponíveis nos mercados e a busca por alimentos minimamente processados que possuem menos conservantes químicos.

Muitas são as vantagens do uso do óleo essencial como antimicrobiano, uma delas é que apresenta baixa toxicidade em mamíferos, outra é que ele é facilmente degradado no meio ambiente e ainda é considerado uma substância GRAS (Geralmente reconhecido como seguro) nas doses tipicamente usadas no alimento (BURT et al., 2004), porém se aplicada diretamente ao alimento ou ao equipamento que entra em contato com o alimento deve-se ter

cuidado devido à dosagem requerida para ação antimicrobiana podendo resultar em odores e sabores desagradável ao consumidor (GUTIERREZ et al., 2009).

3.3.1. Mecanismo de ação dos óleos essenciais

A ação antimicrobiana ocorre devido ao sinergismo dos compostos encontrados no óleo essencial, como fenóis, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres e hidrocarbonetos (BAKKALI et al., 2008).

Alguns pesquisadores acham que a ação bactericida dos óleos essenciais, se deve a capacidade de penetrar na célula e inibir propriedades funcionais da mesma. Outros acreditam que compostos fenólicos podem perturbar a membrana celular, inibir as propriedades funcionais e causar o extravasamento do conteúdo celular (BAJPAI et al., 2012; FISHER; PHILLIPS, 2009). Sugere-se também que os componentes fenólicos, permeia a célula, causando danos a membrana citoplasmática, interferindo no processo de geração de energia (ATP) e interrompendo a força motriz do próton (BAJPAI et al., 2012; FRIEDLYETAY et al., 2009; BURT, 2004).

3.4. Tecnologia de barreiras

A tecnologia de barreiras é o uso combinado de vários fatores para controlar o crescimento e a multiplicação dos microrganismos, e assim conservar o alimento. A combinação correta das barreiras melhora a qualidade nutricional dos alimentos, sua estabilidade microbiológica, suas propriedades sensoriais e o custo de produção dos alimentos, já que permite empregar tratamentos mais brandos (ALFANI, 2015).

Várias são as barreiras usadas em alimentos: redução de pH, adição de açúcar, resfriamento, adição de óleos essenciais, entre outras. A combinação de barreiras pode ser sinérgica, aditiva ou antagônica, dependendo da ação dos agentes e a compatibilidade dos mesmos, se a combinação de dois fatores resultarem em um aumento de eficácia de cada tratamento, o que leva a uma redução na dose necessária para a ação bactericida, ou seja menos conservante adicionado ao alimento, resultando em produtos mais saudáveis, pode resultar também em uma redução de risco de resistência de microrganismo (YOONJEE et al., 2017).

3.5. Microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva avalia quantitativamente o efeito de fatores ambientais como pH, temperatura, atividade de água, no crescimento e inativação dos microrganismos. Esta avaliação é feita por equações e gráficos de crescimento microbiano em determinadas condições, e permite a construção de modelos matemáticos (DANNENHAUER et al., 2010).

Os modelos preditivos podem ser muito úteis para avaliar a vida de prateleira de um produto e a segurança microbiológica do mesmo (NAKASHIMA et al., 2000).

A microbiologia preditiva apresenta algumas limitações como, por exemplo, os modelos não podem ser extrapolados para condições nas quais os intervalos de temperatura não foram previstos. Previsões fora dos intervalos experimentais geralmente não são exatas. As simulações devem ser feitas em laboratórios e validadas em alimentos, razão pela qual podem ocorrer imprecisões (NAKASHIMA et al., 2000).

Os modelos preditivos avaliam parâmetros cinéticos de crescimento, dentre eles: a duração da fase lag; velocidade específica máxima de crescimento, densidade populacional máxima de crescimento, maior contagem microbiana na fase estacionária (BATY; DELIGNETTE-MULLER, 2004).

Os modelos preditivos podem ser divididos em: mecanísticos ou empíricos. Os modelos mecanísticos descrevem a resposta microbiana, com base em teorias, já os modelos empíricos descrevem um conjunto de dados por meio de uma relação matemática conveniente, que melhor se ajusta a fisiologia microbiana, sendo os mais usados (MCMEEKIN et al., 2002; KRIST et al., 1998). Os modelos empíricos podem ser classificados em modelos cinéticos e probabilísticos. Os modelos cinéticos são baseados no estudo do comportamento da população, crescimento, velocidade de crescimento ou destruição de microrganismos de interesse, em função do tempo (NAKASHIMA et al., 2000). Os modelos probabilísticos preveem a probabilidade da ocorrência de determinado evento, como exemplo, a germinação de esporos ou a formação de toxinas, em um determinado período de tempo (NAKASHIMA et al., 2000).

Os modelos podem ainda ser classificados como modelos primários, secundários e terciários. Os modelos primários descrevem a variação da concentração ou outra resposta microbiana em função do tempo em condições ambientais constantes (MCMEEKIN *et al.*, 2002). Os modelos secundários descrevem as respostas obtidas com os modelos primários com alteração nas condições ambientais, tais como temperatura, A_w e pH (BALSA CANTO; ALONSO; BANGA, 2008). Exemplo dos modelos secundários é modelo de probabilidade de regressão logística. Esse modelo descreve a probabilidade de ocorrência de um determinado evento Y, condicionado a uma variável X. Esse evento Y pode ser de êxito ($Y=1$) ou de falha, ($Y=0$). A Equação 1 representa esse modelo.

$$P(x) = \frac{e^{|\beta_0 + \sum \beta_i x_i|}}{1 + e^{|\beta_0 + \sum \beta_i x_i|}} \text{ (Equação 1)}$$

Em que: $P(x)$ é a probabilidade de ocorrer ou não determinado evento; β_0 e β_i são os coeficientes do modelo e x_i são as variáveis independentes.

A transformação logit de $P(x)$ está representada na Equação 2. Esta transformação é necessária pois $g(x)$ possui propriedades desejáveis de um modelo de regressão linear.

$$\text{Logit}(P) = g(x) = \ln \left(\frac{p(x)}{1 - p(x)} \right) = \sum \beta_i x_i \text{ (Equação 2)}$$

Em que: $g(x)$ é a transformação logit; β_0 e β_i são os coeficientes do modelo e x_i são as variáveis independentes.

Os modelos terciários correspondem aos programas de computador, aos diferentes softwares disponíveis, que tem a função de calcular o comportamento microbiano em condições específicas, combinando os modelos primários e secundários (GARRE, 2017; HUANG, 2014). Um dos programas mais utilizados para modelagem preditiva é o Pathogen Modeling Program (PMP). Esse software auxilia na tomada de decisões em tempo curto, e desse modo, permitem que as práticas sejam realizadas em tempo real (GOUGOULI, 2012).

A validação matemática dos modelos é importante para verificar se o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. Pode ser usado o coeficiente de determinação R^2 .

O coeficiente de determinação ou regressão mede a variação em torno da média. Quanto mais próximo de 1 for o valor de R^2 , significa que melhor é a predição realizada pelo modelo (PUIATTI, 2018).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

O experimento foi realizado no laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, com um delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial completo com 3 fatores ($4 \times 4 \times 4$), sendo 4 níveis de concentração de carvacrol, estabelecido após ensaio para determinar a concentração mínima inibitória do carvacrol frente ao *S. aureus*, 4 níveis de

temperatura de incubação, considerando temperatura de estocagem de 7 °C e temperaturas acima da ideal como abuso de temperatura de 10, 20 e 30 °C, com análise durante todo o prazo de validade (dias), nos tempos de incubação de 5, 10, 15 e 20 dias que foi utilizados para avaliar o efeito das interações sobre o crescimento do *S. aureus* no queijo. As análises foram realizadas em triplicatas e com três repetições. Segue abaixo a tabela com as combinações do delineamento experimental.

