

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Controle de *Staphylococcus* coagulase negativa em massa para embutido cárneo suíno pela adição de óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano)

Juliana Fernandes Rosa

Pelotas, 2021

Juliana Fernandes Rosa

Controle de *Staphylococcus* coagulase negativa em massa para embutido cárneo suíno pela adição de óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Professor Doutor Cláudio Dias Timm

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R788c Rosa, Juliana Fernandes

Controle de *Staphylococcus coagulase* negativa em massa para embutido cárneo suíno pela adição de óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) / Juliana Fernandes Rosa ; Cláudio Dias Timm, orientador. — Pelotas, 2021.

47 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. SCN. 2. Enterotoxinas. 3. Carne suína. 4. Aditivos naturais. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Título.

CDD : 636.3

Juliana Fernandes Rosa

Controle de *Staphylococcus* coagulase negativa em massa para embutido cárneo suíno pela adição de óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/08/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Helenice Gonzalez de Lima
Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Rita de Cássia dos Santos da Conceição
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Débora Rodrigues Silveira
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Resumo

ROSA, Juliana Fernandes. **Controle de *Staphylococcus coagulase negativa* em massa para embutido cárneo suíno pela adição de óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano)**. 2021. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A carne suína é a proteína animal mais produzida e consumida no mundo, sua composição rica em vitaminas e minerais, no entanto, a torna um excelente meio para a multiplicação de microrganismos com potencial de causar doenças transmitidas por alimentos (DTA). Os *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN), são progressivamente mais estudados por se tratarem de microrganismos comumente presentes em alimentos e com capacidade de produção de enterotoxinas. Os aditivos naturais são cada vez mais utilizados em substituição aos conservantes sintéticos, e a utilização do óleo essencial (OE) de *Origanum vulgare* na forma de condimentos tem auxiliado na preservação de alimentos, graças à atuação de compostos ativos contendo substâncias antioxidantes e antimicrobianas com potencial uso na preservação de alimentos. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana do OE de *O. vulgare* frente a 15 isolados de SCN potencialmente produtores de enterotoxinas obtidos no fluxograma de abate suíno, bem como avaliar a sua atividade antimicrobiana sobre a microbiota contaminante em massa para embutido cárneo suíno. O efeito antimicrobiano *in vitro* foi verificado por meio das técnicas de disco-difusão em ágar e concentração bactericida mínima (CBM), e alíquotas da massa para embutido cárneo suíno foram experimentalmente contaminadas por três isolados de SCN mais resistentes a fim de verificar a atuação do OE de *O. vulgare* a 1 e 1,5%, durante três dias de estocagem a 4 °C. O *O. vulgare* apresentou ação antimicrobiana na disco-difusão em ágar, formando halos superiores a 15 mm frente a todos isolados, bem como apresentou concentração bactericida mínima de 31,2 µL/mL. A aplicação do OE na massa revelou que o *O. vulgare* nas concentrações de 1 e 1,5% foi capaz de reduzir significativamente as contagens de SCN, enquanto somente a concentração de 1,5% do OE foi capaz de reduzir a contaminação por microrganismos aeróbios mesófilos, e aparentemente ambas as concentrações foram eficientes para controlar a deterioração da massa para embutido cárneo suíno. Por último, foi constatado que SCN são capazes de se multiplicar no ambiente proporcionado pela matriz alimentar até o segundo dia de estocagem, mantendo suas contagens aparentemente estabilizadas após esse período. A utilização do OE de *O. vulgare* mostrou-se uma alternativa natural e promissora para o controle da contaminação por SCN, bem como para a conservação de alimentos por meio da redução de microrganismos aeróbios mesófilos.

Palavras-chave: SCN; enterotoxinas; carne suína; aditivos naturais

Abstract

ROSA, Juliana Fernandes. **Control of coagulase-negative staphylococci in pork meat sausage by the addition of essential oil from *Origanum vulgare* (oregano).** 2021. 45f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Pork is the most produced and consumed animal protein in the world, its composition rich in vitamins and minerals, however, makes it an excellent means for the multiplication of microorganisms with the potential to cause foodborne diseases. Coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS), are progressively more studied because they are microorganisms commonly present in food and capable of producing enterotoxins. Natural additives are increasingly used to replace synthetic preservatives, and the use of *Origanum vulgare* essential oil (EO) in the form of condiments has helped in food preservation, thanks to the action of active compounds containing potentially antioxidant and antimicrobial substances use in food preservation. Therefore, the objective of this work was to verify the antimicrobial activity of OE of *O. vulgare* against 15 CoNS isolates potentially producing enterotoxins obtained in the swine slaughter flowchart, as well as to evaluate its antimicrobial activity on the contaminating microbiota in bulk for pork meat sausage. The *in vitro* antimicrobial effect was verified by means of disk-diffusion techniques in agar and minimal bactericidal concentration (MBC), and aliquots of the mass for pork sausage were experimentally contaminated by three more resistant CoNS isolates in order to verify the performance of the EO of *O. vulgare* at 1 and 1.5%, during three days of storage at 4 °C. *O. vulgare* showed antimicrobial action on disk-diffusion in agar, forming halos greater than 15 mm compared to all isolates, as well as presenting a minimum bactericidal concentration of 31.2 µL/mL. The application of EO in the mass revealed that *O. vulgare* at concentrations of 1 and 1.5% was able to significantly reduce CoNS counts, while only the 1.5% concentration of EO was able to reduce contamination by microorganisms aerobic mesophiles, and apparently both concentrations were efficient to control the deterioration of the mass for pork sausage. Finally, it was found that CoNS are able to multiply in the environment provided by the food matrix until the second day of storage, keeping their counts apparently stabilized after this period. The use of OE from *O. vulgare* proved to be a natural and promising alternative for the control of contamination by CoNS, as well as for food preservation through the reduction of mesophilic aerobic microorganisms.

Keywords: CoNS; enterotoxins; pig meat; natural aditives

Lista de Figuras

- Figura 1 Média de três contagens de *Staphylococcus* coagulase negativa em massa para embutido cárneo suíno experimentalmente contaminado pelo isolado 2, 3 e 10, adicionados de 1% e 1,5% de óleo essencial de *Origanum vulgare*, armazenados a 4°C 26
- Figura 2 Média de três contagens de microrganismos aeróbios mesófilos em massa para embutido cárneo suíno adicionado de 1,5% de óleo essencial de *Origanum vulgare*, armazenados a 4°C..... 28
- Figura 3 Comportamento de *Staphylococcus* coagulase negativa em massa para embutido cárneo suíno experimentalmente contaminados pelos três isolados (média de três repetições). Médias com letras iguais na mesma linha são estatisticamente iguais ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey..... 30

Lista de Tabelas

Tabela 1	Tamanho dos halos de inibição (mm) relacionados à atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> frente a isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa no teste de disco-difusão em ágar.....	23
Tabela 2	Concentração bactericida mínima ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> frente a isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa.....	24

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Graus Celsius
µm	Micrometro
µL	Microlitro
µL/mL	Microlitro por Mililitro
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
g	Gramma
h	Hora
mm	Milímetro
OE	Óleo Essencial
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Artigo.....	16
3 Considerações Finais.....	34
Referências.....	35

1 Introdução

Destacando-se como a proteína animal mais produzida e consumida no mundo, com previsões de 103.755 e 102.988 milhões de toneladas, respectivamente, para o ano de 2021 (USDA, 2021), a carne suína tem um importante papel na economia e alimentação humana. O Brasil é o 4º maior produtor dessa proteína, com 3.983 milhões de toneladas, das quais 750 mil são destinadas à exportação para países como China, Japão e México (ABPA, 2020). A produção se concentra nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, sendo o Rio Grande do Sul o 3º maior produtor de carne suína, responsável por 19,26% dos abates no país (ABPA, 2020).

Com relação ao consumo *per capita* no Brasil, nos anos de 2019 e 2020 esse volume permaneceu na faixa dos 15 kg, situando o Brasil na 23ª posição do ranking mundial de consumo *per capita* da carne suína (EMBRAPA, 2020; ABPA, 2020). O consumo ainda limitado dessa importante proteína pelos brasileiros pode ser atribuído a mitos e lendas relacionadas aos possíveis efeitos negativos do consumo de carne suína sobre a saúde, contudo, esse alimento apresenta constante ascensão no mercado e na preferência dos consumidores (HORTA et al., 2010).

Desde 2015, a carne suína teve um incremento de 30% no hábito de compra no Brasil, sendo a única proteína animal a apresentar crescimento significativo na indicação por profissionais de saúde para a sua inclusão em dietas visando uma alimentação saudável (ABCS, 2019) e, atualmente, é cada vez mais aceita pelos consumidores como uma ótima opção de proteína animal de boa qualidade e rica em vitaminas e minerais (DOS ANJOS, 2018).

A carne suína apresenta constituição variável de acordo com o corte, principalmente com relação ao conteúdo de gordura e proteínas, possuindo em média 75% de água, 22,8% de proteína, 1,2% de gordura e 1% de minerais, sendo também fonte de vitaminas hidrossolúveis do grupo B, como tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6) e cobalamina (B12), bem como zinco, potássio, ferro, magnésio e selênio (ROÇA, 2008). A gordura, temida por muitos consumidores, é composta por uma alta proporção de ácidos graxos monoinsaturados, tendo como principal o ácido oleico, seguido de ácidos graxos saturados, e em menor proporção os poli-insaturados, predominantemente do tipo ômega 6 (CAMPOS et al., 2006), desse modo, essa variedade de componentes torna a carne suína um excelente meio

de multiplicação de microrganismos, que podem causar doenças transmitidas por alimentos (DTA) aos seus consumidores (PARDI et al., 2006).

