



DANILO FLORISVALDO BRUGNERA

**RICOTA: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E
USO DE ESPECIARIAS NO CONTROLE DE
*Staphylococcus aureus***

LAVRAS – MG

2011

DANILO FLORISVALDO BRUGNERA

**RICOTA: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E USO DE ESPECIARIAS
NO CONTROLE DE *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Coorientador

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

LAVRAS – MG

2011

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

Brugnera, Danilo Florisvaldo.

Ricota : qualidade microbiológica e uso de especiarias no controle de *Staphylococcus aureus* / Danilo Florisvaldo Brugnera. – Lavras : UFLA, 2011.

106 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Microbiologia. 2. Antimicrobianos. 3. *Origanum vulgare*. 4. *Salvia officinalis*. 5. Queijo ricota. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 637.352

DANILO FLORISVALDO BRUGNERA

**RICOTA: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E USO ESPECIARIAS NO
CONTROLE DE *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2011.

Dra. Sandra Maria Oliveira Morais Veiga UNIFAL

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves UFLA

Dr. João de Deus Souza Carneiro UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Orientadora

LAVRAS – MG

2011

*A Deus, por todo amor e misericórdia, por abençoar e iluminar minha vida e
por sempre me proteger.*

*À vovó Umbelina (in memorian), pois, sei que, independente de onde ela esteja,
certamente, está orgulhosa por mais esta conquista.*

*Aos meus pais, Florisvaldo e Isabel, pelo incentivo, compreensão, por todo
sacrifício realizado e os quais me permitiram mais esta conquista.*

À Michelle, minha irmãzinha, exemplo de garra e determinação.

À Máira, pelo amor e companheirismo durante mais esta etapa.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

À Profa. Roberta pela orientação, oportunidades, amizade, confiança e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. José Guilherme pelas valiosas contribuições e orientação na análise estatística.

Ao Prof. João de Deus pelas sugestões e contribuições na análise sensorial.

À Profa. Sandra por ter aceitado o convite de última hora, pela atenção e contribuições.

Ao Prof. Luiz Ronaldo de Abreu por ceder o Laboratório de Laticínios para a fabricação das ricotas e realização das análises físico-químicas.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pela doação do microrganismo utilizado no experimento.

À Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande (Lavras, Minas Gerais, Brasil) pelo fornecimento do soro de leite.

Aos meus pais, Florisvaldo e Isabel (Cidinha), por todo carinho, incentivo, compreensão e oportunidade.

À Michelle (Minina), minha irmãzinha, exemplo de garra e determinação que, mesmo estando longe, sempre se fez presente.

À Mãira pelo amor, companheirismo, compreensão, ajuda durante todos esses anos e por estar ao meu lado em todos os momentos pelos quais passei, dando-me força e apoiando-me.

À minha sogra Beth, pela torcida e apoio.

Ao Django, por estar sempre me esperando contente em casa, ao final de cada dia de trabalho, pela amizade e pelos momentos de descontração.

À Creuza, Marcel e Otávio pelo auxílio na fabricação das ricotas e análises físico-químicas.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, especialmente à Alessandra (Guria), Adriano, Thaís, Fausto, Elisângela (Lili), pela amizade e convivência durante o mestrado.

Aos estagiários e bolsistas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial à Tenille, Nádia e Natália pela ajuda nas análises microbiológicas e avaliação sensorial. À Kátia pela ajuda na avaliação sensorial.

À Eliane pelos anos de convivência e auxílio nas análises.

Aos funcionários do DCA, em especial à Lucilene por toda atenção e bondade.

Aos irmãos da equipe Chekmatt, em especial ao Mestre Max Campos, pelas palavras, ensinamentos e amizade.

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

A ricota é um queijo suave, não maturado, elaborado de soro ou de mistura de soro e leite bovino pasteurizado integral ou desnatado. É considerado um dos produtos que apresenta as melhores condições para o desenvolvimento de microrganismos, que se deve às suas características intrínsecas, como alta atividade de água e disponibilidade de nutrientes. Além disso, por ser muito manipulado, durante a fabricação, está propenso a inúmeras fontes de contaminação, caso práticas higiênico-sanitárias adequadas não sejam adotadas. Este estudo foi conduzido em duas partes. A primeira delas objetivou avaliar a qualidade microbiológica de ricotas comercializadas em Lavras, Minas Gerais, Brasil. Já a segunda consistiu em pesquisar o efeito antibacteriano de *Origanum vulgare* e *Salvia officinalis* no controle de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxina A em ricota cremosa e aceitação sensorial das ricotas elaboradas com diferentes concentrações de especiarias. Das 28 amostras analisadas, na primeira etapa deste estudo, 67,85 % apresentaram contagens acima dos padrões da RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para coliformes termotolerantes e 42,85% apresentara-se acima dos padrões para estafilococos coagulase positiva. Todas as amostras apresentaram ausência de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. Com base nestes resultados, conclui-se que a qualidade microbiológica das ricotas disponíveis é, em sua maioria, imprópria, o que requer, além de adoção de boas práticas de fabricação, o desenvolvimento de alternativas de controle bacteriano. Para o estudo da atividade antibacteriana de *O. vulgare* e *S. officinalis* em ricota o microrganismos alvo foi *S. aureus*, sendo utilizado Delineamento Composto Central Rotacional com três variáveis. Foram selecionados cinco níveis de temperatura (7,3 – 20,7 °C), concentração de *O. vulgare* (0 - 3,4% m/m) e concentração de *S. officinalis* (0 - 3,4% m/m). *S. aureus*, inoculado previamente nas amostras, foi quantificado após 12, 24, 120 e 240 horas e os resultados avaliados pela metodologia de superfície de resposta (MSR). Enterotoxina A foi analisada após 24, 120 e 240 horas. Por último, ricotas contendo diferentes concentrações de especiarias foram elaboradas e avaliadas sensorialmente por teste de aceitação. Pela MSR observou-se que as especiarias inibiram o crescimento de *S. aureus* em ricota, com diferentes padrões dependendo da concentração e temperatura. Em algumas amostras a enterotoxina A não foi detectada. Quanto aos aspectos sensoriais, houve maior preferência pelas ricotas com baixas concentrações de especiarias. Esta parte do estudo comprova que as especiarias são potenciais antibacterianos naturais no controle de *S. aureus* em ricota.

Palavras-chave: Ricota. Microbiologia. Qualidade. *Staphylococcus aureus*. Enterotoxina A. *Origanum vulgare*. *Salvia officinalis*.