Tabela 1. Esquema ~~fatorial~~ parafatorial para avaliar o crescimento do *S. aureus* frente aos seguintes parâmetros (concentração de carvacrol, ~~temperatura, e tempo~~ temperatura e tempo).

Variáveis respostas: Crescimento ou não crescimento do <i>S.aureus</i>		
Concentração de carvacrol	Temperatura (°C)	Tempo (dias)
C1(controle)	7	5
C2 (MIC/2)	10	10
C3(MIC)	20	15
C4 (MIC*2)	30	20
DIC , Fatorial completo	4x4x4=64	3 repetições

4.2. Preparo de materiais.

4.2.1. Microrganismo e meio de cultivo

O microrganismo usado no estudo foi o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), pertencente ao laboratório do Inovaleite do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. A cepa foi conservada a -20 °C em Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) (Tmedia-India), contendo 10 % (v/v) de glicerol. O microrganismo foi ativado por duas vezes consecutivas, a uma temperatura de incubação de 35 °C / 24 h. A suspensão de células foi padronizada para 10⁸ UFC mL⁻¹ através da densidade ótica a 600nm (DO=0,1) em espectrofotômetro (Kazuaki IL-227) e posteriormente confirmada pela técnica de microgotas (Romeiro, 2007) em ágar BHI (Tmedia-India).

Ajustou-se a suspensão de células para 10⁶ UFC⁻ mL⁻¹ para determinar a concentração mínima inibitória do carvacrol, conforme recomendação da CSLI (2012) e para aplicação no

produto obtendo assim uma concentração de 10^5 UFC $\cdot g^{-1}$ no caldo BHI (Tmedia-India) e no queijo.

4.2.2. Preparo da solução do Carvacrol

A solução de carvacrol com 98 % de pureza, foi adquirido da empresa Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha), as soluções de trabalho foram preparadas em caldo BHI até obtenção das concentrações desejadas. Para emulsificar a solução do carvacrol, foi usado o dimetilsulfóxido(Vetec) a 2 % (v/v), que foi preparado antes de cada repetição. Para a utilização direta no queijo foi feito a diluição do carvacrol em leite esterilizado.

4.3. Concentração mínima inibitória do carvacrol sobre o *S. aureus*.

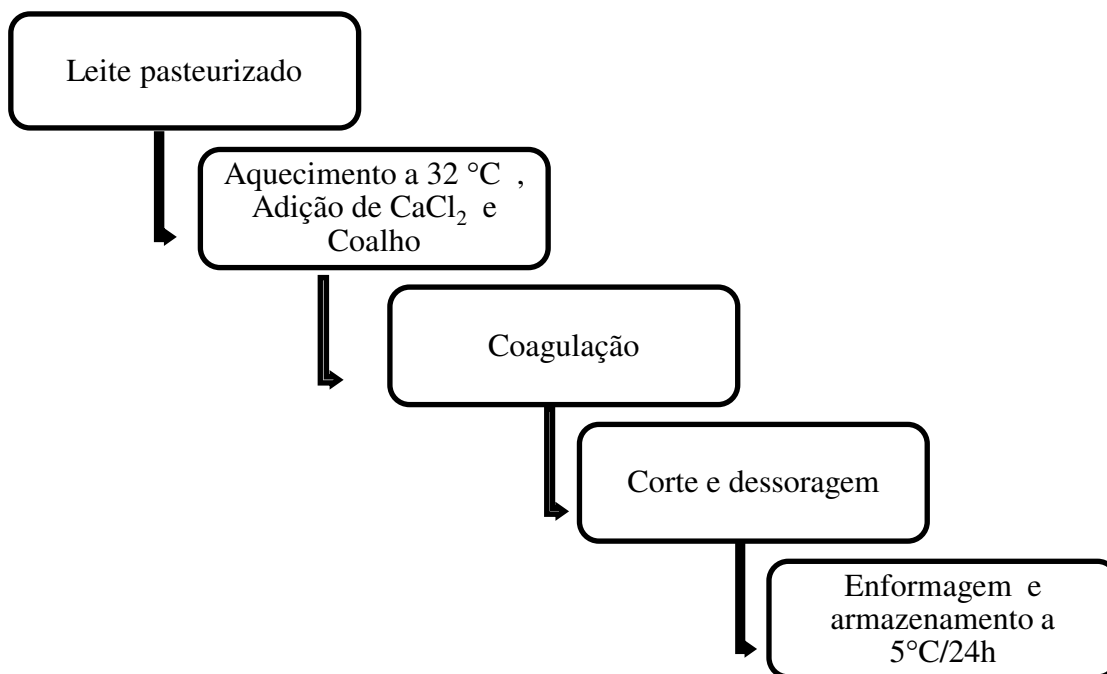
A concentração mínima inibitória foi feita através da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M07-A9 da CLSI (2012) para tanto utilizou-se microplacas de poliestireno contendo 96 poços, após o preparo do carvacrol em 8 diferentes concentrações ($-0,03$ a 3 uL mL^{-1}), foi adicionado $180 \text{ }\mu\text{l}$ do carvacrol diluído em meio de cultura e $20 \text{ }\mu\text{l}$ do inóculo contendo o *S. aureus*, ajustado a concentração para 10^6 UFC $\cdot \text{mL}^{-1}$ de modo a obter a concentração final no poço de 10^5 UFC $\cdot \text{mL}^{-1}$.

O controle positivo utilizado foi o crescimento do microrganismo em caldo BHI, e o controle negativo a adição de carvacrol ao caldo BHI, sem a adição do inóculo. Também foi verificado o efeito inibitório do Dimetilsulfóxido no crescimento bacteriano, que é adição de 2 % (v/v) do dimetilsulfóxido ao controle positivo. Os controles foram realizado em todas as repetições. Em seguida a curva de crescimento foi acompanhada utilizando o leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan GO, Vantaa, Finlândia). ~~a~~As leituras foram realizadas em D.O a 600 nm , com incubação a temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ / 24 h.

4.4. Produção do queijo Minas frescal e análises microbiológicas

O queijo foi produzido conforme fluxograma abaixo:

Fluxograma para produção do queijo Minas.



4.5 Análises microbiológicas

A qualidade microbiológica do queijo foi verificada pela contagem de *S. aureus*, coliformes totais, coliformes termotolerante e bactérias ácido lácticas.

A análise de *S. aureus* foi realizada pela técnica da microgotas, (ROMEIRO,2007) para tanto diluiu-se assepticamente 25 g da amostra em 225 mL de solução diluente (solução salina 0,85 % m/v).

Após diluições seriadas (10^1 a 10^5) da amostra, foi inoculado 20 μ L na superfície das placas de Ágar Baird-Parker (BP) (Kasvi, Itália) previamente preparadas, aguardando até que todo o líquido fosse absorvido pela superfície. As placas inoculadas foram incubadas a 35 °C / 48 h.

Para o teste de confirmação do *S. aureus*, cinco colônias típicas foram selecionadas para o teste de catalase e coagulase. Cada colônia transferida para um tubo de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) (Tmédia-India) e então homogeneizado e incubados a 35 °C/ 24 h. Com auxílio da alça de platina transferiu-se um pouco da emulsão do caldo BHI para um tubo contendo Ágar Tryptcase de Soja (Kasvi, Itália) inclinado, e os tubos inoculados foram incubados a 35 °C / 24 h. Após o período de incubação, foi adicionado 1,0 mL de peróxido de hidrogênio a 3 % em cada tubo e assim realizado a leitura do teste de catalase. Foram considerados positivos os tubos com produção de gás. Já para o teste de

coagulase foram pipetados 0,3 mL do caldo BHI com a cultura e 0,3 mL do coágulo plasma (Laborclin) e incubados a 2, 6 e 24 horas a temperatura de 35 °C, observando a presença de coágulo. Foram considerados positivos os tubos com formação de coágulo.