Estimativas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), apontam que a cada ano as DTA afetem uma em cada dez pessoas no mundo (cerca de 600 milhões de pessoas), levando a óbito cerca de 420 mil destas. No Brasil, entre os anos de 2007 e 2019, 9.030 surtos de DTA foram notificados, incorrendo em 160.702 doentes e 146 óbitos. Apenas 36,27% desses surtos ocorridos no Brasil tiveram seus agentes etiológicos identificados, sendo os principais *Salmonella* spp. (24,8%), *Escherichia coli* (23,5%), *Staphylococcus* spp. (17,9%) (BRASIL, 2019). Entre os anos de 2009 e 2018, os principais alimentos incriminados em surtos de DTA foram os alimentos mistos e a água, envolvidos, respectivamente, em 25,5 e 21,1% dos surtos identificados (BRASIL, 2019). Já a carne suína *in natura*, processados e miúdos, foram identificados em 2% dos surtos notificados nesse período.

A cadeia produtiva de carne suína e seus derivados é composta por 3 macrosssegmentos principais: a produção de matéria-prima, compostas por fazendas ou granjas de cria e engorda (terminação), a industrialização, que compreende o abate e processamento dos subprodutos, e a comercialização desses produtos, podendo ocorrer contaminação por microrganismos patogênicos na carne e derivados em qualquer estágio dessa cadeia (BATALHA, SILVA, 2007; BOTELHO, 2017). Essas contaminações podem ser influenciadas por boas práticas de fabricação (BPF) ineficientes ou inadequadas, ambientes impróprios para a manipulação de animais ou alimentos, equipamentos e utensílios mal higienizados, bem como pelo estado de saúde dos animais e dos manipuladores, que podem comprometer a qualidade do alimento (SOVINSKI, 2019).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são importantes microrganismos envolvidos na contaminação de alimentos. Encontram-se amplamente distribuídas na natureza, inclusive em ambientes de manipulação de alimentos ou em seus manipuladores, sendo, portanto, patógenos associados à cadeia produtiva da carne suína em diferentes fases da sua produção (RAPINI et al., 2004; BOTELHO, 2017).

Os *Staphylococcus* são pertencentes à família Staphylococcaceae, caracterizados como cocos Gram-positivos com diâmetro entre 0,5 a 1,5 µm, imóveis, anaeróbios facultativos, não esporulados, catalase positiva e mesófilos, com temperatura ótima de multiplicação de 37 °C (SCHLEIFER, BELL, 2015; PASSOS et al., 2012; FRANCO e LANGRAF, 2005). Até o momento, foram descritas 52 espécies

de *Staphylococcus*, no entanto, a principal divisão do gênero se dá entre os *Staphylococcus* produtores ou não de coagulase, enzima com capacidade de transformar o fibrinogênio em fibrina formando um coágulo, configurando um fator de patogenicidade. Sendo assim, são denominados de *Staphylococcus* coagulase positiva - SCP e *Staphylococcus* coagulase negativa - SCN (QUINN, 2015; SILVA et al., 2017). Dentro desse contexto, os SCP são os de maior importância em alimentos, uma vez que a sua produção está relacionada à capacidade de síntese de enterotoxinas causadoras de DTA, que cursam, na maioria dos casos, com sintomas gastrointestinais, podendo ainda afetar outros órgãos como rins, fígado e até mesmo o sistema nervoso central (TIMM et al., 2017; BRASIL, 2019).

Durante muito tempo, os SCN foram considerados microrganismos incapazes de causar infecções ou intoxicações, uma vez que possuem particularidades ainda pouco conhecidas em relação a produção de enterotoxinas em surtos de intoxicações alimentares (NANOUKON et al., 2017; PODKOWIK et al., 2013; MORENTE et al., 2016). No entanto, o interesse por esse grupo de *Staphylococcus* vem aumentando significativamente devido ao papel crescente que desempenham em infecções e intoxicações em humanos, relacionados, entre outros fatores, a sua capacidade de resistência à antibióticos e por estarem ainda, entre os microrganismos mais comumente encontrados em alimentos, muitas vezes em maior frequência do que os SCP (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA et al., 2020).

Foram documentadas mais de 38 espécies de SCN, das quais, muitas já foram isoladas em alimentos, como *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. cohnii* subsp. *urealyticum*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. captis* subsp. *ureolyticus*, *S. chromogenes*, *S. caprae* e *S. simulans* (LEITE et al., 2019). A produção de enterotoxinas por esses microrganismos isolados de produtos cárneos e laticínios também já foi verificada em inúmeros estudos (BECKER et al., 2014; BLAIOTTA et al., 2004; LAMAITA et al., 2005; PIETTE, VERSCHRAEGEN, 2009; ÜNAL, ÇINAR, 2012; VIEIRA, 2017), inclusive no fluxograma de abate de suínos, onde SCN apresentaram potencial enterotoxigênico e capacidade de formação de biofilme bacteriano (GONÇALVES, 2020). Também no fluxograma de produção e ainda nos manipuladores envolvidos, SCN potencialmente produtores de enterotoxinas foram verificados na produção de queijo coalho e queijo de cabra (BORGES et al., 2008; RAPINI et al., 2005), sugerindo, portanto, a possibilidade destes estarem envolvidos em intoxicações alimentares (PIETTE, VERSCHRAEGEN, 2009; ÜNAL; ÇINAR, 2012).

No ano de 1999, o estado de Minas Gerais foi acometido por um surto de intoxicação alimentar atribuído ao consumo de leite cru não pasteurizado. SCN foram identificados como um dos causadores, após a verificação da produção de pelo menos duas enterotoxinas (CARMO et al., 2002). Além dos SCN obtidos deste surto, Veras et al. (2008) analisaram SCN isolados de outros surtos de intoxicação alimentar ocorridos em Minas Gerais entre os anos de 1998 e 2002 e constataram a produção de enterotoxinas por esses microrganismos. Ainda em Minas Gerais, outros surtos de intoxicação envolvendo SCN foram identificados após o consumo de bolos confeitados entre os anos de 2010 e 2015 (GOULART et al., 2016).

Além dessas constatações, SCN carreadores de genes que codificam enterotoxinas ou mesmo potencial resistência à antimicrobianos foram isolados de diferentes alimentos (RALL et al., 2010; KÜREKCI, 2016; NUNES et al., 2016), o que implica em uma desatualização da legislação brasileira vigente, que não preconiza a pesquisa desse grupo de *Staphylococcus* em produtos de origem animal, apenas estabelece um limite máximo para SCP, subestimando o grau de contaminação dos alimentos por SCN enterotoxigênicos (BRASIL, 2001; BRASIL, 2019, FERREIRA et al., 2018).

Para atender uma demanda crescente dos consumidores que optam por alimentos com menor adição de conservantes sintéticos, juntamente com o interesse em diminuir a contaminação microbiana e consequentemente prolongar a sua vida útil, alternativas naturais estão cada vez mais sendo avaliadas para a preservação eficaz dos alimentos (OSWELL et al., 2018; CLEVELAND et al., 2001; NEGI, 2012).

Algumas espécies de vegetais apresentam propriedades biológicas ativas em sua constituição, originadas a partir da sua atividade metabólica secundária e com capacidade de gerar substâncias antimicrobianas utilizadas como mecanismo de defesa, as quais podem atuar na prevenção, tratamento e cura de várias doenças (NASCIMENTO, 2013; GOTLIEB, 1981).

Estudos indicam que antimicrobianos sintéticos bastante utilizados na indústria de alimentos, como o sorbato e o benzoato podem ser substituídos por substâncias naturais como óleos essenciais (OEs), sem a perda de sua finalidade (CHO et al., 2014) e, nesse contexto, a utilização de OEs como uma alternativa para substituição aos aditivos químicos comumente utilizados em produtos cárneos tem ganhado mais atenção, uma vez que a atividade antimicrobiana desses óleos na forma de

condimentos possui muitas aplicações, incluindo a conservação de alimentos crus e processados (MARTUCCI et al., 2015).

Na constituição dos OEs estão presentes metabólitos secundários de plantas aromáticas, voláteis e de forte odor, de teor complexo e variável de acordo com fatores genéticos, ambientais e intrínsecos da planta (BAKKALI et al., 2008; GOBBO NETO, LOPES, 2007). Os principais compostos ativos com atividade antimicrobiana são divididos em terpenos, terpenóides, fenilterpenos, entre outros (HYLDGAARD et al., 2012). Essa mistura de componentes com diferentes mecanismos de ação, atribui aos OEs a característica de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana à sua ação (DAFERERA et al., 2000). No entanto, por se tratarem de substâncias concentradas de espécies vegetais, os OEs podem apresentar toxicidade mais elevada que a planta de origem, podendo causar reações como vômitos, depressão ou excitação do sistema nervoso central em caso de ingestão em elevadas quantidades, ou ainda dermatites de contato ou alergias (CLEFF et al., 2008; LEE et al., 2019).

Origanum vulgare (orégano) é um conhecido condimento culinário utilizado com o objetivo de conferir sabor e aroma aos alimentos (KOKKINI e VOKOU, 1989). É utilizado como adjuvante em alimentos de regiões reconhecidas mundialmente por suas dietas que atuam benéficamente na promoção da saúde por possuir uma variedade de propriedades, como substâncias analgésicas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas (GARCIA-DIEZ et al., 2017; SILVA et al., 2013). Devido a essas duas últimas propriedades, o orégano pode ainda ser utilizado como substância preservadora de alimentos (ULUSOY et al., 2018), apresentando alterações toxicológicas irrelevantes em níveis hepáticos ou hematológicos ao seu consumo prolongado em concentrações de até 3% (CLEFF et al., 2008).

O OE de *O. vulgare* possui uma complexa composição de monoterpenos lipofílicos, como o eugenol, cimeno, pineno e linalol, no entanto, os compostos fenólicos carvacrol e timol são os mais frequentemente identificados como principais com atividade antimicrobiana de amplo espectro (CIRINO et al., 2015; VERNIN et al. 2001), incluindo a capacidade de inibição do crescimento de bactérias de importância em alimentos como *Staphylococcus aureus* (CIRINO et al., 2015; LUZ et al., 2013).

Avaliando a capacidade bacteriostática do OE de orégano frente também a isolados de SCN por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Possamai et al. (2019) verificaram ação desse óleo essencial em baixas

concentrações, assim como Koca et al. (2018) em isolados de SCN obtidos de infecções humanas cutâneas. Castronovo et al. (2020) ainda puderam verificar ação desse OE sobre isolados de SCN multirresistentes ao testar a resistência a antibióticos sozinhos e combinados, por meio de interações antagonistas, demonstrando a utilização promissora desse OE.