ABSTRACT

Ricotta is a soft non-matured cheese, elaborated from whey or from a whey and pasteurized whole or skimmed bovine milk mixture. It is considered one of the products that presents the best conditions for microorganism development, which is due its intrinsic characteristics, such as high water activity and nutrient availability. Furthermore, for being highly manipulated during production, it is prone to countless sources of contamination when appropriate hygienic-sanitary practices are not adopted. This study was conducted in two parts. The first aimed to evaluate the microbiological quality of ricottas marketed in Lavras, Minas Gerais, Brazil. The second consisted of researching the antibacterial effect of *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* on the control of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin A production in creamy ricotta and the sensorial acceptance of the ricottas elaborated with different concentrations of spices. Of the 28 samples analyzed in the first stage of this study, 67.85% presented counts above the RDC No. 12 norms, of January 2, 2001, of the National Agency of Sanitary Surveillance for thermotolerant coliforms and 42.85% were above the standard for coagulase-positive staphylococci. All of the samples presented an absence of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes*. Based on these results, we concluded that the microbiological quality of the available ricottas is, in the majority, inappropriate, which requires, besides the adoption of good production practices, the development of alternative bacterial controls. For the study of the antibacterial activity of *O. vulgare* and *S. officinalis* in ricotta the target microorganism was *S. aureus*, using a Central Composite Rotational Design with three variables. Five temperature levels were selected (7.3-20.7 °C), concentration of *O. vulgare* (0 – 3.4% m/m) and concentration of *S. officinalis* (0 – 3.4% m/m). *S. aureus*, previously inoculated in the samples was quantified after 12, 24, 120 and 240 hours and the results appraised by the response surface methodology (RSM). Enterotoxin A was analyzed after 24, 120 and 240 hours. Finally, ricottas containing different concentrations of spices were elaborated and appraised sensory by the acceptance test. By the RSM it was observed that the spices inhibited *S. aureus* growth in ricotta, with different standards depending on the concentration and temperature. In some samples the enterotoxin A was not detected. As for the sensorial aspects, there was higher preference for the ricottas with low spice concentrations. This aspect of the study proves that the spices are potential natural antibacterials in the control of *S. aureus* in ricotta.

Keywords: Ricotta. Microbiology. Food safety. *Staphylococcus aureus*. Enterotoxin A. *Origanum vulgare*. *Salvia officinalis*.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Ricota	13
2.1.1	Qualidade microbiológica	14
2.1.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>.....	17
2.1.2	Atividade antimicrobiana de especiarias e aplicação em alimentos	20
2.1.2.1	<i>Origanum vulgare</i> L.	24
2.1.2.2	<i>Salvia officinalis</i> L.....	27
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
	REFERÊNCIAS.....	31
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	43
	ARTIGO 1 Microbiological risks associated to ricotta consumption	43
	ARTIGO 2 Especiarias no controle de <i>Staphylococcus aureus</i> em queijo ricota.....	62
	ANEXOS.....	98

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A ricota é um queijo suave, não maturado, que foi tradicionalmente produzido na Itália considerando o leite de ovelha. Na atualidade, atingiu maior popularidade, sendo elaborado de soro ou de mistura de soro e leite bovino pasteurizado integral ou desnatado (FARKYE, 2004). É considerado um dos produtos que apresenta as melhores condições para o desenvolvimento e crescimento de microrganismos, como *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e termotolerantes. Isso se deve, principalmente, à disponibilidade de nutrientes, como sais minerais e lactose, entre outros, o que compromete a qualidade do produto em sua vida de prateleira (MAIA; FERREIRA; ABREU, 2004).

Surtos e casos esporádicos de toxinose por *S. aureus*, atribuídos ao consumo de produtos lácteos, contendo enterotoxinas pré-formadas, principalmente queijos, têm sido relatados em vários países (CARMO et al., 2002; OSTYN et al., 2010). As enterotoxinas A e D (SEA e SED) são as que se destacam em surtos de toxinfecções alimentares, podendo ser encontradas um único tipo de enterotoxina ou combinações (TRANter, 1990). Alguns autores mencionam que a enterotoxina A é a mais comumente encontrada em surtos relacionados a alimentos (CHA et al., 2006; KÉROUANTON et al., 2007). Segundo Tirado e Schimdt (2001), em se tratando do cenário epidemiológico mundial, *S. aureus* é considerado a terceira causa mais relevante de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Dados da *European Food Safety Authority - EFSA* (2010) relatam que em 2008 ele foi considerado a quarta maior causa de toxinfecções alimentares na União Europeia.

Como forma de garantir a segurança microbiológica dos alimentos, muitas vezes, as indústrias se deparam com a necessidade da utilização de aditivos químicos para o controle do crescimento microbiano. No entanto, um dos grandes problemas dos aditivos químicos, como conservantes, antioxidantes e corantes, são as consequências que estes podem trazer ao corpo humano. Os danos provocados, ainda, são objeto de pesquisas, porém, verifica-se que existem casos de reações alérgicas, desenvolvimento de câncer e problemas no sistema digestivo, além de outros, decorrentes da ingestão desses compostos. Considerando o aspecto cumulativo dessas substâncias, é impossível prever a sua toxicidade a longo prazo (DUTRA et al., 2007). Assim, diante dos possíveis riscos, os consumidores têm procurado por alimentos livres de conservantes químicos, optando pelas substâncias naturais.

Neste contexto, o interesse na descoberta de novos compostos antimicrobianos naturais tem aumentado (SAGDIÇ et al., 2003), e especiarias com propriedades antimicrobianas, têm sido, notavelmente, estudadas como possível aplicação na produção de alimentos, buscando prevenir o crescimento bacteriano e fúngico (LANCIOTTI et al., 2004). Dentre as muitas especiarias utilizadas primariamente para conferir *flavor* aos alimentos e que, ao mesmo tempo, têm reconhecido potencial como antimicrobianos, incluem-se *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Salvia officinalis* L. (sálvia) (SAGDIÇ et al., 2002; SAGDIÇ, 2003; VELLUTI et al., 2003).

Desta forma, verifica-se que o estudo da atividade antimicrobiana de especiarias em produtos lácteos é alternativa promissora, o que é assegurado pelo elevado consumo destes alimentos e pelos frequentes casos de toxinfecções de origem alimentar relacionados a estes.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com os objetivos de (i) avaliar a qualidade microbiológica das ricotas com certificação do Instituto Mineiro Agropecuário (IMA) ou Serviço de Inspeção Federal (SIF)

comercializadas em Lavras (Minas Gerais, Brasil) e região, quanto à presença de coliformes totais e termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* e comparar os resultados obtidos com os padrões da RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária; (ii) estudar o efeito de *O. vulgare* e *S. officinalis* no crescimento e produção de enterotoxina A por *S. aureus* ATCC 13565 em ricota armazenada em diferentes temperaturas ao longo de 240 horas de armazenamento; e (iii) verificar por teste sensorial a aceitação das ricotas adicionadas de *O. vulgare* e *S. officinalis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O nome ricota é derivado da palavra latina “recocta”, que significa re-cozido, ou cozido duas vezes (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1999). A ricota é um queijo suave, não maturado, que foi, tradicionalmente, produzido na Itália a partir do leite de ovelha. Na atualidade, atingiu maior popularidade, sendo elaborado de soro ou de mistura de soro e leite bovino pasteurizado integral ou desnatado. O princípio de fabricação da ricota é baseado na precipitação das proteínas do soro (albumina e lactoglobulina) por meio de calor associado à acidificação (FARKYE, 2004).