A contagem de coliformes totais foi realizada com adição de 1 mL da amostra em profundidade no ágar vermelho violeta bile, (VRB, Merck), e incubação a 35 °C / 48 h. Sendo confirmado os coliformes termotolerantes semeando-se cinco colônias típicas do ágar VRB nos tubos contendo o caldo EC (Oxoid, Inglaterra). Os tubos inoculados foram incubados (44 °C / 48 h) em banho-maria. Sendo considerado positivo os tubos com formação de gás nos tubos de Durham. A análise de bactérias ácido lácticas foi feita pela técnica da microgotas, utilizando ágar MRS (Mann Rogosa Sharpe, Oxoid, Inglaterra) e incubadas a 35 °C / 48 h em jarra de anaerobiose (Anaerobac, Probac -do Brasil) e posterior contagem.

4.6. Ação antimicrobiana do carvacrol no queijo

A ação antimicrobiana foi verificada em 25 g de queijo acondicionadas em sacos de polietileno, para cada um dos 192 ensaios experimentais. Para tanto o carvacrol foi adicionado nas concentrações de 0,06 (MIC/2), 0,125 (MIC) e 0,25 µL g⁻¹(MIC*2) e em seguida a suspensão microbiana foi padronizada para concentrações de 10⁶ UFC mL⁻¹ de modo que no queijo fosse de 10⁴ a 10⁵ UFC mL⁻¹. Uma amostra controle, sem adição de carvacrol também foi preparada. A incubação foi feita nas temperaturas de 7, 10, 20 e 30 °C em estufa de BOD, para posterior análise.

As análises microbiológicas do *S. aureus* foram realizadas nos tempos 5, 10, 15 e 20 dias, pela técnica de microgotas (ROMEIRO, 2007), conforme descrito no ítem 2.3.

Os dados da contagem de *S. aureus* (UFC g⁻¹) foram transformados em log₁₀ (UFC g⁻¹) para modelagem dos resultados.

4.7. Análises dos dados e modelagem matemática

A partir do planejamento experimental foi gerada uma matriz com os resultados das contagens microbianas. Essas contagens foram avaliadas de forma descritiva.

Com os dados das contagens um modelo logístico foi implementado para avaliar a probabilidade de crescimento ou não do *S. aureus* no queijo em função da concentração de carvacrol, temperatura e tempo de estocagem.

A variável resposta foi classificada como crescimento (1) e não crescimento (0). Considerou-se crescimento quando o aumento da população microbiana foi maior que 0,5

ciclos log da população inicialmente inoculada, caso contrário considerado não crescimento. O valor de 0,5 ciclos log representa a incerteza de métodos microbiológicos (SANT'ANA, 2012),

Para tanto foi utilizado a equação 1.

$$P(x) = \frac{e^{|\beta_0 + \sum \beta_i x_i|}}{1 + e^{|\beta_0 + \sum \beta_i x_i|}} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que: $P(x)$ é a probabilidade de ocorrer ou não determinado evento; β_0 e β_i são os coeficientes do modelo e x_i são as variáveis independentes.

A transformação logit de $P(x)$ (Equação 2) foi realizada para linearizar os parâmetros do modelo.

$$g(x) = \beta_0 + \beta_1 cc + \beta_2 T + \beta_3 t + \beta_4 ccTt + \beta_6 T^2 \quad (\text{Equação 2})$$

Em que: $g(x)$ = a transformação logit; $\beta_0 - \beta_6$ = coeficientes do modelo estimados pelo ajuste dos dados experimentais; cc =concentração de carvacrol; T = temperatura (°C) e t = tempo em dias.

4.8. Validação do modelo

A validação estatística dos modelos implementados foram realizadas pelo goodness-of-fit statistics e Negelkerke. O modelo também foi validado frente amostras de queijos em combinações diferentes não testadas na construção do modelo. Para tanto foram testadas uma concentração de carvacrol (0,25 $\mu\text{L g}^{-1}$) três temperaturas de estocagem 12, 18 e 25 °C e dois tempos 7 e 14 dias. Todos os experimentos com 5 repetições, totalizando 30 ensaios..

A metodologia utilizada foi conforme a descrita no item 4,4, 4,5 e 4,6 modificados os parâmetros de temperatura e tempo de estocagem.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Concentração mínima inibitória (MIC) do carvacrol frente ao *S. aureus*.

Os dados da Tabela 2 mostraram que houve crescimento do microrganismo para o controle positivo, 0,03 e 0,06 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de carvacrol. A partir da concentração de carvacrol de 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ não foi observado crescimento microbiano, indicando a inibição de toda a população inoculada (10^5 UFC mL^{-1}). Assim é possível estabelecer que a concentração de

carvacrol de 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ foi a concentração mínima inibitória. Este resultado é menor que o encontrado por SANTOS; CARVALHO FILHO; BARROS; GUIMARÃES (2011) que encontraram 0,25 mL mL^{-1} pela técnica de difusão em discos, e também por POZZO et al (2011) 0,76 mg mL^{-1} pela técnica de microdiluição em caldo.

A diferença encontrada nestes estudos pode estar relacionada com as diferentes metodologias utilizadas, pois muitos estudos empregam a técnica de difusão em ágar expressando o efeito antimicrobiano em diâmetro (mm) de inibição. Segundo GRIFFIN, MARKHAN ; LEACH, (2000), o método de difusão em ágar não é apropriado para óleos essenciais, já que pode ocorrer evaporação do óleo essencial durante o período de incubação ou pouca difusão no ágar devido à baixa solubilidade dos componentes do óleo essencial. Além disso, outros fatores podem ser considerados como o tipo microrganismo, composição do substrato utilizado para crescimento do mesmo, modo de extração do óleo essencial e condições de tempo e temperatura de incubação (BERTINI et al., 2005).

Tabela 2. Concentração mínima inibitória do carvacrol frente ao *S. aureus* (ATCC 6538).

Carvacrol ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Crescimento
3	—
2	—
1	—
0,5	—
0,25	—
0,125	—
0,06	+
0.03	+
Controle positivo	+
Controle negativo	—
Influência do dimetilsulfóxido	+

+: crescimento *S. aureus*; — : ausência crescimento *S. aureus*.

5.2. Efeito do carvacrol sobre o crescimento do *S. aureus* em queijo minas frescal a diferentes temperaturas de estocagem ao longo de 20 dias.

A qualidade do queijo utilizado no experimento foi avaliada através das análises de *S. aureus*, Coliformes Totais, Coliformes Termo Tolerante e bactérias ácido láctica, e os resultados indicaram contagens menores $5,0 \times 10^2$ UFC g⁻¹ para *S. aureus* e Coliformes Totais, e ausência de coliformes termo tolerantes atendendo assim os critérios da legislação vigente.

Nos ensaios realizados a 7 °C, não se observou crescimento do microrganismo independente da adição ou não do carvacrol (Figura 1). Nesta condição de baixa temperatura ocorre inibição do metabolismo das células bacterianas, já que as reações são catalisadas por enzimas que são influenciadas pela temperatura, a baixa temperatura também pode afetar a permeabilidade das membranas (RIBEIRO, 2012). Entretanto a baixa temperatura não pode ser considerada um agente bactericida, pois não são letais para célula bacteriana, a não ser que esta fique exposta por longo período (SILVA JR, 1996), podendo este microrganismo voltar a crescer e multiplicar em condições favoráveis. Neste sentido o carvacrol poderia ser uma barreira para o crescimento do *S. aureus* em casos de transporte e armazenamento inadequado do queijo.