No entanto, diversos fatores podem influenciar a eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais sobre microrganismos em alimentos, como temperatura de armazenagem, carga microbiana, pH, entre outros, sendo desse modo, imprescindível a realização de testes em matrizes alimentares, além de ensaios *in vitro*, com a finalidade de observar a atividade antimicrobiana desses OEs no ambiente proporcionado pelo alimento (BAJPAI et al., 2012; LEMAY et al., 2002).

A utilização do OE de orégano como substância antimicrobiana em alimentos foi realizada com sucesso em estudos que contemplam diferentes técnicas e tipos de alimentos. Van Haute et al. (2016) verificaram que esse óleo, quando utilizado em filés de salmão marinados e carne suína, foi capaz de aumentar a vida útil desses alimentos. Também Mello et al. (2020) constataram a eficiência antimicrobiana do OE de orégano, quando utilizado em filés marinados de tainha contaminados experimentalmente com *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Krishnan et al. (2014) utilizaram o OE de orégano em porções de carne bovina, onde foi verificada a diminuição da microbiota contaminante dessa matriz alimentar, e ainda, Vivian et al. (2020) utilizaram o óleo incorporado a misturas cárneas para embutidos, apurando também a eficácia antimicrobiana contra *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*.

Considerando a hipótese de que o OE de *O. vulgare* possui atividade antimicrobiana e que o mesmo é um aditivo natural promissor para a aplicação em embutidos cárneos frescos com a finalidade de controlar/eliminar microrganismos indesejáveis, o estudo tem como objetivos verificar a atividade antimicrobiana do OE de *O. vulgare* frente a SCN potencialmente produtores de enterotoxinas, bem como avaliar a sua atividade antimicrobiana sobre a microbiota contaminante em massa para embutido cárneo suíno.

2 Artigo

Controle de *Staphylococcus* coagulase negativa em massa para embutido cárneo suíno pela adição de óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano)

Juliana Fernandes Rosa
Thamiris Pereira de Moraes
Débora Rodrigues Silveira
Kauana Kaefer
Cláudio Dias Timm

Será submetido à Revista Brasileira de Ciências Agrárias

**CONTROLE DE *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVA EM MASSA PARA
EMBUTIDO CÁRNEO SUÍNO PELA ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum
vulgare* (ORÉGANO)**

Juliana Fernandes Rosa¹, Thamíris Pereira de Moraes¹, Débora Rodrigues Silveira¹, Kauana
Kaefer¹, Cláudio Dias Timm¹

¹Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Capão do Leão, RS.
E-mail: ju_fernandes.r@hotmail.com; thamiris.p@outlook.com; debora.rsilveira@hotmail.com; kauanakafer@gmail.com;
timm@ufpel.edu.com

Resumo

A indústria busca alternativas à adição de conservantes sintéticos aos alimentos à medida que a demanda por alimentos naturais aumenta. Desse modo, o objetivo do trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) de *Origanum vulgare* frente a 15 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) potencialmente produtores de enterotoxinas, bem como avaliar a sua atividade antimicrobiana sobre a microbiota contaminante em massa para embutido cárneo suíno. A ação antimicrobiana do *O. vulgare* foi verificada pela formação de halos maiores que 15 mm frente a todos isolados na técnica de disco-difusão em ágar e pela concentração bactericida mínima de 31,2 µL/mL. A aplicação do OE na massa foi avaliada após 0, 12, 24 e 72 h de estocagem, revelando que o *O. vulgare* nas concentrações de 1 e 1,5% foi capaz de reduzir significativamente as contagens de SCN e reduzir a população de microrganismos aeróbios mesófilos na concentração de 1,5%. Também foi constatado que SCN são capazes de se multiplicar no ambiente proporcionado pela matriz alimentar até o segundo dia de estocagem. Conforme os resultados obtidos, conclui-se que o OE de *O. vulgare* é uma alternativa promissora no controle de SCN em embutido cárneo.

Palavras-chave: *Staphylococcus* coagulase negativa; orégano; enterotoxinas; carne suína

**CONTROL OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI IN PORK MEAT
SAUSAGE BY THE ADDITION OF ESSENTIAL OIL FROM *Origanum vulgare*
(OREGANO)**

Abstract

The industry is looking for alternatives to adding synthetic preservatives to foods as demand for natural foods increases. Thus, the objective of this work was to verify the antimicrobial activity of the essential oil (EO) of *Origanum vulgare* against 15 isolates of coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS) potentially producers of enterotoxins, as well as to evaluate its antimicrobial activity on the contaminating microbiota in bulk for pork meat sausage. The antimicrobial action of *O. vulgare* was verified by the formation of halos larger than 15 mm against all isolates in the agar disk-diffusion technique and by the minimum bactericidal concentration of 31.2 µL/mL. The application of EO in the mass was evaluated after 0, 12, 24 and 72 h of storage, revealing that *O. vulgare* at concentrations of 1 and 1.5% was able to

significantly reduce ConNS counts and reduce the population of microorganisms mesophilic aerobics at a concentration of 1.5%. It was also found that CoNS are able to multiply in the environment provided by the food matrix until the second day of storage. According to the results obtained, it can be concluded that the OE from *O. vulgare* is a promising alternative in the control of CoNS in meat sausage.

Key words: coagulase negative *Staphylococcus*; oregano; enterotoxins; pig meat

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos naturais, proporcionada por consumidores cada vez mais reativos à adição de conservantes sintéticos em alimentos, somado ao interesse da indústria em diminuir a contaminação microbiana de alimentos e consequentemente prolongar a sua vida útil, tornam essenciais a busca por substâncias naturais com potencial de utilização na preservação eficaz de alimentos, tanto na sua fabricação quanto na sua industrialização (Oswell et al., 2018; Negi, 2012).

Substâncias naturais como os óleos essenciais (OEs) podem ser utilizados em substituição a antimicrobianos sintéticos comuns na indústria de alimentos, uma vez que a atividade antimicrobiana de alguns desses óleos possui aplicações na conservação tanto de alimentos crus quanto em processados (Cho et al., 2014; Martucci et al., 2015). Nesse contexto, o *Origanum vulgare* (orégano) além de um conhecido condimento culinário, também apresenta propriedades antioxidantes e antimicrobianas que o qualificam como potencial substância preservadora de alimentos (Silva et al., 2013; Ulusoy et al., 2018; Vivian et al., 2020; Mello et al., 2020; Atrib et al., 2021).

Staphylococcus coagulase positiva (SCP) são considerados patógenos de importância em alimentos, uma vez que a produção da enzima coagulase está relacionada à capacidade de sintetização de enterotoxinas causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (Timm et al., 2017). No entanto, o interesse por *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) em alimentos vem aumentando significativamente em função da capacidade de produção de enterotoxinas e da frequente presença em alimentos (Morente et al., 2016; Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020).

A presença de SCN produtores de enterotoxinas já foi verificada em diversos produtos cárneos e laticínios (Blaiotta et al., 2004; Lamaita et al., 2005; Ünal & Çinar, 2012; Vieira, 2017), ainda estando presentes tanto no fluxograma de produção e nos manipuladores de queijo

(Borges et al., 2008; Rapini et al, 2005), quanto no fluxograma de abate de suínos (Gonçalves, 2020).

Embora poucos estudos tenham sido feitos com o objetivo de identificar o envolvimento de SCN em intoxicações alimentares, a presença desses microrganismos produtores de enterotoxinas nos alimentos e no seu ambiente de produção é um forte indício de que o potencial patogênico desses microrganismos esteja sendo subestimado na ocorrência de DTA (Piette & Verschraegen, 2009; Ünal & Çinar, 2012). SCN produtores de enterotoxinas foram identificados no estado de Minas Gerais, Brasil, como causadores de surtos de intoxicação alimentar após a ingestão de leite cru, bolos confeitados, e outros alimentos contaminados (Carmo et al., 2002; Goulart et al., 2016; Veras et al., 2008).

Considerando a demanda por produtos naturais, juntamente ao objetivo de controlar/eliminar microrganismos indesejáveis e potencialmente patogênicos dos alimentos, o presente estudo teve como objetivo verificar a atividade antimicrobiana do OE de *O. vulgare* frente a SCN potencialmente produtores de enterotoxinas, bem como avaliar a sua atividade antimicrobiana sobre a microbiota contaminante em massa para embutido cárneo suíno.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do óleo essencial de *O. vulgare*

O OE de *O. vulgare* foi adquirido comercialmente da empresa Ferquima Ind. e Com. Ltda (Ferquima, Vargem Grande Paulista, Brasil). Segundo este fornecedor, o OE foi extraído por meio de destilação a vapor das folhas e os principais componentes listados, por valores aproximados, foram o carvacrol (72%), gama-terpineno (4,5%), paracimeno (4%), linalol (4%) e timol (2%).

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

Foi testada a atividade antimicrobiana do OE de *O. vulgare* utilizando as técnicas de disco-difusão em ágar e concentração bactericida mínima (CBM), conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), com pequenas modificações. Foram utilizados 15 isolados de SCN potencialmente enterotoxigênicos previamente obtidos por Gonçalves (2020) de diferentes pontos do fluxograma de abate suíno. Os isolados estavam estocados em caldo *Brain Heart Infusion* ((BHI - Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) com glicerol a 20%, mantidos a 4 °C e foram recuperados em caldo BHI a 37 °C por 24 h, quando necessário.

Para a disco-difusão em ágar, 0,1 mL de cultura de cada isolado em BHI a 37 °C por 24 h com aproximadamente 10^7 UFC/mL foi semeado uniformemente sobre a superfície de placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Roseto Degli Abruzzi, Itália). Sobre a superfície do ágar, foram dispostos discos de papel filtro estéreis com 6 mm de diâmetro impregnados com 5 µL do OE de *O. vulgare*. Após 24 h de incubação a 37 °C, foi realizada a medição do diâmetro dos halos de inibição. Os testes foram realizados em triplicata.