2.1 Ricota

A ricota pode ser comercializada fresca, condimentada ou até mesmo defumada. Produto de alto valor proteico, apresenta textura delicada, sabor típico (suave, levemente ácido e adocicado) e elevada porcentagem de lactose em comparação a outros tipos de queijos (FOX et al., 2000; WHITNEY, 1988). A ricota apresenta cerca de 73,6% de umidade, 12,6% de proteína, 8,1% de lipídios, 3,8% de carboidratos e 1,9% de cinzas (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP, 2006).

Em função de suas características intrínsecas, a ricota fresca é considerada um dos produtos que apresentam melhores condições para o desenvolvimento e crescimento de microrganismos tanto deterioradores quanto patogênicos, o que compromete a qualidade do produto em sua vida de prateleira (MAIA; FERREIRA; ABREU, 2004).

Verifica-se, portanto, a necessidade da garantia da qualidade e segurança para este tipo de produto (ESPER; BONETS; KUAYE, 2007). Entretanto, no Brasil, não existe Regulamento Técnico de Padrão de Identidade e Qualidade

para a ricota (TEIXEIRA, 2005). A única legislação existente é o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), onde no artigo 610 ricota é definida como o produto obtido da albumina de soro de queijos, adicionada de leite até 20% do seu volume, tratado convenientemente e tendo o máximo de três dias de fabricação. Também estabelece que este queijo deva apresentar formato cilíndrico, peso de 300 g a 1 kg, crosta rugosa, não-formada ou pouco nítida, consistência mole, não-pastosa e friável, textura fechada ou com alguns buracos mecânicos, cor branca ou branco-creme, odor e sabor próprios (BRASIL, 1952).

Em geral, observa-se no mercado a oferta de ricota com diferentes características, fato este motivado pela produção artesanal e, também, pela ausência de regulamento técnico mais definido (ESPER; BONETS; KUAYE, 2007; SILVA; FERREIRA, 2010). A inexistência de padrões legais pode ser prejudicial ao próprio controle oficial de qualidade deste produto; por exemplo, a falta de definição de parâmetro físico-químico, como o teor de umidade, dificulta a interpretação dos resultados do controle microbiológico conforme estabelecido na RDC nº 12 (BRASIL, 2001).

A elevação da temperatura do soro ou mistura favorece a obtenção de massa com baixa contagem microbiana. Contudo, após sua obtenção, essa massa fica exposta a inúmeras fontes de contaminação, principalmente, por ser excessivamente manipulada (RIBEIRO et al., 2005).

2.1.1 Qualidade microbiológica

O conceito de alimento seguro é dado a partir da definição de risco significativo. A maior parte dos pesquisadores concorda que risco igual a zero é impraticável, por causa da quantidade de produtos alimentícios disponíveis, da complexidade da cadeia de distribuição e da natureza humana. Os riscos de

ocorrência de doenças transmitidas por alimentos devem ser reduzidos ao máximo, durante sua produção, para se obter risco aceitável e de acordo com os padrões exigidos pela legislação (RICHARDS, 2002).

A ricota, segundo os padrões microbiológicos e sanitários para alimentos regulamentados pela Resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), se enquadraria no grupo 8.b. (item f), correspondente aos queijos de muita alta umidade (>55%), cujos limites máximos são: 5×10^2 NMP.g⁻¹ para coliformes a 45°C, 5×10^2 UFC.g⁻¹ para estafilococos coagulase positiva e ausência de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* (BRASIL, 2001).

No Brasil, ainda são poucos os trabalhos realizados em que se verificaram a qualidade microbiológica de ricota, o que enfatiza a necessidade de realização de mais estudos sobre o assunto, a fim de verificar se os produtos comercializados encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente, uma vez que produtos lácteos estão, frequentemente, envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares. Segundo Costa, Lima e Rabelo (2002), diversos surtos de doenças têm sido associados à ingestão de produtos lácteos em razão, principalmente, da presença de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*; também, há relatos de surtos mais graves causados por *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp.

Raimundo (2004), analisando doze amostras de ricota de seis marcas diferentes, comercializadas no município de Alfenas, Minas Gerais, encontrou contagens de coliformes termotolerantes, variando de $7,1 \times 10^2$ a $2,8 \times 10^5$ NMP.g⁻¹, e constatou que somente uma marca analisada estava dentro dos padrões da legislação vigente. No que diz respeito à contagem de estafilococos coagulase positiva e negativa, as contagens variam de $1,2 \times 10^6$ a $9,5 \times 10^6$ UFC.g⁻¹.

Esper (2006), avaliando a qualidade microbiológica das diferentes marcas de ricota comercializadas no município de Campinas, São Paulo,

constatou que 46,7% das amostras estavam em desacordo com o padrão estabelecido pela RDC nº 12. O número de amostras, acima do permitido pela legislação, foi de 46,7% para coliformes termotolerantes, 2,2% para estafilococos coagulase positiva e 6,7% para *L. monocytogenes*. Embora não tenha sido detectada a presença de toxinas estafilocócicas nas ricotas, 23,64% dos isolados de estafilococos eram produtores de toxinas. Destes, 69,23% eram estafilococos coagulase negativa e 30,77% estafilococos coagulase positiva, evidenciando a importância dos estafilococos coagulase negativa.

Santos e Hoffmann (2010), avaliando a evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota, de uma indústria de laticínios localizada no município de São José do Rio Preto, São Paulo, verificaram contagens máximas de $7,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ para estafilococos coagulase positiva, $4,6 \times 10^2$ NMP.g⁻¹ para coliformes totais e $9,3 \times 10^1$ NMP.g⁻¹ para coliformes termotolerantes. Para *E. coli*, no quinto dia após a fabricação, 16,66% das amostras se encontravam contaminadas, e não foi verificada a presença de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.

Dentre os diversos tipos de microrganismos patogênicos que podem ser encontrados em alimentos, pode-se destacar o *S. aureus*, cuja importância epidemiológica nas doenças veiculadas por alimentos decorre em virtude de sua alta prevalência e do risco de produção de toxinas pré-formadas (ZECCONI; HANG, 2000), produzidas e liberadas pela bactéria, durante sua multiplicação no alimento, representando risco para a saúde pública (ALCARÃS et al., 1997). Surto e casos esporádicos de toxiose por *S. aureus*, atribuídos ao consumo de produtos lácteos, contendo enterotoxinas pré-formadas, principalmente queijos, têm sido relatados em vários países (CARMO et al., 2002; OSTYN et al., 2010). Se tratando do cenário epidemiológico mundial, *S. aureus* é considerado a terceira causa mais relevante de doenças transmitidas por alimentos (DTAs)

(TIRADO; SCHIMIDT, 2001). Em 2008 ele foi considerado a quarta maior causa de toxinfecções alimentares na União Europeia (EFSA, 2010).