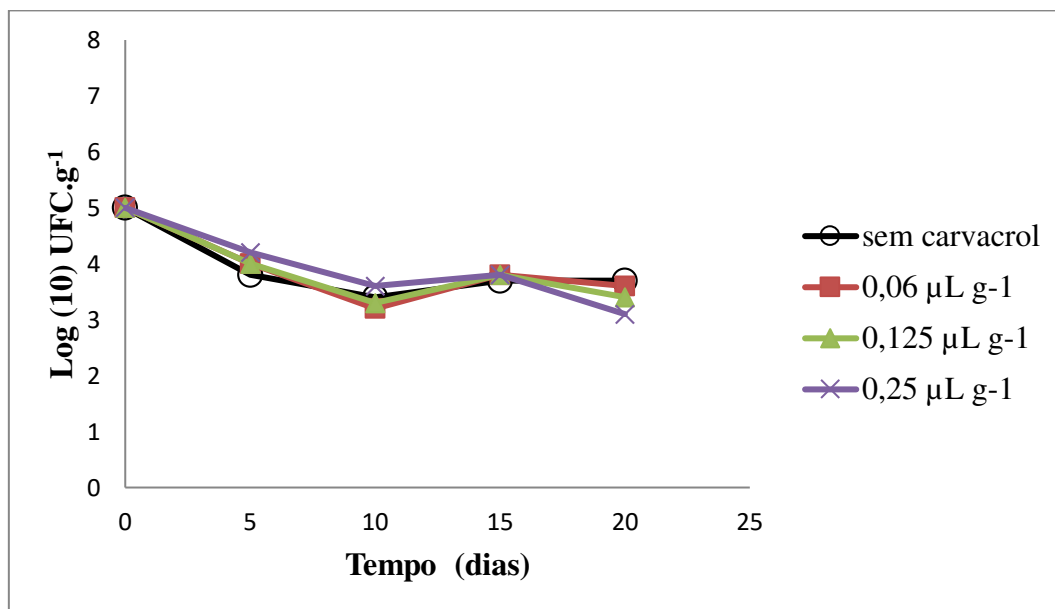


Figura 1. Avaliação da população de *S. aureus* em queijos com adição de diferentes concentrações de carvacrol (0; 0,06; 0,125 e 0,25 µL g⁻¹) incubados a temperatura de 7 °C, em função do tempo.

Já nas amostras de queijo incubadas a temperatura de 10 °C, foi observada a inibição do crescimento do *S. aureus* nas concentrações 0,25 µL g⁻¹ e 0,125 µL g⁻¹ em comparação com as amostras sem adição de carvacrol. (Figura 2).

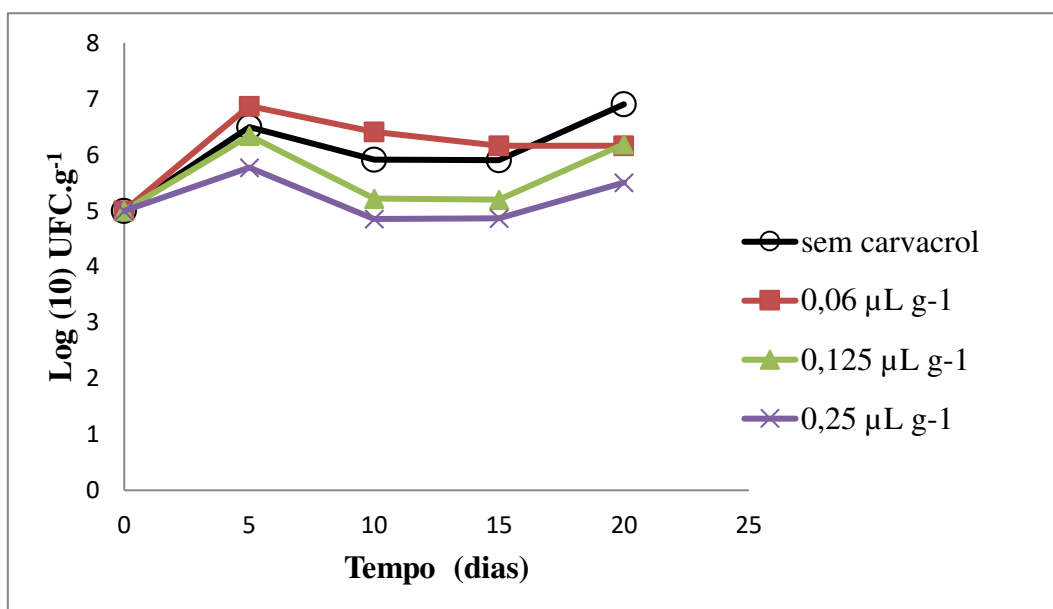


Figura 2. Avaliação da população de *S. aureus* em queijos com adição de diferentes concentrações de carvacrol (0; 0,06; 0,125 e 0,25 µL g⁻¹) incubados a temperatura de 10 °C, em função do tempo.

A concentração de 0,25 µL g⁻¹ foi capaz de reduzir a população final de *S. aureus* em até 1,4 ciclos log⁻, conforme mostra a Figura 2 -quando comparada a amostra sem carvacrol. Estudos realizado por (MEDEIROS et al., 2016) utilizaram 50 % de carvacrol incorporado à embalagem de queijos Minas no controle de *S. aureus*, reduzindo 1,4 ciclos log de UFC. g⁻¹. Já quando o carvacrol foi aplicado em matrizes alimentares como patê de frango a redução foi de 3 ciclos logarítmicos do crescimento da bactéria, porém neste estudo a aplicação do carvacrol foi de 3,25 %, enquanto a MIC foi de 0,19 % (LOVISON; GHIRALDI ; KOJIMA , 2016) ou seja a aplicação ao produto foi bem maior que a MIC, obtendo uma eficiência maior que a encontrada no presente estudo, contudo deve-se ter cuidado com a quantidade aplicada para que não ocorra uma alteração das características sensoriais do produto.

A aplicação a 0,125 µL mL⁻¹(MIC) de carvacrol em caldo BHI ocasionou a -inibição completa dos microrganismos e quando esta mesma concentração foi aplicada ao queijo, observou-se a inibição de 0,7 ciclos log dos microrganismos em relação à amostra sem carvacrol. Ou seja a aplicação em alimentos exige quantidades maiores para a mesma eficiência, devido ao fato dos alimentos possuírem mais nutrientes que os meios de cultura (BOTREL, 2010), o que permite a regeneração mais rápida da célula bacteriana.

Além disso as proteínas e as gorduras podem se ligar e/ou solubilizar compostos fenólicos, reduzindo a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais em matrizes alimentares (BARBOSA, 2010). A proteína do leite apresenta-se como fator de limitação do potencial

antimicrobiano do carvacrol, em relação à aplicação em meio de cultura o que foi demonstrado por POL et al., (2001). A ação antimicrobiana dos óleos essenciais diminui em matrizes alimentares com alto teor de lipídeos, pois os óleos ficam dispersos na fase lipídica e com menor disponibilidade para ação nos microrganismos presente na fase aquosa (BURT, 2004). Tanto a proteína quanto os lipídeos estão presentes no queijo em grande quantidade o que pode ter limitado a ação do carvacrol em baixas concentrações.

Nas amostras incubadas a 20 °C não se observou diferença entre o crescimento do microrganismo nas amostras sem carvacrol e as amostras adicionada de carvacrol, até 15 dias de incubação (Figura 3). O que pode ser devido a competição entre as bactérias lácticas e o *S. aureus*. As bactérias lácticas inibem os patógenos por competição pelos nutrientes, produção de ácidos orgânicos, como diacetil, peróxido de hidrogênio e bactericidas, produzindo efeito bactericida ou bacteriostático (PACHECO, 2014). A competição gera um estresse nutricional, este pode levar um aumento de resistência da célula ao agente antimicrobiano (COSTA; JUNIOR, 2017). Um estudo demonstrou que *L. monocytogenes* apresentou a capacidade de adaptação e adaptação cruzada aos compostos carvacrol e eugenol (SOUZA, TEBALDI; PICCOLI, 2015). Entretanto não foram encontrados dados na literatura sobre adaptação do *S. aureus* ao carvacrol, porém a capacidade de adaptação a antibióticos por exemplo já é bastante conhecida em algumas cepas.