Na CBM foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços contendo 50 µL de caldo BHI adicionado de 1% de Tween 80 (Synth, Diadema, Brasil) utilizado para diminuir a tensão superficial no contato do óleo apolar com o meio de cultura polar. No primeiro poço, foram dispensados 50 µL do OE de orégano, sendo realizadas diluições seriadas consecutivas a partir deste, com a retiradas de 50 µL do poço de maior concentração para o de menor concentração após homogeneização, totalizando 8 diluições, atingindo a concentração de 1,95 µL/mL no poço menos concentrado, sendo os últimos 50 µL restantes descartados. Após, foram adicionados 50 µL de cultura bacteriana com aproximadamente $5,0 \times 10^3$ células bacterianas em cada um dos poços, e por fim, poços sem adição do óleo e sem adição do inóculo foram utilizados para controles de multiplicação e de esterilidade, respectivamente.

As placas de microtitulação foram posteriormente incubadas a 37 °C por 48 h e, então, foram retiradas alíquotas de 5 µL de cada uma das cavidades, que foram repicadas em placas de Petri contendo ágar padrão para contagem (PCA, Acumedia, Baltimore, Maryland) e incubadas a 37 °C por 48 h. A ausência de crescimento bacteriano no meio de cultura foi interpretada como indicativo de que o OE apresentou atividade bactericida. A CBM foi considerada como a menor concentração de óleo na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura. Essa análise também foi realizada em triplicata.

Preparação da massa para embutido cárneo e contaminação experimental

A massa para embutido cárneo foi preparada utilizando cortes de copa-lombo suíno adquiridas no comércio local, moídas em moedor manual previamente esterilizado, adicionadas de 0,5% de cloreto de sódio devidamente homogeneizado junto à massa. Foram fracionadas alíquotas de 25 g adicionadas de OE de *O. vulgare* nas concentrações 1 e 1,5%.

Para a contaminação experimental, foi reproduzida a metodologia descrita por Vivian et al. (2020), utilizando três dos isolados mais resistentes verificados na CBM. Alíquotas de 25 g da massa foram contaminadas com inóculo bacteriano de SCN de forma a obter a concentração final de 10^2 células bacterianas por grama de massa, concomitantemente, foram analisadas amostras contaminadas experimentalmente e sem a adição do óleo para controle

positivo, além de amostras não contaminadas e sem o óleo, de forma a verificar a ausência prévia de SCN nas amostras (controle negativo).

Análises microbiológicas

As amostras de massa cárnea contaminadas experimentalmente, bem como os controles, foram armazenadas a 4 °C. Após 0, 24, 48 e 72 horas de estocagem, foi realizada a contagem de SCN em ágar Baird-Parker (Himedia, Mumbai, Índia) após incubação a 37 °C por 48 h. As amostras dos testes de um dos isolados também foram analisadas a fim de comparar a ação do OE de orégano sobre a microbiota contaminante da massa, por meio da contagem de microrganismos mesófilos (Brasil, 2003). Toda as análises foram realizadas em triplicata.

Análise estatística

A análise de variância foi utilizada para verificar o efeito dos tratamentos e o teste de Tukey para comparar as contagens diárias no comportamento de SCN na massa para embutidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antimicrobiana *in vitro*

No teste de disco-difusão em ágar, o OE de *O. vulgare* formou halos maiores que 15 mm frente a todos isolados de SCN (Tabela 1), indicando forte ação inibitória do OE, de acordo com escala estabelecida por Carović-Stanko et al. (2010).

Tabela 1. Tamanho dos halos de inibição (mm) relacionados à atividade antibacteriana do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a isolados de *Staphylococcus coagulase negativa* no teste de disco-difusão em ágar

Isolado	<i>O. vulgare</i> (5µL)*
1	26,7 (1,9)
2	24,0 (1,6)
3	36,7 (4,1)
4	25,3 (1,9)
5	22,0 (1,6)
6	23,3 (1,9)
7	25,3 (0,9)
8	24,0 (0,0)
9	24,0 (1,6)
10	23,3 (2,5)
11	28,0 (0,0)
12	20,7 (0,9)
13	26,7 (1,9)
14	29,3 (0,9)
15	23,3 (1,9)

*Os dados referem-se à média de três repetições com o desvio padrão entre parênteses.

Resultados bem semelhantes ao nosso estudo foram obtidos por Oliveira et al. (2009), que constataram atividade inibitória do OE de *O. vulgare* em dois isolados de SCN obtidos em infecções clínicas, com halos de 28 e 30 mm de diâmetro no teste de disco-difusão em ágar. Saeed & Tariq (2009) também constataram atividade inibitória desse OE em 24 isolados de *S. saprophyticus* (espécie de SCN envolvido em infecções clínicas), que apresentaram em média, halos com 16,8 mm de diâmetro. No entanto, estudos avaliando o efeito deste OE sobre isolados de SCN com a técnica de disco difusão em ágar ainda são muito escassos.

Com relação à CBM, o OE de *O. vulgare* apresentou efeito bactericida contra todos isolados de SCN quando em concentração mínima de 31,2 µL/mL, chegando a ser efetivo sobre alguns isolados em todas as diluições trabalhadas (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração bactericida mínima ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a isolados de *Staphylococcus coagulase negativa*

Isolado	Concentração*
1	1,95
2	15,60
3	15,60
4	1,95
5	1,95
6	7,80
7	3,90
8	3,90
9	7,80
10	31,20
11	3,90
12	3,90
13	3,90
14	7,80

* Os testes foram realizados em triplicata. Quando os valores não foram idênticos nas repetições, foi considerada a maior concentração efetiva no efeito bactericida.

Próximo aos valores encontrados em nosso estudo, Oyarzabal et al. (2011) verificaram a média de CBM de cerca de $10 \mu\text{L}/\text{mL}$ do OE de *O. vulgare*, ao analisar 6 isolados de SCN obtidos de leite mastítico bovino, já Pozzo et al. (2011) utilizaram menor número de diluições e alíquotas mais concentradas do referido OE no teste de CBM em 27 isolados obtidos de amostras de leite mastítico caprino, observando também significativa atividade antimicrobiana. Embora não tenham testado a atividade bactericida, Koca et al. (2018) e Possamai et al. (2019) observaram elevada capacidade bacteriostática do óleo de *O. vulgare* contra isolados de SCN ao avaliar a concentração inibitória mínima (CIM), mesmo quando testado contra cepas multirresistentes a antimicrobianos comerciais.

No entanto, de forma discordante e com o uso da mesma técnica, Oliveira et al. (2009) por sua vez, observaram baixa atividade bacteriostática do óleo em isolados de SCN. Portanto, a maioria dos estudos até o momento indica a efetividade do OE de *O. vulgare* contra isolados de SCN. A única exceção, o trabalho de Oliveira et al. (2009), pode ser devida aos isolados testados, que no caso do nosso estudo foram obtidos da indústria de alimentos e no deles foram obtidos de infecções clínicas, ou ainda a diferenças em relação ao objetivo da técnica, bactericida no nosso trabalho e bacteriostática no de Oliveira et al. (2009). Os resultados do nosso estudo sugerem também que a ação bactericida se dá sobre um largo espectro de isolados, pois utilizamos 15 isolados que, embora não tenham sido identificados taxonomicamente em

nível de espécie, pelos perfis fenotípicos e genotípicos apresentados por Gonçalves (2020), certamente representam uma considerável diversidade de cepas.

Aplicação do óleo essencial de *O. vulgare* na massa para embutido cárneo suíno

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre o tratamento com o óleo e o tratamento controle sem o uso do óleo, o que significa que a presença do óleo resultou em redução significativa das contagens. A diferença entre as concentrações também foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), mostrando que a intensidade de redução nas contagens de SCN difere em função do uso de óleo a 1% ou 1,5%. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,5878$) entre as repetições.