2.1.1.1 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família Micrococcaceae e apresentam-se como cocos Gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 μm , imóveis, isoladas ou agrupadas em cachos. São aeróbias facultativas (CHAPAVAL, 2003); capazes de se desenvolver em ampla faixa de temperatura (7 a 48,5 °C), com temperatura ótima entre 30 a 37 °C (SCHIMITT; SCHULER-SCHMID; SCHMIDT-LORENZ, 1990); e pH de crescimento variando entre 4,2 e 9,3, com ótimo entre 7 a 7,5 (BERGDOLL, 1990).

Considerando a atividade de água (a_w), os estafilococos são únicos em sua capacidade de multiplicar-se em valores inferiores aos normalmente considerados mínimos para as bactérias não-halófilas. São tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio, em que o valor mínimo de a_w considerado é de 0,83 (FERREIRA, 2003; PORTOCARRERO; NEWMAN; MIKEL, 2002).

A capacidade de crescer em diferentes condições ambientais faz com que o *S. aureus* se desenvolva com facilidade em vários alimentos (TRANTER, 1990). As peculiaridades do seu habitat tornam sua presença largamente distribuída na natureza, contaminando os alimentos pelos manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos, e pelos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite (BALABAN; RASOOLY, 2000).

Atualmente, cerca de 33 espécies de estafilococos são reconhecidas e divididas em duas categorias: coagulase positiva e coagulase negativa. Essa divisão é baseada na capacidade de coagulação do plasma, que é a propriedade considerada importante como marcador de patogenicidade (BEHME et al.,

1996). Os estafilococos coagulase-positiva têm sido utilizados como microrganismos indicadores, apesar da produção de enterotoxinas por algumas espécies não produtoras de coagulase ser relatada (VERNOZY-ROSAND et al., 1996). A coagulase é uma enzima produzida por algumas espécies de estafilococos, principalmente, o *S. aureus*, que exerce efeito clínico da coagulação do plasma humano e de outros animais, por ativação da protrombina, resultando na conversão do fibrinogênio em fibrina. Este teste tem sido largamente utilizado para diferenciação de *S. aureus* e outras espécies produtoras ou não de coagulase (CHANG; HUANG, 1996; MADANI; GREENLAND; RICHARD, 1998).

Staphylococcus aureus produz numerosos fatores de virulência, incluindo toxinas citolíticas ou produtoras de lesão da membrana (alfa, beta, delta, gama e leucocidina), bem como uma toxina esfoliativa, a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e enterotoxinas (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000).

As enterotoxinas são proteínas de baixo peso molecular, 22 a 30 KDa (POLI; RIVERA; NEAL, 2002), produzidas por algumas espécies de estafilococos, particularmente, por *S. aureus*. São caracterizadas como sendo proteínas simples, ricas em lisina, tirosina, ácido aspártico e glutâmico, constituídas por duas moléculas de cisteína formando uma ponte dissulfeto (SU; WONG, 1995). Elas podem ser codificadas em prófagos (BETLEY; MEKALANOS, 1985), plasmídeos (BAYLES; IANDOLO, 1989) ou em ilhas de patogenicidade cromossômicas (YARWOOD et al., 2002).

Até o momento, o grupo de enterotoxinas (SEs) e de proteínas que se assemelham a enterotoxinas (SEIs) compreende 22 membros, excluindo os variantes moleculares: (i) as clássicas SEA, SEB, SEC (com os variantes SEC₁, SEC₂ e SEC₃, SEC ovino e SEC bovino), SED e SEE, os quais foram descobertas em estudos de cepas de *S. aureus* envolvidas em surtos relacionados

a alimentos, e classificadas em tipos sorológicos distintos (BERGDOLL; SURGALLA; DACK, 1959; CASMAN, 1967); e (ii) os novos tipos de SEs (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) e SE/s (SE/I, SE/K, SE/L, SE/M, SE/N, SE/O, SE/P, SE/Q, SE/U, SE/U2 e SE/V) (JARRAUD et al., 2001; THOMAS et al., 2006; ZHANG; IANDOLO; STEWART, 1998). TSST-1, inicialmente designada como SEF não possui atividade emética (BERGDOLL et al., 1981; REISER et al., 1983).

As enterotoxinas SEA e SED são as que mais estão envolvidas em surtos de toxinfecção, podendo ser encontradas isoladas ou em combinação (TRANTER, 1990). Alguns autores mencionam que a enterotoxina A é a mais comumente encontrada em surtos relacionados a alimentos (CHA et al., 2006; KÉROUANTON et al., 2007).

A quantidade de enterotoxinas estafilocócicas (SE), produzida em alimentos ou culturas, difere em função do tipo que é secretada. A síntese de SEA, SED e SEE ocorre na fase logarítmica de crescimento, enquanto que SEB e SECs são produzidas no final da fase estacionária (MICUSAN; THIBODEAU, 1993).

Para a produção de enterotoxina em determinado meio, algumas condições devem ser adequadas, como atividade de água (a_w), pH, ausência de substâncias inibidoras e temperatura (LINDQVIST; SYLVÉN; VAGSHOLM, 2002). Segundo Baird-Parker (1990), as enterotoxinas estafilocócicas resistem a temperaturas de 121 °C, por 3 a 8 minutos, não sendo inativadas pela temperatura utilizada no processamento dos alimentos, embora o microrganismo seja destruído.

Cinco condições são requeridas para provocar surtos de toxiose por *Staphylococcus aureus*: (i) fonte contendo *S. aureus* produtor de enterotoxina: alimentos crus, portadores assintomáticos ou sintomáticos; (ii) transferência do *S. aureus* da fonte para o alimento: higienização inadequada dos utensílios

utilizados na preparação dos alimentos; (iii) composição físico-química do alimento favorável ao crescimento de *S. aureus* e produção de enterotoxina; (iv) temperatura favorável e tempo suficiente para o crescimento bacteriano e produção de enterotoxina; (v) ingestão de alimentos com quantidade de enterotoxina suficiente para provocar os sintomas (HENNEKINNE et al., 2010).