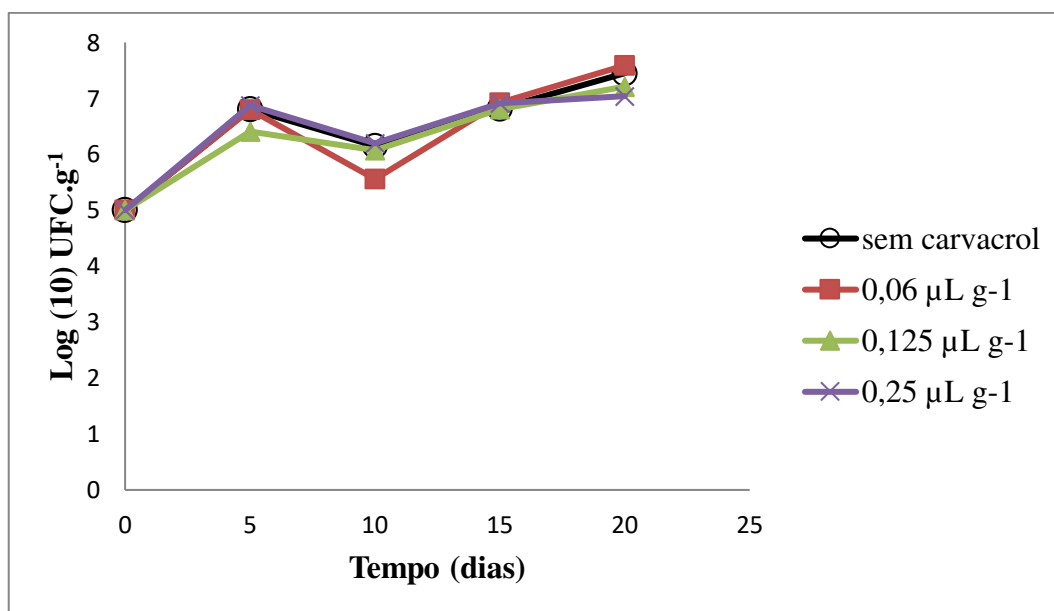


Figura 3. Avaliação da população de *S. aureus* em queijos com adição de diferentes concentrações de carvacrol (0; 0,06; 0,125 e 0,25 µL g⁻¹) incubados a temperatura de 20 °C, em função do tempo.

Estudos demonstram que *Lactococcus*, a bactéria láctica predominante nos queijos, são reduzidas durante a estocagem, podendo até desaparecer após seis a oito semanas. (FONTÁN, et al., 2001; LÓPEZ-DÍAZ, et al. , 2000). No vigésimo dia a 20 °C observou-se novamente pequena redução dos microrganismos em relação á amostra sem carvacrol tanto como na concentração de 0,25 quanto 0,125 $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ obtendo reduções de 0,4 e 0,23 ciclos log respectivamente, sugerindo que com a diminuição das bactérias lácticas, reduz a competição e novamente aparece o efeito do carvacrol (Figura 3).

Quando o queijo foi incubado a 30 °C, a concentração de 0,25 $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ de carvacrol promoveu inibição de aproximadamente 1 ciclo log de UFC. g^{-1} do *S. aureus* , em 15 dias e 0,05 ciclos no tempo de 20 dias, comportamento semelhante também foi observado na concentração de 0,125 $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$. No final do prazo de validade do produto a 30 °C, o carvacrol não apresentou efeito significativo na redução da contagem bacteriana, porém até o 15° dia reduziu em 90 % a contagem de *S. aureus* em relação à amostra sem carvacrol (Figura 4).

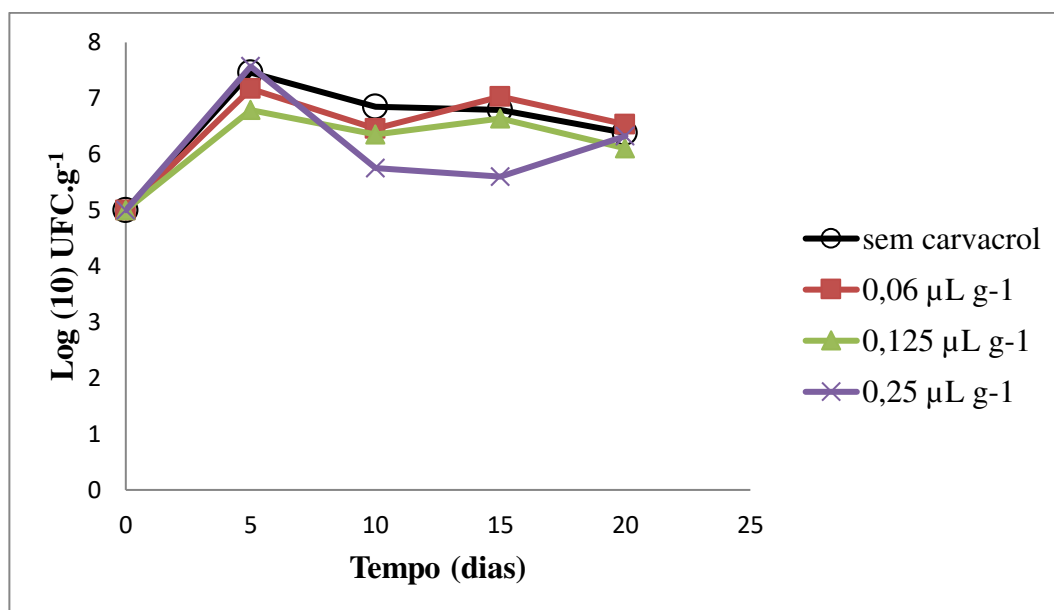


Figura 4. Avaliação da população de *S. aureus* em queijos com adição de diferentes concentrações de carvacrol (0; 0,06; 0,125 e 0,25 $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$) incubados a temperatura de 30 °C, em função do tempo. ~~Aqui além da legenda foi alterada a escala no gráfico~~

Vale ressaltar que a esta temperatura a amostra já estava bastante deteriorada e não haveria condições de consumo devido à proteólise e o mau cheiro, porém o estudo simulou até temperaturas ótimas de crescimento do microrganismo e pode-se verificar que o carvacrol na maior concentração testada teve ação no controle do *S. aureus*.

5.3. Análises dos dados e modelagem matemática

5.3.1. Ajuste do modelo de regressão logística

A partir dos dados obtidos da matriz de crescimento e não crescimento do *S. aureus*, (Tabela 3) foi construído o modelo probabilístico de regressão logística para calcular a probabilidade de crescimento deste microrganismo no queijo em função da concentração de carvacrol, tempo e temperatura de estocagem.

Tabela 3. Crescimento do *S. aureus* em queijo Minas frescal.