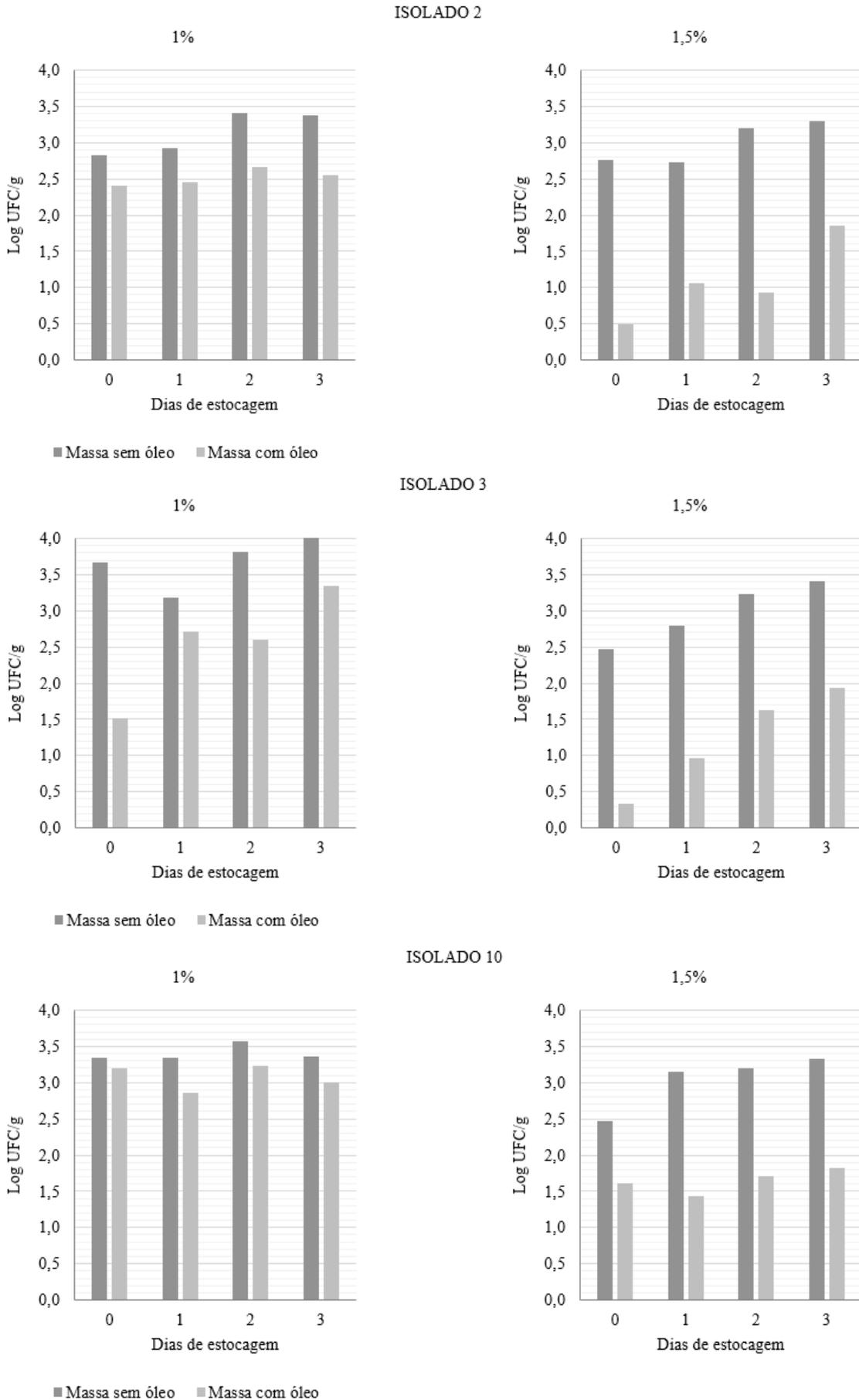


Figura 1. Média de três contagens de *Staphylococcus* coagulase negativa em massa para embutido cárneo suíno experimentalmente contaminado pelo isolado 2, 3 e 10, adicionados de 1% e 1,5% de óleo essencial de *Origanum vulgare*, armazenados a 4°C.

Ainda não foram reportados na literatura os efeitos da aplicação do OE de *O. vulgare* em alimentos experimentalmente contaminados com SCN, sendo o presente estudo o primeiro a verificar o efeito do OE sobre esse grupo de bactérias em matriz alimentar. Alguns autores, no entanto, realizaram experimentos semelhantes com outras bactérias do mesmo gênero. Souza (2017) estudou o efeito do OE de *O. vulgare* sobre SCP em linguiça frescal de frango. Entretanto, este autor não realizou a contaminação experimental de suas matrizes alimentares, observou apenas a ação do OE de *O. vulgare* sobre a população contaminante de SCP, verificando que o OE a 2% foi capaz de impedir o desenvolvimento de SCP nesse alimento. Silva (2010) verificou o efeito do OE de *O. vulgare* incorporado à massa de hambúrguer bovino experimentalmente contaminado por *S. aureus*, constatando que 1% desse óleo foi capaz de reduzir de forma significativa a contagem dessa bactéria. Betta et al. (2013) também constataram o efeito bacteriostático do *O. vulgare* a 2% em carne moída bovina contaminada por *S. aureus*. Apesar das diferenças relativas às espécies, os resultados do nosso estudo indicam que a ação inibitória do OE de *O. vulgare*, já observada sobre SCP nos trabalhos citados, também é efetiva no controle de SCN.

A temperatura de refrigeração não impede a multiplicação de SCN, conforme foi verificado durante os dias de estocagem. Em nosso estudo, deve ser levado em consideração que a contaminação experimental foi realizada com apenas uma espécie de SCN separadamente. Em um alimento naturalmente contaminado, é provável que várias espécies estejam presentes, portanto, as contagens de SCN em conjunto seriam mais elevadas. Também a concentração inicial pode ser maior que a utilizada no nosso estudo, o que contribuiria para o aumento nas contagens. Adicionalmente, condições de armazenagem impróprias podem favorecer a multiplicação dos SCN. Esses fatores isoladamente ou em conjunto podem permitir que os SCN alcancem concentrações no alimento capazes de causar intoxicação no consumidor, o que reforça a justificativa para a utilização de OE de *O. vulgare* na massa para embutidos.

Além da capacidade de diminuir microrganismos indesejáveis, outro aspecto a ser considerado quando se trata da adição de OE em matrizes alimentares é a aceitação pelos consumidores, uma vez que esses óleos possuem alta volatilidade, forte odor e sabor, podendo alterar as características organolépticas da matriz no qual ele é adicionado (Bakkali et al., 2008). Barbosa (2010) e Silva (2015) verificaram boa aceitação dos consumidores à adição de OE de *O. vulgare* em carne bovina moída e hambúrguer, no entanto as concentrações utilizadas foram

bem inferiores às utilizadas no nosso estudo, 0,08 e 0,312%, respectivamente. Mais próximo às concentrações por nós utilizadas, Skandamis & Nychas (2010) verificaram que o sabor de filés de carne foi afetado positivamente pela adição de 1% de OE de *O. vulgare*. No entanto, Vivian et al. (2020) ao adicionarem 1,5% do óleo em massa para embutido cárneo não obtiveram boa aceitação pelos consumidores. Segundo sugerem esses estudos, a concentração de 1%, já efetiva na redução de SCN, não apresentaria problemas no uso em massa para embutidos, porém se a concentração for elevada para 1,5% em busca de um efeito inibitório mais acentuado, a aceitação pelos consumidores pode ser afetada. A adição de outros condimentos ou ingredientes à matriz alimentar pode ser uma alternativa para atenuar o sabor do OE nesses produtos. Outra alternativa é o uso do OE sob outras formas de aplicação, como filmes comestíveis, coberturas, ou ainda a utilização dessa substância em embalagens ou envoltórios, entretanto ainda faltam estudos para verificar a sua eficácia sobre SCN.

Para a contagem de microrganismos mesófilos, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) na redução da contagem de mesófilos entre o tratamento com o óleo e o tratamento sem o uso do óleo quando utilizada a concentração de 1,5% de OE. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado na concentração de 1% ($p = 0,2834$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,5669$ na concentração de 1% e $0,5617$ na concentração de 1,5%) entre as repetições (Figura 2).

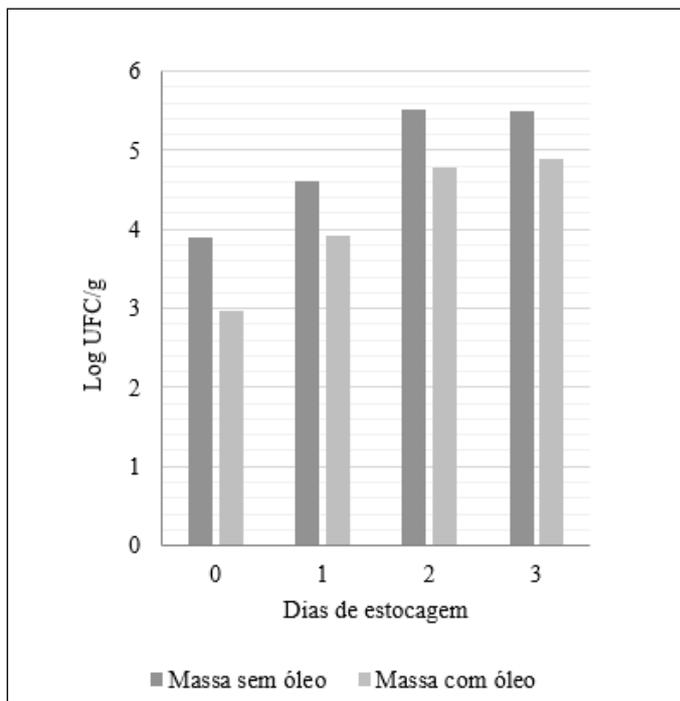


Figura 2. Média de três contagens de microrganismos aeróbios mesófilos em massa para embutido cárneo suíno adicionado de 1,5% de óleo essencial de *Origanum vulgare*, armazenados a 4°C.

Assim como em nosso estudo, Souza et al. (2006) também verificaram diminuição significativa da microbiota autóctone em carne moída bovina após tratamentos com OE de *O. vulgare* em altas concentrações (cerca de 10%). Com exceção das concentrações utilizadas, esse estudo e os resultados obtidos são bastante semelhantes ao nosso, uma vez que o óleo utilizado é do mesmo fabricante e a avaliação da ação do *O. vulgare* se deu ao longo de três dias de refrigeração. Outra semelhança ocorreu no último dia de análise, quando foram constatadas mudanças sensoriais e no aspecto das amostras não tratadas com o OE, enquanto as amostras tratadas com o óleo, tanto a 1 quanto a 1,5%, não apresentaram mudança de cor ou odor perceptíveis, sugerindo que o OE de *O. vulgare* nessas concentrações aparentemente foi eficiente no controle da deterioração da matriz alimentar.

No entanto, Betta et al. (2013) e Barbosa et al. (2009) não verificaram diminuições significativas desses microrganismos também em carne moída bovina, constatando apenas a capacidade bacteriostática do OE de *O. vulgare*, mesmo após a aplicação do óleo nas concentrações máximas de 2 e 0,56%, respectivamente. Diferentemente do nosso trabalho, em ambos os estudos, as análises foram realizadas após 24 h de refrigeração como prazo máximo, não sendo possível verificar o efeito do óleo após um contato mais prolongado com os microrganismos. Além disso, a carne utilizada nesses estudos foi adquirida já moída de mercados locais, com altas contagens iniciais de mesófilos, enquanto a carne utilizada no nosso trabalho foi moída assepticamente em laboratório, de modo a evitar contaminações pela sua manipulação.

Com relação ao comportamento do SCN na massa para embutido cárneo suíno após os 3 dias de estocagem, esses microrganismos foram capazes de se adaptar à matriz alimentar e manterem-se em multiplicação até o 2º dia de estocagem (Figura 3). Os isolados 2 e 3 mantiveram suas contagens estáveis com médias estatisticamente iguais do 2º para o 3º dia de análise, enquanto o isolado 10 apresentou uma queda estatisticamente significativa nesse mesmo período final, resultados que em conjunto, sugerem uma estabilização da multiplicação desses microrganismos.