Os sintomas clínicos causados pela ingestão do alimento, contendo a toxina pré-formada, aparecem rapidamente e são caracterizados por vômitos severos, diarreias, dores abdominais, sudorese e câibras. Podem ocorrer, também, dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, ainda, febre, de acordo com a quantidade de toxina ingerida e a susceptibilidade do indivíduo acometido. O período de incubação pode variar, podendo ocorrer entre 30 minutos a 8 horas, sendo a média de 2 a 4 horas após a ingestão do alimento contaminado. É necessário menos de 1µg de toxina pura para desencadear os sintomas característicos de toxínose estafilocócica e a população de 10⁵ UFC de *Staphylococcus*/g ou mL de alimento é necessária para provocar um quadro de toxínose (BERGDOLL, 1990).

2.1.2 Atividade antimicrobiana de especiarias e aplicação em alimentos

Atualmente é cada vez maior o número de consumidores que exigem da indústria de alimentos a diminuição do uso de aditivos químicos, para obtenção dos seus objetivos voltados para segurança alimentar, bem como seus objetivos relacionados ao retardamento das ações microbianas de caráter deteriorante que conduzem o alimento ao estado impróprio para o consumo. Também, seguindo esta tendência e tomando como base a toxicidade ou sua suspeita e o abuso de utilização destes compostos, os aspectos legislativos da produção de alimentos têm demandado redução dos índices de utilização de aditivos químicos na indústria alimentícia (BRULL; COOTE, 1999). Os consumidores têm buscado

mais alimentos naturais, caracterizados pela ausência ou presença de baixos níveis de aditivos químicos, bem como baixo impacto ambiental, retratando o consumismo verde (BURT, 2004).

Nos últimos anos, o interesse na descoberta de novos compostos antimicrobianos naturais tem aumentado (SAGDIÇ et al., 2003), o que, também, tem ocorrido na área de microbiologia de alimentos (LANCIOTTI et al., 2004). Neste panorama, muitas pesquisas em todo o mundo vêm sendo desenvolvidas enfatizando a busca de compostos alternativos úteis e viáveis para utilização racional como conservantes naturais na produção de alimentos (CHAO; YOUNG; OBERG, 2000). Plantas com propriedades antimicrobianas têm sido notavelmente enfatizadas como possível aplicação na indústria alimentícia, objetivando prevenir o crescimento bacteriano e fúngico (LANCIOTTI et al., 2004).

As especiarias têm seu destaque na vida do homem desde a Grécia antiga, como símbolos de crenças culturais ou para fins medicinais, aromatizantes e conservantes e são constituídas de diferentes partes de vegetais dessecados, grosseiramente subdivididos ou moídos (RIZZINI; MORS, 1995). Segundo a Resolução RDC nº 276, especiarias podem ser definidas como produtos constituídos de partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes e talos) de uma ou mais espécies vegetais, tradicionalmente, utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas. Devem ser designadas pelo nome comum da espécie vegetal utilizada ou expressões consagradas pelo uso, podendo ser seguida da forma de apresentação (BRASIL, 2005).

De acordo com Bedin, Gutkoski e Wiest (1999) e Souza (2003), além da propriedade aromatizante, as especiarias vegetais poderiam aumentar a vida útil dos alimentos em consequência de sua atividade bacteriostática e bactericida, de acordo com a espécie e concentração utilizada, retardando o começo da

deterioração e o crescimento de microrganismos indesejáveis, interferindo, significativamente, na epidemiologia e profilaxia de surtos de toxinfecções alimentares.

Entre as muitas especiarias utilizadas primariamente para conferir *flavor* aos alimentos e que, ao mesmo tempo, têm reconhecido potencial como antimicrobianos incluem-se: alho, cebola, noz-moscada, *curry*, mostarda, pimenta-preta, tomilho, orégano, sálvia, alecrim, menta, pimenta jamaicana, anis, manjeriço, páprica, açafrão, aipo, endro, gengibre, coentro, manjerona, cravo, canela e cominho (SAGDIÇ et al., 2002; SAGDIÇ, 2003; VELLUTI et al., 2003).

Ceylan, Fung e Sabah (2004) verificaram a atividade antimicrobiana da canela sobre *Escherichia coli* O157:H7 inoculada em suco de maçã. Sallam, Ishioroshi e Samejima (2004), avaliando o efeito antimicrobiano do alho fresco e alho em pó na lingüiça de frango, constaram significativa redução da contagem de aeróbios mesófilos e aumento da vida útil. Leuschner e Zamparini (2002) estudaram o crescimento e a sobrevivência de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis em maionese na presença alho fresco e observaram redução no número de células viáveis. Liu et al. (2009) avaliaram o efeito de diferentes níveis de alecrim ou mogno chinês sobre a qualidade da lingüiça de frango fresca durante o armazenamento refrigerado e constaram menor contagem de aeróbios mesófilos para as lingüiças adicionadas de alecrim ou mogno chinês, quando comparadas com a amostra controle. Wahba, Ahmed e Ebraheim (2010) observaram que pimenta, salsa e dill apresentaram atividade antibacteriana contra a microbiota natural, coliformes, fungos filamentosos e leveduras e *S. aureus* em queijo Kareish, verificando, também, que a adição destas plantas foi aceitável para o consumidor, podendo contribuir para novas e seguras variedades deste queijo.

Gonzalez-Fandos et al. (1996) estudaram o efeito de orégano, três variedades de páprica (doce, semi-doce e pungente) e duas variedades de pimenta (preta e branca) em salsichas fermentadas espanholas sobre *S. aureus*. Apesar de não serem muito efetivos, no controle do crescimento microbiano, as especiarias testadas afetaram a síntese de enterotoxinas SEA, SEC, SED e SEE. Dependendo da espécie de planta e concentração utilizada a produção de enterotoxinas pôde ser inibida ou estimulada.

Como pôde ser observado, já existem algumas pesquisas que relatam a utilização eficiente de especiarias como antimicrobianos naturais no controle de microrganismos em alimentos. Entretanto, até o presente momento são escassos estudos utilizando produtos lácteos. Desta forma, verifica-se que o estudo da atividade antimicrobiana de especiarias em produtos lácteos é alternativa promissora, o que é assegurado pelo elevado consumo destes alimentos e pelos frequentes casos de toxinfecções de origem alimentar relacionados a estes. Segundo Maia, Ferreira e Abreu (2004), o interesse por queijos com especiarias tem crescido. A ricota com especiarias tem aparecido como opção de consumo, por se tratar de um alimento de fácil digestão e uma das formas mais simples e econômicas de aproveitamento do soro proveniente de vários tipos de queijos, obtendo-se produto de fácil comercialização e baixo custo.