Conc. Carvacrol ($\mu\text{L g}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (dias)	Crescimento		
			Rep 1	Rep 2	Rep 3
0	7	5	0	0	0
0	10	5	1	1	1
0	20	5	1	1	1
0	30	5	1	1	1
0,06	7	5	0	0	0
0,06	7	5	0	1	1
0,06	10	5	1	1	1
0,06	20	5	1	1	1
0,06	30	5	1	0	0
0,125	7	5	0	0	1
0,125	10	5	1	1	1
0,125	20	5	1	1	1
0,125	30	5	1	1	0
0,25	7	5	0	0	1
0,25	10	5	0	1	1
0,25	20	5	1	1	1
0,25	30	5	1	1	0
0	7	10	0	0	0
0	10	10	1	1	1
0	20	10	1	1	1
0	30	10	1	1	1
0,06	7	10	0	0	0
0,06	10	10	1	1	1
0,06	20	10	0	0	1
0,06	30	10	1	1	1
0,125	7	10	0	0	0
0,125	10	10	1	1	0
0,125	20	10	1	0	1
0,125	30	10	1	1	1
0,25	7	10	0	0	0

0,25	10	10	0	0	0
0,25	20	10	1	0	1
0,25	30	10	1	1	1
0	7	15	0	0	0
0	10	15	1	1	1
0	20	15	1	1	1
0	30	15	1	1	1
0,06	7	15	0	0	0
0,06	10	15	1	1	1
0,06	20	15	1	1	1
0,06	30	15	1	1	1
0,125	7	15	0	0	0
0,125	10	15	1	1	0
0,125	20	15	1	1	1
0,125	30	15	1	1	1
0,25	7	15	0	0	0
0,25	10	15	0	1	0
0,25	20	15	1	1	1
0,25	30	15	1	1	1
0	7	20	0	0	0
0	10	20	0	1	1
0	20	20	1	1	1
0	30	20	1	1	1
0,06	7	20	0	0	0
0,06	10	20	0	1	1
0,06	20	20	1	1	1
0,06	30	20	1	1	1
0,125	7	20	0	0	0
0,125	10	20	1	1	1
0,125	20	20	1	1	1
0,125	30	20	1	1	1
0,25	7	20	0	0	0
0,25	10	20	1	1	0
0,25	20	20	1	1	1
0,25	30	20	1	1	1

Os dados de crescimento e não crescimento foram ajustados ao modelo da equação 2. Todos os termos não significativos ($p > 0,05$) foram eliminados e apenas os termos envolvendo a variável tempo foram consideradas com $p < 0,09$. Para tanto foi usado o software Minitab versão 12.1. Assim, a equação 3 foi implementada.

$$g(x) = -7,959 - 6,680cc + 1,4532T - 0,4412t - 0,0318T^2 + 0,0174t^2$$

Equação 3.

Os parâmetros estimados selecionados da análise de regressão logística são mostrados na Tabela 4. As variáveis, temperatura linear, concentração de carvacrol linear e temperatura quadrática foram altamente significativas. A variável tempo tanto na sua condição linear e quadrática foram consideradas no modelo ($p < 0,09$), pois avaliam a probabilidade de crescimento do microrganismo levando em conta a vida de prateleira do produto.

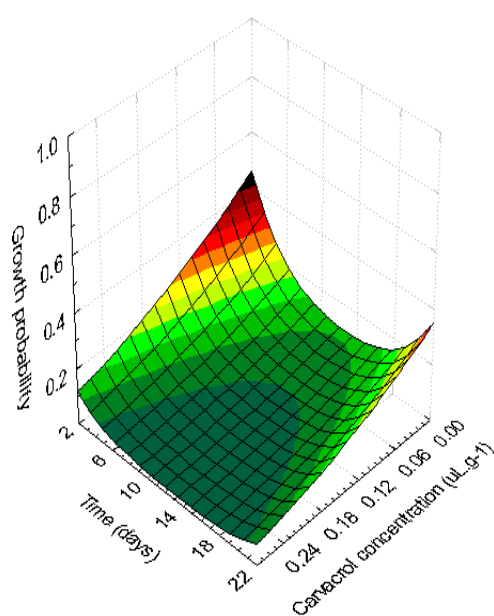
Tabela 4. Coeficientes das variáveis significativas do modelo probabilístico de crescimento/ não crescimento de *S. aureus*.

Coeficiente	Variável	Estimativa	Desvio padrão	p-valor
β_0	Constante	-7,959	2,35	0,0008
β_1	Conc. carvacrol(cc)	-6,68	2,8514	0,019
β_2	T	1,4532	0,3160	0,000
β_3	T	-0,4412	0,2606	0,0905
β_4	T*T	-0,0318	0,0083	0,001

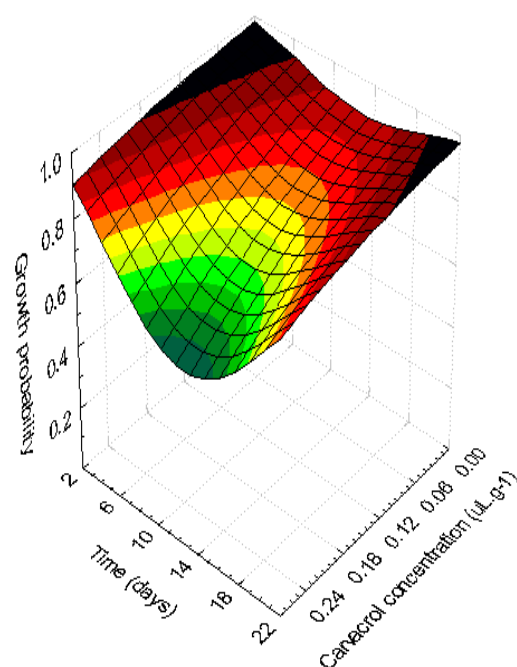
O goodness-of-fit statistics mostrou que o modelo é capaz de prever a resposta microbiana em 92,19 % dos ensaios realizados, o Nagelkerke foi de 0,72. Outros trabalhos também demonstraram o bom desempenho do modelo logístico como exemplo (PEÑA, 2005) desenvolveu um modelo para prever o crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã, em que a porcentagem de concordância foi de 96,30 % e também (OLIVEIRA; LANA; OLIVEIRA, 2012) desenvolveu um modelo para prever o crescimento microbiano ruminal em função do suprimento de nutrientes e obteve um Nagelkerke de 0,67. Resultados estes que concordam com os encontrados no presente estudo.

Substituindo $g(x)$ na Equação 1 podemos prever a probabilidade para ocorrência do crescimento/ não crescimento em função da concentração de carvacrol, temperatura e tempo de estocagem. A figura 5 mostra a probabilidade de crescimento ao longo do tempo

de estocagem a baixa temperatura (7 °C) e a uma temperatura de abuso de refrigeração (12 °C). Observa-se que é possível controlar o crescimento do *S. aureus* no queijo fresco (probabilidade de crescimento próximo de zero) quando 0,25 $\mu\text{L g}^{-1}$ de carvacrol forem adicionados ao queijo. Nessa mesma condição de temperatura observar-se probabilidades de crescimento próximos de 0,4 quando não há adição do carvacrol. Quando as condições de pH, A_w , tensão de oxigênio e disponibilidade de nutrientes são favoráveis como é o caso do queijo, o *S. aureus* pode crescer a baixas temperaturas como demonstrado por (VALERO et al.,2009). Isto demonstra o efeito do carvacrol na inibição do crescimento da bactéria a baixas temperaturas. Vale ressaltar que os queijos frescos são comercializados e consumidos a temperaturas de refrigeração, reforçando a importância do controle de patógenos que podem contaminar o produto e se desenvolver durante o transporte, estocagem nos pontos de venda e consumo.



(a) 7 °C



(b) 12 °C

Figura 5. Probabilidade de crescimento do *S. aureus* em amostras de queijos em função do carvacrol , temperatura e tempo de estocagem. (a) 7 °C e (b) 12 °C.

Observa-se pela Figura 5b que a probabilidade de crescimento aumenta significativamente quando a temperatura aumenta, mesmo com o aumento da concentração de

carvacrol. Embora essa probabilidade crescimento tenha aumentado, porém foram menores quando comparado em amostras de queijos sem carvacrol.

5.3.2. Validação do modelo

O modelo probabilístico foi validado pela condução de 6 combinações diferentes de concentração de carvacrol, temperatura e tempo de estocagem no próprio alimento (Tabela 4). A validação do modelo usando novos dados é fundamental para demonstrar a aplicabilidade do modelo.