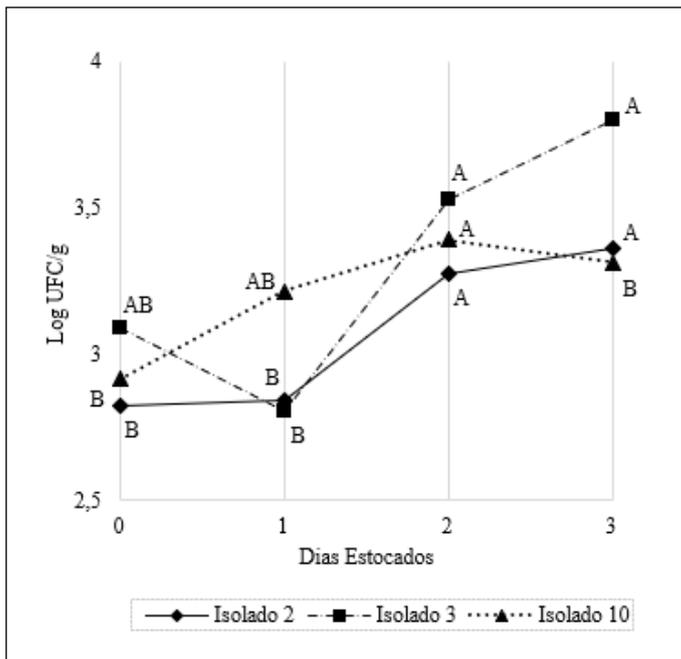


Figura 3. Comportamento de *Staphylococcus* coagulase negativa em massa para embutido cárneo suíno experimentalmente contaminados pelos três isolados (média de três repetições). Médias com letras iguais na mesma linha são estatisticamente iguais ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Esse é o primeiro estudo documentando o comportamento de SCN em massa de embutido cárneo ao longo de três dias de estocagem. Pereira et al. (2001) observaram o comportamento de SCN em leite UHT (*Ultra High Temperature*) e presunto cozido após 24 e 48 h, verificando que as contagens em ambos os alimentos aumentaram em média de 4 Log UFC/mL ou g para 8 Log UFC/mL ou g ao final das 48 h. No nosso estudo, esse aumento foi bem mais discreto ao longo dos primeiros dois dias. Além das diferenças inerentes às matrizes alimentares trabalhadas, no estudo de Pereira et al. (2001) foram utilizados inóculos iniciais de SCN com o dobro da concentração utilizada em nosso trabalho, cerca de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL ou g, além da metodologia para a contagem de SCN em meio Baird-Parker, que foram incubadas por até 72 h. Essas diferenças nas metodologias empregadas podem ter influenciado a multiplicação desses microrganismos, implicando em altas contagens.

CONCLUSÕES

O OE de *O. vulgare* apresenta ação inibitória contra SCN na técnica de disco-difusão em ágar, bem como efeito bactericida na concentração mínima de $31,2 \mu\text{L/mL}$ na técnica da CBM. Quando misturado à massa do embutido cárneo suíno, o OE é eficaz na redução das contagens bacterianas de SCN tanto na concentração de 1,5% como de 1%. Na concentração

de 1,5%, também reduz a população de microrganismos aeróbios mesófilos naturalmente presentes no alimento.

SCN são capazes de se multiplicar no ambiente propiciado pela massa para embutido cárneo suíno até o segundo dia de estocagem, apresentando aparente estabilização nas contagens após esse período.

O OE de *O. vulgare* é eficiente na redução das concentrações de SCN em massa para embutidos cárneos suínos, sendo uma alternativa promissora ao uso de conservantes sintéticos para o controle da contaminação por esses microrganismos. Adicionalmente, pode contribuir para a conservação do alimento através da redução de bactérias mesófilas.

LITERATURA CITADA

Atrib, A.B.; Silveira, D.R.; Timm, C.D. Cobertura de amido de milho com óleo essencial de *Origanum vulgare* para controle de *Vibrio parahaemolyticus* em filés de *Micropogonias furnieri*, Research, Society and Development, v.10, n.8, 2021. <<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17429>>

Barbosa, L.D. Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2010. 107p. Dissertação Mestrado.

Barbosa, L.N.; Rall, V.L.M.; Fernandes, A.A.H.; Ushimaru, P.I.; Probst, I.S.; Fernandes, A. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. Foodborne Pathogens And Disease, v.6, n.6, 2009. <<http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2009.0282>>

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oil: a review. Food and Chemical Toxicology, v.46, n.2, p.446-75, 2008. <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>>

Betta, F.D.; Schittler, L.; Pereira, M.G. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano sobre a flora contaminante de carne moída. VIII Simpósio de alimentos, 2013. <https://www.upf.br/_uploads/Conteudo/simposio-sial-anais/2013/tecnologia/t020.pdf>. 29 Jul. 2021.

Blaiotta, G.; Ercolini, D.; Pennacchia, C.; Fusco, V.; Casaburi, A.; Pepe, O.; Villani, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. Journal of Applied Microbiology, v.97, n.4, p.719-730, 2004. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02349.x>>

Borges, M.F.; Nassu, R.T.; Pereira, J.L.; Andrade, A.P.C.; Kuaye, A.Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. Ciência Rural, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008. <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000500037>>

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água: Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. Diário Oficial da União, Brasília. Seção I, p. 14-51. 2003.

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, n.1, p.9-14, 2002. <<https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0444>>

Carović-Stanko, K.; Orlić, S.; Politeo, O.; Strikić, F.; Kolak, I.; Milos, M. Satovic, Z. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chemistry*, v.119, p.196-201, 2010. <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.010>>

Chajęcka-Wierzchowska, W.; Gajewska, J.; Wiśniewski, P.; Zadernowska, A. Enterotoxigenic Potential of Coagulase-Negative Staphylococci from Ready-to-Eat Food. *Pathogens*, v.9, n.9, p.734-746, 2020. <<https://doi.org/10.3390/pathogens9090734>>

Cho, H.T.; Salvia-Trujillo, L.; Kim, J.; Park, Y.; Xiao, H.; McClements, D.J. Droplet size and composition of nutraceutical nanoemulsions influences bioavailability of long chain fatty acids and Coenzyme Q10. *Food Chemistry*, v.156, p.117-122, 2014. <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.084>>

Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

Gonçalves, T.G. *Staphylococcus* coagulase negativa potencialmente patogênicos isolados do fluxograma de abate de suínos. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2020. 46p. Dissertação Mestrado.

Goulart, A.R.; Lacerda, I.C.A.; Dias, R.S. Potencial risco de intoxicação alimentar por *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos isolados de bolos com cobertura e recheio. *NBC- Periódico Científico do Núcleo de Biociências*, v.6, n.11, p.11-17, 2016. <<http://dx.doi.org/10.15601/2238-1945/pcnb.v6n11p11-17>>

Koca, T.; Koca, Ö.; Korkum, A.F. Antimicrobial activities of essential oils on microorganisms isolated from radiation dermatitis. *Journal of clinical and analytical medicine*, v.10, n.3, p.307-310, 2019 <<http://doi.org/10.4328/JCAM.6132>>

Lamaita, H.C.; Cerqueira, M.O.P.; Carmo, L.S.; Santos, D.A.; Penna, C.F.A.M.; Souza, M.R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.5, p.702-709, 2005. <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000500017>>

Martucci, J.F.; Gende, L.B.; Neira, L.M.; Ruseckaite, R.A. Orégano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, v.71, p.205-213, 2015. <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.079>>

- Mello, G.S.; Rosa, J.F.; Silveira, D.R.; Vivian, P.G.; Cereser, N.D.; Timm, C.D. Antimicrobial activity of essential oils of *origanum vulgare* and *ocimum basilicum* against *vibrio parahaemolyticus* and *vibrio vulnificus* and addition of these oils on *mugil platanus* filets, Boletim do instituto de pesca, v.46, n.4, 2020. <<https://doi.org/10.20950/1678-2305.2020.46.4.608>>
- Morente, E.O.; Ruiz, A.G.P.; Pulido, R.P. *Staphylococcus*: Detection. Encyclopedia of food and health. Encyclopedia of Food and Health. p. 128-132, 2016.
- Negi, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology, v.156, p.7-17, 2012. <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>>
- Oliveira, J.L.T.M.; Diniz, M.F.M.; Lima, E.O.; Souza, E.L.; Trajano, V.N.; Santos, B.H.C. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. Essential oils in Inhibiting the Growth of Bacterial Strains Isolated from the Patients with Conjunctivitis. Brazilian Archives Of Biology And Technology, v.52, n.1, p.45-50, 2009. <<https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000100006>>
- Oswell, N.J.; Thippareddi, H.; Pegg, R.B. Practical use of natural antioxidants in meat products in the U.S.: A review. Meat Science, v.145, n.1, p.469-479, 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.020>>
- Oyazabal, M.E.B.; Schuch, L.F.D.; Prestes, L.S.; Schiavon, D.B.A.; Rodrigues, M.R.A.; Mello, J.R.B. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* ante bacterias aisladas em leche de bovino. Revista Cubana de Plantas Medicinales, v.16, n.3, p.260-266, 2011. <<https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2011/cpm113f.pdf>>
- Pereira, M.L.; Carmo, L.S.; Pereira, J.L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.21, n.2, p.171-175, 2001. <<https://doi.org/10.1590/S0101-20612001000200009>>
- Piette, A.; Verschraegen, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Veterinary Microbiology, v.134, n.1-2, p.45-54, 2009. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.009>>
- Possamai, M.C.F.; Santos, I.C.; Silva, E.S.; Gazim, Z.C.; Gonçalves, J.E.; Soares, A.A.; Germano, R.M.; Fanin, M.; Sá, T.C.; Otutumi, L.K. *In vitro* bacteriostatic activity of *Origanum vulgare*, *Cymbopogon citratus*, and *Lippia alba* essential oils in cat food bacterial isolates. Semina: Ciências Agrárias, v.40, n.6, p.3107-3122, 2019. <<http://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p3107>>
- Pozzo, M.D.; Viégas, J.; Santurio, D.F.; Rossatto, L.; Soares, I.H.; Alves, S.H.; Costa, M.M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. Ciência Rural, v.41, n.4, 2011. <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000029>>

Rapini, L.S.; Cerqueira, M.M.O.P.; Carmo, L.S.; Veras, J.F.; Souza, M.R. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.6, p.825-829, 2005. <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000600019>>

Saeed, S. & Tariq, P. Antibacterial Activity Of Oregano (*Origanum Vulgare* Linn.) Against Gram Positive Bacteria. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.22, n.4, p.421-424, 2009. <https://www.probotanic.com/pdf/Origanum_ulje.pdf>. 22 Jul. 2021.