Contudo, o nível de especiarias e seus óleos essenciais necessários para inibir microrganismos em alimentos tem sido relatados como muito maior do que aquele determinado *in vitro*, quando se utilizam meios de cultura em laboratórios (GOULD, 1996; JUVEN et al., 1994). Um dos motivos seria que a interação com os componentes dos alimentos pode reduzir a atividade antimicrobiana e gorduras e/ou proteínas podem ser responsáveis pela redução na atividade bactericida de especiarias em matriz alimentar (UHART; FERREIRA; RAVISHANKAR, 2006). Diante desse fato, verifica-se que, muitas vezes, no estudo de conservantes naturais em alimentos as concentrações de

especiarias, óleos essenciais e extratos de plantas necessárias para controlar os microrganismos são elevadas e podem não ser aceitas sensorialmente, o que torna de fundamental importância a avaliação sensorial dos alimentos adicionados de especiarias a fim de atestar e assegurar o sucesso da utilização dos mesmos.

A análise sensorial é uma ferramenta utilizada para medir, analisar e interpretar o impacto que as características dos alimentos, bebidas e materiais, produzem nos órgãos dos sentidos humanos e, assim, determinar como os produtos são percebidos. É um tipo de técnica importante para a avaliação da qualidade de produtos (JELLINEK, 1985). Isto torna a determinação da aceitação pelo consumidor parte crucial no processo de desenvolvimento ou melhoramento de produtos (CHAVES; SPROESSER, 1993).

2.1.2.1 *Origanum vulgare* L.

A espécie *O. vulgare* (orégano), pertencente à família Lamiaceae, foi transportada pelos romanos do Mediterrâneo para a Europa e considerado por eles como símbolo da paz. Está aclimatada no Brasil, mas não é cultivada em larga escala. É uma planta perene, tem entre 25 a 40 cm de altura, com folhas opostas, ovais, verde-escuras, pecioladas, inteiras ou serrilhadas, com pouco mais de 35 mm e com as pontas (extremidades) levemente pontiagudas. Possui cheiro e sabor característico acentuado (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1984; MARANCA, 1986), sendo uma das especiarias mais utilizadas na culinária brasileira no preparo de carnes, ovos, peixes, panificação, frutos do mar e pizzas (KRUPPA; RUSSOMANNO, 2008).

Segundo Radušienė et al. (2005) e Radušienė et al. (2008), *O. vulgare* é fonte de óleo essencial e compostos fenólicos. De acordo com Peak et al. (1991) e Cervato et al. (2000), as folhas secas e o óleo essencial de *O. vulgare* têm sido

usados, medicinalmente, por vários séculos em diferentes partes do mundo, seu efeito positivo sobre a saúde humana tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes na planta e, conseqüentemente, em seus produtos derivados. Juglal, Govinden e Odhav (2002) e Daferera, Ziogas e Polissiou (2003) relatam que o *O. vulgare*, seja na forma *in natura*, de folhas secas ou de produtos derivados, tem-se apresentado como interessante fonte de agentes antimicrobianos.



Figura 1 Folhas frescas de *O. vulgare* L (A) e folhas desidratadas na forma de comercialização (B)

Fonte: Adaptado de Ribeiro e Diniz (2008)

Pereira et al. (2008), analisando a composição química do óleo essencial de *O. vulgare*, encontraram os seguintes constituintes: 26,3% de terpen-4-ol; 16,6% de β -cimeno; 16,0% de γ -terpineno; 12,3% de linalol; 7,2% de carvacrol; 6,9% de α -terpineno; 4,6% de p-cimeno; 3,8% de α -terpineol; 2,7% de mirceno; 2,3% de β -felandreno; 1,8% de terpinoleno; 1,7% de acetato de linalila; 1,6% de carvacrol metil éter; 1,3% de trans-cariofileno; 1,1% de α -felandreno; 0,8% de timol metil éter e 0,7% de α -pineno. Já Milos, Mastelic e Jerkovic (2000), pesquisando os constituintes do óleo essencial de *O. vulgare*, identificaram 16

compostos, dentre os quais encontram-se: 40,4% de timol; 24,8% de carvacrol; 16,8% de p-cimeno; 1,7% de γ -terpineno; 2,1% de 1-octen-3-ol e 2,1% de borneol.

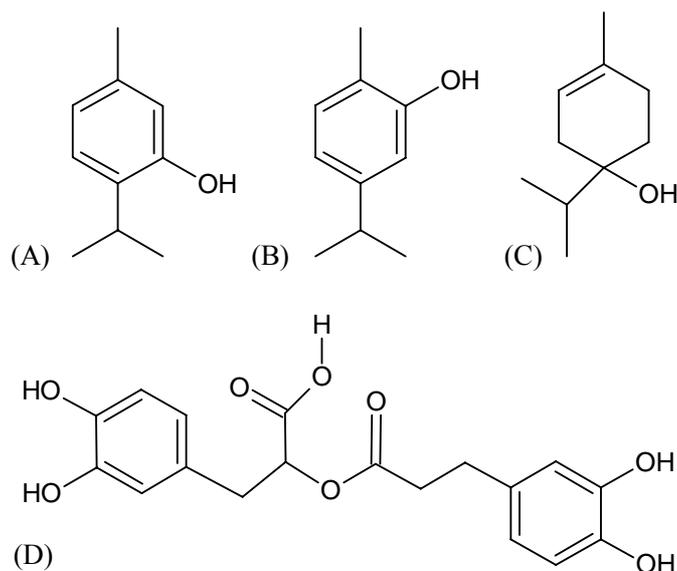


Figura 2 Estrutura química dos principais constituintes de *Origanum vulgare*. Timol (A), carvacrol (B), terpen-4-ol (C) e ácido rosmarínico (D)

Radušienė et al. (2008), analisando os compostos fenólicos do *O. vulgare*, verificaram a presença de: ácido rosmarínico, ácido clorogênico, ácido cafeico, hiperosídeo, naringina + rutina, luteonina, astragalina, vitexina, isovitexina, eriodictol, quercetina, narigenina. Ácido rosmarínico foi o composto dominante, apresentando-se nas folhas na quantidade de $1,11-7,42 \text{ mg.g}^{-1}$ de peso seco.

2.1.2.2 *Salvia officinalis* L.

A espécie *S. officinalis* (sálvia) é cultivada desde tempos remotos e seu nome deriva do latim “salvere”, que significa saudável (ALONSO, 2004). É originária do mediterrâneo e aclimatada, principalmente, na região Sul do Brasil. É considerada uma planta aromática e com propriedades medicinais (BARICEVIC; BARTOL, 2000).

A *S. officinalis* é um subarbusto perene, pertencente à família Lamiaceae. Caracteriza-se por apresentar altura entre 30 e 70 cm; raiz fusiforme e fibrosa; talo ereto lenhoso e quadrangular na base com numerosas ramificações; folhas opostas, inteiras, glandulares ou rugosas, finamente denteadas, as inferiores pecioladas e as superiores sésseis, embranquecidas na parte de trás e verdes na frente, recobertas por penugem. As flores são azul-violáceas, agrupadas em espigas terminais em número de 7 a 10, com intenso aroma e abundante néctar. As características das flores variam conforme a variedade da *S. officinalis* (ALONSO, 2004).