Tabela 5. Verificação do modelo probabilístico para crescimento de *S. aureus* em queijo

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Concentração de carvacrol ($\mu\text{L g}^{-1}$)	Resposta observada	Probabilidade predita
7	12	0,25	0 1 1 1 1 (0,8)*	0,74
7	18	0,25	0 1 0 1 1 (0,6)	0,98
7	25	0,25	1 1 1 1 1 (1,0)	0,99
14	12	0,25	1 0 1 0 1 (0,6)	0,62
14	18	0,25	1 0 0 1 1 (0,6)	0,97
14	25	0,25	1 1 1 0 1 (0,8)	0,98

*probabilidade experimental

As probabilidades de crescimento obtidas nos ensaios da validação experimental foram muito próximas aos calculados pelo modelo desenvolvido. Na temperatura de 12 °C o modelo prevê probabilidades de 0,74 e 0,62 para 7 e 14 dias de estocagem do produto, sendo que experimentalmente foram encontradas probabilidades de 0,8 e 0,6 respectivamente. À temperatura de 18 °C o modelo prevê probabilidades maiores (0,98 para ambos os tempos de 7 e 14 dias) do que aos observados experimentalmente (0,6 a 7 dias e 0,8 a 14 dias). Embora a predição da probabilidade de crescimento pelo modelo seja diferente aos observados, essa predição é conservadora e pode ser considerada segura e não perigosas, pois o modelo se antecipa ao evento de crescimento microbiano. Já a 25 °C o modelo prevê a probabilidades de 0,99 e 0,98 a 7 e 14 dias respectivamente, enquanto a probabilidade encontrada experimentalmente foi 1 e 0,8, mostrando assim mais uma vez o bom ajuste do modelo.

E importante a validação do modelo para demonstrar sua aplicação a situações reais (CARRASCO et al.,2012). A utilização desse recurso em matrizes alimentícias confirma a

aplicação do modelo na previsão de crescimento de *S. aureus* em queijos, desde que os fatores estejam dentro da faixa estudada.

6. CONCLUSÃO

O carvacrol foi eficiente no controle do *S. aureus*, reduzindo em até 1,4 ciclos log a contagem bacteriana no queijo.

A concentração de carvacrol e a temperatura influenciaram no crescimento de *S. aureus* no queijo. Combinações de baixas temperaturas e concentração de carvacrol acima da concentração mínima inibitória ($0,25 \mu\text{L g}^{-1}$) foram eficazes para reduzir a probabilidade de crescimento do microrganismo. Como a adição de carvacrol reduz a probabilidade de crescimento do microrganismo, ocorre também a redução da probabilidade de produção de toxina, o que torna o produto mais seguro para o consumo.

A concentração subinibitória ($0,06 \mu\text{L g}^{-1}$) não apresentou efeito inibitório do crescimento, enquanto a MIC teve efeito inibitório pouco expressivo, indicando que é necessária uma dose maior do composto para aplicação em alimentos.

O modelo obtido mostrou bom ajuste aos dados experimentais e foi capaz de prever a resposta microbiana em 92,19 % dos ensaios realizados. O modelo probabilístico de regressão logística implementado é uma ferramenta importante na quantificação dos efeitos do carvacrol, tempo e temperatura de estocagem para controle microbiológico de *S. aureus* em queijos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCÓN, M. M. V. **Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota**. 56f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2007.
- ALFANI, R. Teoria de barreiras. Matéria técnica: Controle de qualidade. Disponível em: <http://cq-controlededequalidade.blogspot.com/2015/03/teoria-das-barreiras.html> Acesso em: 23/09/2018.
- APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S.; LAVORATO, J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, p. 433-442, 2014.
- ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUC, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of *Staphylococcal* food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin a in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, v. 130, p. 33-40, 2003.
- BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2011.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDALOMA, M. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. *Staphylococcal* enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p.1-10, 2000.
- BALSA CANTO, E.; ALONSO, A. A.; BANGA, J. R. Computing optimal dynamic experiments for model calibration in predictive microbiology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 31, p. 186-206, 2008.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. Mathematics of predictive food microbiology. **Journal of Food Microbiology**, v. 26, p.199-218, 1995.
- BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. 107 f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010.
- BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M.L. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision. **Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 261-277, 2004.
- BELAY, N.; RASOOLY, A. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin a production in an anaerobic environment. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 199-204, 2002.
- BERGDOLL, M. S.; LEE, W.A. C. *Staphylococcal* intoxications. **Foodborne Infections and Intoxications**, p. 523-562, 2005.
- BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**, v.17, p.80-83, 2005.

- BOTREL, P. P. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl, Lamiaceae em função da sazonalidade. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 32, p.533-538, 2010.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico Para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. Diário Oficial da União. Brasília, 1997.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - SVS. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS. DTA. PERÍODO DE 2000 - 2016.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223-253, 2004.
- CAMARGO, R. J. **Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* e no aumento da vida de prateleira de mortadela fatiada.** 72f. Tese (doutorado) Faculdade de Ciências farmacêuticas. São Paulo-SP, 2011.
- CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina 1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, p. 7-10, 2000.
- CARMO, L. S. ; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. SENA, M. J. ; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E. ; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v. 19, p. 9-14, 2002.
- CARRASCO, E.; DEL ROSAL, S.; RACERO, J. C.; GARCÍA-GIMENO, R. M. A review on growth/no growth *Salmonella* models. *Food research international*, v. 47, p. 90-99, 2012.
- CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 9, p. 70-76, 2005.
- CLSI (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: approved standard. 9th ed. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. Disponível em uploads/2018/11/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf>
- COSTA, A. L. P.; JUNIOR. A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica*. Macapá, v.7, p.45-57,2017,
- CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Science & Technology*, v. 91, p. 127-150, 2011.
- DANNENHAUER, C.E. **Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva.** 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2010.
- GOMES, E.R. Cinética do Crescimento de *Salmonella* spp. na presença de concentrações subinibitórias de carvacrol. 56f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2017.
- FARIA, M. E. ; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v. 19, p. 9-14, 2002.

- FISHER, K.; PHILLIPS, C. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1343-1349, 2009.
- FONTÁN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B.; TORNADIJO, M. E.; CARBALLO, J. Microbiological changes in 'San Simón' cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, v.18, p.25-33, 2001.
- FOOD DRUG ADMINISTRATION(2001) Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/ucm2016794.htm>. Acesso em 25/11/2018.
- FEITOSA, A. C. ; RODRIGUES, R. M. ;TORRES, E. A. T.; SILVA, J. F. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Revista Desafios**,v. 04, n. 04, 2017.
- FREIRE, L., LOPES, L.S.; ALVARENGA, V.O.; CADAVEZ, V.A.P.; GONZALES-BARRON, U.; SCHAFFNER, D.W.;SANT'ANA, A.S. Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiologic**. v.73, p.288-297, 2018.
- FRIEDLY, E. C.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C.; ROMAN, M.; OBRYAN, C.; CHALOVA, V. I. *In vitro* antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 67-72, 2009.
- GARRE, A.; FERNÁNDEZ, P. S.; LINDQVIST, R.; EGEEA, J. A. Bioinactivation: Software for modeling dynamic microbial inactivation. **Food Research International**, v. 93, p. 66-74, 2017.
- GOUGOULI, M.; KALANTZI, K.;BELETSIOTIS, E.; KOUTSOUMANIS, K.P. Modeling germination of fungal spores at constant and fluctuating temperature conditions. **International Journal of Food microbiology**, v. 152, p. 151,2012.
- GRIFFIN, S.G.; MARKHAN, J.L.; LEACH, D.N. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal essential oil research**,v.12,p.249-255, 2000.
- GUTIERREZ, J.; BARRAY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, p. 142-150, 2009.
- HOFFMANN, F. L.; MANSOR, A. P.; COELHO, A. R.; VINTURIM, T. M. Microbiologia de carcaças e carnes mecanicamente separadas (CMS), obtidas em abatedouro de aves da região de São José do Rio Preto, SP. **Revista Higiene Alimentar**. v. 16, p. 45-50, 2002.
- HUANG, L. Dynamic identification of growth and survival kinetic parameters of microorganisms in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 85-92, 2017.
- JARRAUD, S.; PEYRAT,M.A ;LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE,M.; LINA, G.Egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 669-677, 2001.
- KRIST, K. A.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T.A. Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 195-203, 1998.
- LEAL, P. M. Ação antimicrobiana de compostos majoritários presentes em óleos essenciais sobre bactérias causadoras de infecções hospitalares. 52f. Monografia

(Especialização em Microbiologia e Imunologia). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu – SP, 2013.