Silva, M.E.T. Extração, caracterização e avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais como potencial conservante em produto cárneo. Limoeiro do Norte: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 2015. 124p. Dissertação Mestrado.

Silva, N.; Alves, S.; Goncalves, A.; Amaral, J.S.; Poeta, P. Antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food science and technology international*, v.19, n.6, p.503-510, 2013. <<https://doi.org/10.1177/1082013212442198>>

Silva, T.M. Aplicação de quitosana e óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare l.*) na inibição de *Staphylococcus aureus* em hambúrguer. Vitória de santo Antão: Universidade Federal de Pernambuco, 2010. 27p. Trabalho de Conclusão de Curso.

Skandamis, P.N. & Nychas, G.J.E. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplants salad at various temperatures, pHs, and orégano essential oil concentrations, *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.4, p.1646-53, 2000. <<https://doi.org/10.1128/aem.66.4.1646-1653.2000>>

Souza, E.L.; Stamford, T.L.M.; Lima, E.O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare l.* (lamiaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.527-532, 2006. <<https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400023>>

Souza, R.S. Elaboração de Linguiça Frescal de frango adicionada de óleos essenciais. Montes Claros: Universidade Federal de Minas Gerais, 2017. 80p. Dissertação Mestrado.

Timm, C.D.; Lima, H.G.; Cereser, N.D. Manual de Técnicas Microbiológicas em Leite e Derivados. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2017. 85p.

Ünal, N. & Çinar, O.D. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantón–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastites. *Tropical Animal Health and Production*, v.44, p.369-375, 2012. <<https://doi.org/10.1007/s11250-011-0032-x>>

Ulusoy, B.; Hecer, C.; Kaynarca, D.; Berkan, S. Effect of Oregano Essential Oil and Aqueous Oregano Infusion Application on Microbiological Properties of Samarella (Tsamarella), a Traditional Meat Product of Cyprus. *Foods*, v.7, n.4, p.1-9, 2018. <<https://doi.org/10.3390/foods7040043>>

Veras, J.F.; Carmo, L.S.; Tong, L.C.; Shupp, J.W.; Cummings, C.; Santos, D.A.; Cerqueira, M.M.O.P., Cantini, A.; Nicoli, J.R.; Jett, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, v.12, p.410—415, 2008. <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2007.09.018>>

Vieira, T.R. Pesquisa de *staphylococcus* spp. coagulase negativa em queijo colonial inspecionado: identificação, perfil de genes de enterotoxinas clássicas e de resistência à penicilina e à metilicina. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017. 84p. Dissertação Mestrado.

Vivian, P.G.; Mello, G.; Porto, R.; Timm, C.D.; Gandra, E.A.; Freitag, R.A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) e sua aplicação em massa para embutido cárneo. *Brazilian Journal of Development*, v.6, n.8, p.62143-62156, 2020. <<http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n8-587>>

3 Considerações Finais

O OE de *O. vulgare* apresenta atividade inibitória contra isolados de SCN potencialmente enterotoxigênicos obtidos em fluxograma de abate suíno pela técnica de disco-difusão em ágar, bem como apresenta uma baixa concentração bactericida mínima frente a todos isolados pela técnica da CBM.

Quando aplicado na massa de embutido cárneo suíno, o OE é eficaz para reduzir significativamente as contagens bacterianas dos três isolados de SCN tanto na concentração de 1,5%, quanto na concentração de 1%, sendo este o primeiro trabalho relatando os efeitos da aplicação do OE de *O. vulgare* em matriz alimentar experimentalmente contaminada com SCN. O OE na concentração de 1,5% também é capaz de reduzir a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos naturalmente presentes na massa para embutido cárneo suíno.

SCN possuem capacidade de se multiplicar no ambiente propiciado pela massa para embutido cárneo suíno até o segundo dia de estocagem, os resultados de dois dos três isolados estudados sugerem que entre o segundo e terceiro dia houve uma estabilização da multiplicação desses microrganismos, sendo este também o primeiro estudo documentando o comportamento de SCN em massa para embutido cárneo suíno ao longo de três dias de estocagem. Porém, mais pesquisas avaliando diferentes matrizes alimentares contaminadas por SCN devem ser desenvolvidas.

A utilização do OE de *O. vulgare* para a redução das concentrações de SCN potencialmente enterotoxigênicos em massa para embutido cárneo suíno é, portanto, uma alternativa promissora ao uso de conservantes químicos sintéticos para controlar a contaminação por esses microrganismos, bem como contribuir para a conservação da matriz alimentar por meio da redução de microrganismos aeróbios mesófilos, implicando em uma prolongação do tempo de prateleira desse alimento. No entanto, mais estudos relacionando a concentração do *O. vulgare* e a aceitação pelos consumidores da matriz alimentar adicionada de OE devem ser realizados a fim de tornar a incorporação desse aditivo aplicável.

Referências

ABCS. Associação Brasileira de Criadores de Suínos. **Carne Suína: A atual visão do consumidor – Análises, tendências, desafios e oportunidades**. Disponível em: <http://abcsnews.com.br/wp-content/uploads/2019/09/Estudo-de-mercado_Web_lock.pdf> Acesso em: 17 de mar de 2021.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual de 2020**. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf> Acesso em: 17 de mar de 2021

BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-75, 2008.

BARBOSA, N. L. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservantes em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. 2010. 121f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

BARBOSA, L. N.; RALL, V. L. M.; FERNANDES, A. A. H.; USHIMARU, P. I.; PROBST, I. S.; FERNANDES, A. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 6, n. 6, 2009.

BATALHA, M. O.; SILVA, A. L. **Gerenciamento de sistemas agroindustriais: definições, especificidades e correntes metodológicas**. 3 ed. São Paulo: Atlas, 2007. 62p.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014.

BETTA, F. D.; SCHITTLER, L.; PEREIRA, M. G. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano sobre a flora contaminante de carne moída. **VIII Simpósio de alimentos**, 2013.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 719–730, 2004.

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

BOTELHO, C.V. ***Staphylococcus coagulase positiva E Staphylococcus aureus resistentes a antibióticos em cadeia produtiva de carne suína.*** 2017. 87f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água:** Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. Diário Oficial da União, Brasília. Seção I, p. 14-51. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **RDC nº 12**, de 2 de janeiro de 2001. **Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2001.

BRASIL, Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2019. Disponível em <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>> Acesso em 14 jun. 2021.

CAMPOS, R. M. L. de; HIERRO, E.; ORDÓNEZ, J. A.; BERTOL, T. M.; HOZ, L. A note on partial replacement of maize with rice bran in the pig diet on meat and back fat fatty acids. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 15, p. 427-433, 2006.

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

CAROVIC´-STANKO, K.; ORLIC´, S.; POLITEO, O.; STRIKIC´, F.; KOLAK, I.; MILOS, M. SATOVIC, Z. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v. 119, p. 196–201, 2010.

CASTRONOVO, L. M.; CALONICO, C.; ASCRIZZI, R.; DEL DUCA, S.; DELFINO, V.; CHIOCCIOLI, S.; VASSALLO, A.; STROZZA, I.; DE LEO, M.; BIFFI, S.; BACCI, G.; BOGANI, P.; MAGGINI, V.; MENGONI, A.; PISTELLI, L.; LO NOSTRO, A.; FIRENZUOLI, F.; FANI, R. The Cultivable Bacterial Microbiota Associated to the Medicinal Plant *Origanum vulgare* L.: From Antibiotic Resistance to Growth-Inhibitory Properties. **Fontiers in Microbiology**, v. 11, n. 862, p. 2020.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; GAJEWSKA, J.; WI´SNIEWSKI, P.; ZADERNOWSKA, A. Enterotoxigenic Potential of Coagulase-Negative *Staphylococci* from Ready-to-Eat Food. **Pathogens**, n. 9, v. 9, p. 734-746, 2020.

CHO, H. T.; SALVIA-TRUJILLO, L.; KIM, J.; PARK, Y.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Droplet size and composition of nutraceutical nanoemulsions influences bioavailability of long chain fatty acids and Coenzyme Q10. **Food Chemistry**, v.156, p.117-122, 2014.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; SALLIS, E. S.; ANTUNES, T. A.; MATTEI, A.; RODRIGUES, M. R.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. R. Toxicidade Pré-Clínica em Doses Repetidas do Óleo Essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em Ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 704-709, 2008.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v.71, n.1, p.1-20, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CIRINO, I. C. S.; MENEZES-SILVA, S. M. P.; SILVA, H. T. D.; SOUZA, E. L.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. The Essential Oil from *Origanum vulgare* L. and Its Individual Constituents Carvacrol and Thymol Enhance the Effect of Tetracycline against *Staphylococcus aureus*. **Chemotherapy**, v. 60, n. 5-6, p. 290-293, 2014.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N; POLISSIOU, M.G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2576-81, 2000.

DOS ANJOS, C. M.; GOIS, F. D.; PEREIRA, C. M. C. Desmistificando a carne suína. **Pubvet**, v. 12, n. 12, p. 1-9, 2018.

EMBRAPA. **Central de inteligência de aves e suínos**, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/brasil>. Acesso em: 14 jun. 2021.

FERREIRA, A.; MENDONÇA, R. C. S.; SOUZA TETTE, P. A.; DE SOUZA, A. S.; CARVALHO, M. M. Identificação fenotípica e genotípica de cepas de estafilococos oriundas de uma unidade de abate de aves. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 2, p. 50-58, 2018.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Ed. Atheneu: São Paulo, 2005, 182p.