Figura 3 Folhas frescas de *S. officinalis* L (A) e folhas desidratadas na forma de comercialização (B)

Fonte: Adaptado de Ribeiro e Diniz (2008)

Possui diversas propriedades terapêuticas, como emenagoga, diaforética, antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e adstringente (COSTA, 1994; EVANS, 1991; HERTWIG, 1991). Além da sua utilização na medicina tradicional, possui grande importância econômica para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (CUVELIER; RICHARD; BERSE, 1996; MARTINS, 1998).

Como demonstrado em diversos estudos citados a seguir, as folhas de *S. officinalis*, além de conter óleos essenciais, apresentam compostos fenólicos, ambos reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Delamare et al. (2007), avaliando a composição química do óleo essencial de *S. officinalis*, encontraram os seguintes compostos majoritários: 24,8% de α -tujona; 14,4% de 1,8-cineol; 11,1% de borneol; 10,9% de cânfora e 9,87% de β -pineno. Zheng e Wang (2001) pesquisaram os compostos fenólicos de *S. officinalis* e encontraram ácido rosmarínico (117,8 mg.100g⁻¹ de peso fresco), luteonina (33,4 mg.100g⁻¹), hispidulina (16,3 mg.100g⁻¹), cirsimarina (14,3 mg.100g⁻¹), ácido cafeico (7,42 mg.100g⁻¹) e ácido vanílico (2,27 mg.100g⁻¹).

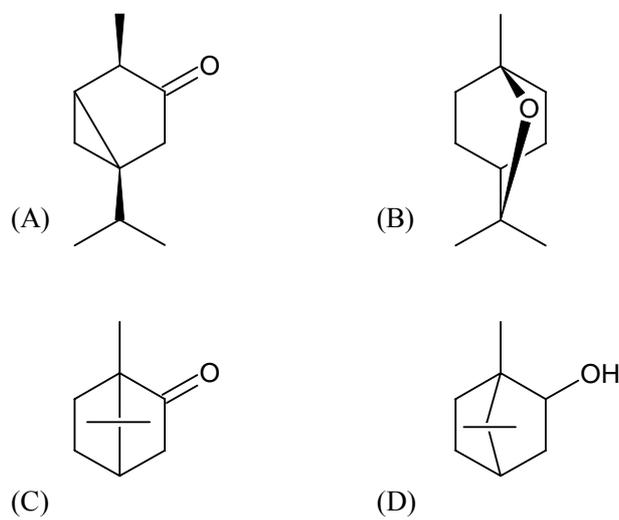


Figura 4 Estrutura química dos principais constituintes de *Salvia officinalis*. α -tujona (A), 1,8-cineol (B), cânfora (C) e borneol (D)

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando produzidas sob condições higiênico-sanitárias inadequadas, as ricotas comercializadas podem representar risco à saúde pública. Os trabalhos disponíveis na literatura apontam ricotas com alta contagem de microrganismos, como bactérias do gênero *Staphylococcus* e grupo dos coliformes. Assim, além da adoção de boas práticas de fabricação, o uso de especiarias, tais como *O. vulgare* e *S. officinalis*, pode tornar-se forma de garantir a qualidade e segurança microbiológica deste alimento. No entanto, em razão das possíveis alterações organolépticas que porventura possam ocorrer, estudos que avaliem o efeito antimicrobiano devem ser acompanhados de avaliação sensorial.

REFERÊNCIAS

ALCARÃS, L. E. et al. Detección de *Staphylococcus aureus spp.* en manipuladores de alimentos. **La Alimentación Latino Americana**, Buenos Aires, v. 31, n. 219, p. 44-47, Nov. 1997.

ALONSO, J. **Tratado de fitofarmacos y nutracéuticos**. Rosário: Corpus Libros, 2004. 1150 p.

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. **Enciclopédia da flora brasileira**. São Paulo: Três Livros e Fascículos, 1984. 150 p.

BAIRD-PARKER, A. C. The staphylococci: introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, New York, v. 69, n.1, p. 188, Jan. 1990.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p.1-10, Oct. 2000.

BARICEVC, D.; BARTOL, T. The biological pharmacological activity of the *Salvia* genus V., pharmacology. In: KINTZIOS, S. E. (Ed.). **Sage: the genus salvia**. Marston: Harwood Academic, 2000. Cap. 11, p. 143-184.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 171, n. 9, p. 4799-4806, Sept. 1989.

BEDIN, C.; GUTKOSKI, S. B.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana das especiarias. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 65, p. 26-29, out. 1999.

BEHME, R. J. et al. Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 12, p. 3075-3084, Dec. 1996.

BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 100, n. 2, p. 91-100, Mar. 1990.

BERGDOLL, M. S. et al. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. **Lancet**, New York, v. 1, n. 8228, p. 1017-1021, May 1981.

BERGDOLL, M. S.; SURGALLA, M. J.; DACK, G. M. Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 83, n. 3, p. 334-338, Sept. 1959.

BETLEY, M. J.; MEKALANOS, J. J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by a phage. **Science**, Washington, v. 229, n. 4709, p. 185-187, July 1985.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 276, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 143, n. 184, p. 378, 23 set. 2005. Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 139, n. 7, p. 45, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRASIL. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Rio de Janeiro, p. 10.785, 7 de jul. 1952. Seção 1.

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

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

CARMO, L. S. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 1, p. 9-14, Feb. 2002.

CASMAN, E. P. et al. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 94, n. 6, p. 1875-1882, Dec. 1967.

CERVATO, C. et al. Antioxidant properties of oregano *Origanum vulgare* leaf extracts . **Journal of Food Biochemistry**, Malden, v. 24, n.6, p. 453-465, Dec. 2000.

CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C.; SABAH, J. R. Antimicrobial activity and synergistic effect of cinnamon with sodium benzoate or potassium sorbate in controlling *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. **Journal of Food Science**, Malden, v. 69, n. 4, p. 102-106, May 2004.

CHA, J. O. et al. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford v. 101, n. 4, p. 864-871, Oct. 2006.

CHANG, T. C.; HUANG, S. H. Evaluation o coagulase activity and protein a production for the identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 58, n. 8, p. 858-862, Aug. 1996.

CHAO, S. C.; YOUNG, D .G.; OBERG, C. J. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 12, p. 630-649, Jan./Feb. 2000.

CHAPAVAL, L. **Detecção de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *Staphylococcus aureus* no leite bovino por eletroforese capilar e identificação dos isolados enterotoxigênicos via PCR.** 2003. 139 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas.** Viçosa, MG: Editora UFV, 1993. 81 p

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** Lisboa: Fundação Calouste, 1994. 1031 p.

COSTA, F. N.; LIMA, R. M. S.; RABELO, R. N. Comportamento frente à ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isolados de derivados lácteos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 92/93, p. 80-83, jan./fev. 2002.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSE, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.73, n. 5, p. 645-652, May 1996.