LIMA, M. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares. **Revista UNINGÁ**, v. 21, n.1, p. 32-39, 2015.

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

MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 133-153, 2002.

MEDEIROS, E. A. A.; CARDOSO, D.M.G.; BOGGIONE, R.B.T.; ALVES, J.D.V.; ÂNGULO, N.F.F. Atividade antimicrobiana de filme de acetato de celulose incorporado com óleo essencial de orégano (*Oreganum vulgare*) em queijo Minas frescal. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência de Tecnologia de Alimentos**, 2016.

MORAES-LOVISON, M.; GHIRALDI, F.Y.; KOJIMA, S.C. Atividade antimicrobiana *in vitro* e em patê de Frango de óleo essencial de orégano nanoemulsionado. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2016.

NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRÉ, D.S.; FRANCO, B.D.G.M. Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 41-51, 2000.

NAZER, A.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J.L. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella sp. Typhimurium*: a synergistic effect. **Food Microbiology**, v. 22, p. 391-398, 2005.

NEUMEYER, K.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T.A. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage *pseudomonas*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 45-54, 1997.

OLIVEIRA, A. S.; LANA, R. P.; OLIVEIRA, M. R. C. Modelos de crescimento microbiano ruminal em função do suprimento de nutrientes. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v.13, n.2, p. 457-468, 2012.

OLIVEIRA, C. **Influência de timol e carvacrol sobre o crescimento, características metabólicas e potenciais enterotoxigenico das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos**. 64f. Dissertação (Mestrado em Nutrição), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. M.; DONAHUE, H. L.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. Biochemical and biological properties of *Staphylococcal* enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 360-366, 2002.

PACHECO, E.C.S.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Veterinary drug residues in milk and eggs. **Química Nova**, v.37, n.1, 2014.

PEÑA, W. E.L. **Uso de modelos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã**. 360f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, 2005.

POL, I.E. MASTWIJK, H.C.; SLUMP, R.A.; SMID, M.E. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. **Journal of Food Protection**, v. 64, pg. 1012-1018, 2001.

- POZZO, M. D.; VIÉGAS, J. ; SANTURIO, D. F.; ROSSATO, L.; SOARES, I.H.; ALVES, S. H.; COSTA, M. M. Antimicrobial activities of essential oils extracted from spices against *Staphylococcus* spp isolated from goat mastitis. **Ciência Rural** ,v. 41 , p.4, 2011.
- PUIATTI, G. A. **Regressão quantílica não linear para descrição de diferentes níveis de acúmulo de matéria seca em plantas de alho**. 79f .Tese (Doutorado em Estatística Aplicada e Biometria) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2018.
- REZENDE, P. H. L.; MENDONÇA, E. P.; MELO R. T.; COELHO, L. R.; MONTEIRO, G. P.; ROSSI, D. A. Aspectos sanitários do queijo minas artesanais comercializado em feiras livres. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, p. 36-42, 2010.
- RIBEIRO, C. S. **A influência térmica na dinâmica das membranas celulares: uma contribuição na conservação de *Steindachnerion parahybase* (*Siluriformes Pimelodidae*) uma espécie de peixe ameaçada de extinção**. Tese(doutorado). Universidade de São Paulo. Instituto de biociência, São Paulo, 2012.
- ROMEIRO, R.S. Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos 172 p. 2007.
- ROSENTAL, A. Optimal Surveillance Culture Sites for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Newborns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4234–4236, 2006.
- SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGONALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**.v. 77, n.3, p.545–554, 2010.
- SANTOS, A.L; SANTOS, 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. Artigo de revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia de Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-423, 2007.
- SANTOS, D.A. **O papel do manipulador de alimentos em surtos de intoxicação alimentar causados por espécies de *Staphylococcus* ocorridos em quatro cidades do Estado de Minas Gerais**. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.
- SANTOS, J.C.; CARVALHO FILHO, C.D.; BARROS, T.F.; GUIMARÃES, A.G. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. Seminário: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.32, n.4, p.1557-1564, 2011.
- SANT'ANA, A. S. ; BARBOSA, M. S. ; DESTRO M. T. ; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D.G.M. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life **International Journal of Food Microbiology**. v. 157, p.52 – 58, 2012.
- SILVA, J. P. L. **Avaliação da ação de antimicrobianos naturais no controle de *Salmonella Enteritidis* em salada de legumes com maionese**. 90f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2007.
- SILVA, JR. EA. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 2a ed. São Paulo: Livraria Varela; 1997.
- SILVA, M. V.; MENDES, L.; NOGUEIRA, J. L. Mastite Controle e profilaxia no rebanho bovino. **Revista Científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano VIII - N 15, 2010. .
- SIROLI,L.;PATRIGNANI,F.;SERRAZENETT,I.D.;TAPPI,S.;ROCULLI,P.;GARDINI, F.;LANCIOTTI,R. Natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed lamb's lettuce **Biology and Technology**, v .103, p. 33-44, 2015.

- SOARES, J; BENNITEZ, L. B.; TERRA, N. N. Análises de ponto críticos no abate de frangos, através da utilização de indicadores microbiológicos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, p. 53-61, 2002.
- SOUZA, E L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, p. 409-413, 2007.
- SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. **Revista brasileira plantas medicinais**, v.17, n.4 , 2015.
- SOUZA, M.I.B. **Controle de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal com uso de quitosana**. 29f. Monografia (Especialização em nutrição).Centro acadêmico de Vitória.Universidade Federal de Pernambuco,Vitória de Santo Antão, 2010.
- VALERO, A.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; CARRASCO, E.; FUENTES-ALVENTOSA, J.M.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; ZURERA, G. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature,pH and water activity. **International Journal of Food Microbiology**,v.133, p.186-194, 2009.
- VIÇOSA, G.N. M. P.M.; YAMAZI, A.K.; NERO, L.A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. Fibrinogen agar and the Petrifilm Staph Express count system. **Food Microbiology**, v. 27, p. 447-452, 2010.
- VIEIRA, E. A. **Influencia do pH na atividade antimicrobiana rammolipideos frente ao *Staphylococcus aureus***. 47f .Monografia em Microbiologia e bioquímica, instituto de química da universidade de São Paulo. São Paulo-SP,2016.
- VINHA, M.B.; PINTO C.L.O.;CHAVES, B.P. *Estafilococos Coagulase Positiva* em queijo Minas Frescal produzidos em agroindústria familiares. **Instituto Candido Tostes**, Juiz de fora, v. 3, p. 62-72, 2018.
- WOLFFENBUTTEL, A. N. Óleos essenciais. **Informativo CRQ-V, ano XI**, n. 105, p. 6-7, 2007.
- YOONJEE, C.; YOON, H.; KANG, D.H.; CHANG, P.S.; RYU, S. Endolysin LysSA97 is synergistic with carvacrol in controlling *Staphylococcus aureus* in foods. **Journal of Food Microbiology**, v. 244, p. 19-26, 2017.
- ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of International Dairy Federation**, v. 345, p. 15-18, 2000.
- ZEGARRA,J.J.K.;BOTTEON,R.C.C.M.;OLIVEIRA,B.C.R.S.; BOTTEON,P.T.L.;SOUZA,M.M. Pesquisa de microrganismos em utensílios, leite e queijos de produção artesanal em unidades de produção familiar no município de Seropédica. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p. 312-321, 2009.
- ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M. K.; VAN, 'T. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and environmental Microbiology**, v. 56, p. 1875-1881,1990.