GARCIA-DIEZ, J.; ALHEIRO, J.; PINTO, A., L.; SOARES, L.; FALCO, V.; FRAQUEZA, M. J. Influence of Food Characteristics and Food Additives on the Antimicrobial Effect of Garlic and Oregano Essential Oils. **Foods**, v. 6, n. 44, p. 1-10, 2017.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.

GONÇALVES, T. G. **Staphylococcus coagulase negativa potencialmente patogênicos isolados do fluxograma de abate de suínos**. 2020. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

GOULART, A. R.; LACERDA, I. C. A.; DIAS, R. S. Potencial risco de intoxicação alimentar por *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos isolados de bolos com cobertura e recheio. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v.6, n.11, p.11-17, 2016.

GOTLIEB, O. New and underutilized plants in the Americas: solution to problems of inventory through systematics. **Interciência**, v. 6, n. 1, p. 22-29, 1981.

HORTA, F. C.; ECKHARDT, O. H. O.; GAMEIRO, A. H.; MORETT, A. S. Estratégias de sinalização da qualidade da carne suína ao consumidor final. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 16, n. 1-4, p. 15-21, 2010.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, n. 12, p.1-24, 2012.

KOCA, T.; KOCA, Ö.; KORKUM, A. F. Antimicrobial activities of essential oils on microorganisms isolated from radiation dermatitis. **Journal of clinical and analytical medicine**, v. 10, n. 3, p. 307-310, 2019.

KRISHNAN, K. R; BABUSKIN, S; BABU, P. A.; FAYIDH, M. A.; SABINA, K; ARCHANA, G. Bio protection and preservation of raw beef meat using pungent aromatic plant substances. **Journal of the science of food and agriculture**. v. 94, n. 12, p.2456–63, 2014.

KÜREKCI, C. Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2675–2679, 2016.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.

LEE, K. A.; HARNETT, J. E.; CAIRNS, R. Essential oil exposures in Australia: analysis of cases reported to the NSW Poisons Information Centre. **Medical Journal of Australia**, v. 212, n. 3, p. 132-133, 2019.

LEITE, A. E. L. M.; ARAÚJO, K. L.; MEDEIROS, E. S.; SILVA, E. R.; MENDONÇA, M. Identificação de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de queijo mussarela e fatiadores de frios. **Higiene Alimentar**, v. 33, n. 288/289, p. 1878-1882, 2019.

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

LUZ, I. S.; GOMES NETO, N. J.; TAVARES, A. G.; NUNES, P. C.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Lack of induction of direct protection or cross-protection in *Staphylococcus aureus* by sublethal concentrations of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol in a meat-based medium. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 8, p. 587-593, 2013.

MARTUCCI, J. F.; GENDE, L. B.; NEIRA, L. M.; RUSECKAITE, R. A. Orégano and lavender essential oils as antioxidante and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**, v.71, p.205-213, 2015.

MELLO, G. S.; ROSA, J. F.; SILVEIRA, D. R.; VIVIAN, P.G.; CERESER, N. D.; TIMM, C. D. Antimicrobial activity of essential oils of *origanum vulgare* and *ocimum basilicum* against *vibrio parahaemolyticus* and *vibrio vulnificus* and addition of these oils on *mugil platanus* fillets, **Boletim do instituto de pesca**, v.46, n.4, 2020.

MORENTE, E. O.; RUIZ, A. G. P.; PULIDO, R. P. *Staphylococcus*: Detection. Encyclopedia of food and health. **Encyclopedia of Food and Health**. p. 128-132, 2016.

NANOUKON, C.; ARGEMI, X.; SOGBO, F.; OREKAN, J.; KELLER, D.; A_OLABI, D.; SCHRAMM, F.; RIEGEL, P.; BABA-MOUSSA, L.; PRÉVOST, G. Pathogenic features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and community infections in Benin. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 1, n. 307, p. 75–82, 2017.

NASCIMENTO, A. L. D. R. **Ação antimicrobiana do extrato de *Eugenia Uniflora* L. (Pitanga) sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli***. 2013, 29 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmacologia) – Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.156, p.7-17, 2012.

NUNES, M. M.; CALDAS, E. D. Preliminary quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus* enterotoxins in fresh Minas cheese, a popular food in Brazil. **Food Control, Guildford**, v. 73, p. 524-531, 2017.

OLIVEIRA, J. L. T. M.; DINIZ, M. F. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAJANO, V. N.; SANTOS, B. H. C. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. Essential oils in Inhibiting the Growth of Bacterial Strains Isolated from the Patients with Conjunctivitis. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v.52, n.1, p.45-50, 2009.

OSWELL, N. J.; THIPPAREDDI, H.; PEGG, R. B. Practical use of natural antioxidants in meat products in the U.S.: A review. **Meat Science**, n. 1, v. 145, p. 469-479, 2018.

OYARZABAL, M. E. B.; SCHUCH, L. F. D.; PRESTES, L. S.; SCHIAVON, D. B. A.; RODRIGUES, M. R. A.; MELLO, J. R. B. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* ante bacterias aisladas em leche de bovino. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 16, n. 3, p. 260-266, 2011.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da carne**. 2. ed. Goiânia, 2001. 623p.

PASSOS, E. C.; ALMEIDA, A. S.; MELLO, A. R. P. Presença de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em surto de toxinfecção alimentar ocorrido na região do Vale do Ribeira. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 4, p. 713-717, 2012.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L.S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2001.

PIETTE, A.; VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 45-54, 2009.

PODKOWIK, M.; PARK, J. Y.; SEO, K. S.; BYSTRONÍ, J.; BANIA, J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative *Staphylococci*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 1, n. 163, p. 34-40, 2013.

POSSAMAI, M. C. F.; SANTOS, I. C.; SILVA, E. S.; GAZIM, Z. C.; GONÇALVES, J. E.; SOARES, A. A.; GERMANO, R. M.; FANIN, M.; SÁ, T. C.; OTUTUMI, L. K. *In vitro* bacteriostatic activity of *Origanum vulgare*, *Cymbopogon citratus*, and *Lippia alba* essential oils in cat food bacterial isolates. **Semina: Ciências Agrárias**, v.40, n.6, p.3107-3122, 2019.

POZZO, M. D.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I. H.; ALVES, S.H.; COSTA, M.M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, 2011.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 3. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2015, 1231p.

RALL, V. L. M.; SFORCIN, J. M.; DEUS, M. F. R.; SOUSA, D. C.; CAMARGO, C. H.; GODINHO, N. C.; GALINDO, L. A.; SOARES, T. C. S.; ARAÚJO JR, J. P. Polymerase chain reaction detection of enterotoxinas genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian minas cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 9, p. 1121-1123, 2010.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

RAPINI, L.S.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; VERAS, J.F.; SOUZA, M.R. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.825-829, 2005.

ROÇA, R.O. **Composição Química da Carne**. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Gestaoetecnologia/Teses/Roca102.pdf>> Acesso em: 16 Mar. 2021.

SAEED, S.; TARIQ, P. Antibacterial activity of oregano (*origanum vulgare* linn.) against gram positive bacteria. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, Karachi, v. 22, n. 4, p. 421-424, 2009.

SCHLEIFER, K. H.; BELL, J. A. **Staphylococcus Bergey's Manual of Arquea and Bacteria**, 2. ed. London New York. v. 3, p. 1445, 2015.

SILVA, M. E. T. **Extração, caracterização e avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais como potencial conservante em produto cárneo**. 2015. 124f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Limoeiro do Norte, 2015.

SILVA, N.; ALVES, S.; GONCALVES, A.; AMARAL, J. S.; POETA, P. Antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. **Food science and technology international**, v. 19, n. 6, p. 503-510, 2013.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5º Ed., Blucher, 560 p., 2017.

SILVA, T. M. **Aplicação de quitosana e óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) na inibição de *Staphylococcus aureus* em hambúrguer**. 2010. 27f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de santo Antão 2010.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplants salad at various temperatures, pHs, and orégano essential oil concentrations, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1646-53, 2000.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 527-532, 2006.

SOUZA, R.S. **Elaboração de Linguiça Frescal de frango adicionada de óleos essenciais**. 2017. 80f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Curso de mestrado em produção animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2017.

SOVINSKI, A. I. **Perfil genotípico e fenotípico da resistência à antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* em cadeia produtiva de carne suína**. 2019. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2019.

TIMM, C. D.; DE LIMA, H. G.; CERESER, N. D. **Manual de Técnicas Microbiológicas em Leite e Derivados**. Pelotas: UFPel, 2017. 85 p.

ÜNAL, N.; ÇINAR, O. D. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantón–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 2, p. 369-375, 2012.

ULUSOY, B.; HECER, C.; KAYNARCA, D.; BERKAN, S. Effect of Oregano Essential Oil and Aqueous Oregano Infusion Application on Microbiological Properties of Samarella (Tsamarella), a Traditional Meat Product of Cyprus. **Foods**, v. 7, n. 4, p. 1-9, 2018.

USDA. United States Department of Agriculture. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> Acesso em: 17 mar. 2021.

VAN HAUTE, S.; RAES, K.; VAN DER MEEREN, P. Sangers a The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. **Food Control**, v. 68, p. 30-39, 2016.

VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P., CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.410—415, 2008.

VERNIN, G.; LAGEOT, C.; GAYDOU, E. M.; PARKANYI, C. Analysis of essential oil of *Lippiagraveolens* HBK from El Salvador. **Flavour Fragrance Journal**, v. 16, p. 219-226, 2001.

VIEIRA, T. R. **Pesquisa de *staphylococcus* spp. coagulase negativa em queijo colonial inspecionado: identificação, perfil de genes de enterotoxinas clássicas e de resistência à penicilina e à meticilina**. 2017. 84f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

VIVIAN, P. G.; MELLO, G.; PORTO, R.; TIMM, C. D.; GANDRA, E. A.; FREITAG, R. A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Ocimum basilicum* (manjericão) e sua aplicação em massa para embutido cárneo. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 62143-62156, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Update 2011. Disponível em: <<https://bit.ly/3oYjd5k>> Acesso em: 01 jul. 2021.