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

DELAMARE, A. P. L. et al. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, Oxford, v.100, n. 2, p. 603–608, Apr./June 2007.

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

DUTRA, E. S. et al. **Alimentação saudável e sustentável**. Brasília: Universidade de Brasília, 2007. 92 p.

ESPER, L. M. R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de campinas-SP**. 2006. 97 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ESPER, L. M. R.; BONETS, P. A.; KUAYE, A. Y. Avaliação das características físico-químicas de ricotas comercializadas no município de Campinas-SP e da conformidade das informações nutricionais declaradas nos rótulos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 3, p. 299-304, jul/set. 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA . The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. **EFSA Journal**, Parma, v. 8, n. 1, p. 1-41, Apr. 2010. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1496.htm>>. Acesso em: 16 de jan. 2011.

EVANS, W. C. **Farmacognosia**. Santa Fe: McGraw-Hill, 1991. 812 p.

FARKYE, N. Y. Acid- and acid/rennet-curd cheeses part c: acid-heat coagulated cheeses. In: FOX, P. F. et al. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 3. ed. London: Elsevier, 2004. p. 343-348.

FERREIRA, A. C. **Uso do açafrão (*curcuma longa l.*) na redução de *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 em ricota**. 2003. 76 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

FOX, P. F. et al. Fresh acid-curd cheese varieties. In: _____ **Fundamentals of cheese science**. Maryland: Aspen Publishers, 2000. p. 363-387.

GONZALEZ-FANDOS, E. et al. Effect of the major herbs and spices in Spanish fermented sausages on *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria. **Archiv Für Lebensmittelhygiene**, Alfeld, v. 47, n. 2, p. 43-47, Mar./Apr. 1996.

GOULD, G. W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 12, p. 82–86, Dec. 1996.

HENNEKINNE, J. A. et al. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized?. **Toxins**, Switzerland, v.2, n. 2, p. 2106-2116, Aug. 2010.

HERTWIG, I. F. V. **Plantas aromáticas e medicinais**. São Paulo: Icone, 1991. 414 p.

JARRAUD, S. et al. egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.166, n. 1, p. 669–677, Jan. 2001.

JELLINEK, G. **Sensory evaluation of food-theory and practice**. England: Ellis Horwood, 1985. 429 p.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spices oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 4, p. 638-687, Apr. 2002.

JUVEN, B. J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, Malden, v. 76, n. 6, p. 626–631, June 1994.

KÉROUANTON, A. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International of Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 3, p. 369-375, Apr. 2007.

KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. Soft italian cheese-mozzarella and ricotta. In: KOSIKOWSKI, F. **Cheese and fermented milk foods: origins and principles**. 3. ed. Virginia: FV Kosikowski LLC, 1999. p. 174-179.

KRUPPA, P. C.; RUSSOMANNO, O. M. R. Ocorrência de fungos em sementes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da família Lamiaceae. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 45-51, jan./feb. 2008.

LANCIOTTI, R. et al. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life of minimally processed fruits. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 15, n. 3-4, p. 201-208, Mar./Apr. 2004.

LEUSCHNER, R. G. K.; ZAMPARINI, J. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 6-7, p. 399-404, Sept./Oct. 2002.

LINDQVIST, R.; SYLVÉN, S.; VAGSHOLM, I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 1/2, p. 155-170, Sept. 2002.

LIU, D. C. et al. Effect of various levels of rosemary or chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. **Food Chemistry**, Oxford, v. 117, n. 1, p. 106-113, Nov. 2009.

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

MAIA, S. M.; FERREIRA, A. C.; ABREU, L. R. de. Uso do açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 358-365, mar./abr. 2004.

MARANCA, G. **Plantas aromáticas na alimentação**. São Paulo: Livraria Nobel S. A., 1986. 96 p.

MARTINS, E. R. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1998. 220 p.

MICUSAN, V. V.; THIBODEAU, J. Superantigens of microbial origin. **Seminars in Immunology**, London, v. 5, n. 1, p. 3-11, Feb. 1993.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from orégano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, Oxford, v. 71, n. 1, p. 79-83, Oct. 2000.

OSTYN, A. et al. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. **Euro Surveillance**, Stockholm, v. 15, n. 13, p. 1-4, Apr. 2010.

PEAK, P. W. et al. The inhibitory effect of rosmarinic acid on complements involves the C5 convertase. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 13, n. 7, p. 853-857, July 1991.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n.3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

POLI, M.; RIVERA, V.; NEAL, D. Sensitive and specific colorimetric ELISAs for *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B in urine and buffer. **Toxicon**, Fort Detrick, v. 40, n. 12, p. 1723-1726, Dec. 2002.

PORTOCARRERO, S. M.; NEWMAN, M.; MIKEL, B. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. **Meat Science**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 267-273, Oct. 2002.

RADUŠIENĖ, J. et al. Chemical composition of essential oil and antimicrobial activity of *Origanum vulgare*, **Biologija**, Versita, v. 51, n. 4, p. 53–58, Apr. 2005.

RADUŠIENĖ, J. et al. Composition and variability of phenolic compounds in *Origanum vulgare* from Lithuania. **Biologija**, Versita, v. 54, n. 1, p. 45–49, Jan. 2008.

RAIMUNDO, I. C. **Avaliação microbiológica de amostras de ricotas comercializadas no município de Alfenas**. 2004. 36 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

REISER, R. F. et al. Purification and some physicochemical properties of toxic-shock toxin. **Biochemistry**, Washington, v. 22, n. 16, p. 3907–3912, Aug. 1983.

RIBEIRO, A. C. et al. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 113-117, jan./fev. 2005.

RIBEIRO, P. G. F.; DINIZ, R. C. **Plantas aromáticas e medicinais: cultivo e utilização**. Londrina: IAPAR, 2008. 218 p.

RICHARDS, N. S. P. S. Segurança alimentar: como prevenir contaminações na indústria. **Food Ingredients**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 16-30, maio/jun. 2002.

RIZZINI, C. T. Q.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 241 p.

SAGDIÇ, O. et al. Effect of some spices extracts on bacterial inhibition. **Food Science and Technology International**, London, v. 9, n. 5, p. 353-359, Oct. 2003.

SAGDIÇ, O. et al. Effects of turkish spices extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 5, p. 473-480, Oct. 2002.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to turkish thyme and oregano hydrosols. **LWT-Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 36, n. 5, p. 467-473, Aug. 2003.

SALLAM, K. H. I.; ISHIOROSHI, M.; SAMEJIMA, K. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. **LWT-Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 37, n. 8, p. 849-855, Dec. 2004.

SANTOS, V. A. Q.; HOFFMANN, F. L. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 38-46, jan./mar. 2010.

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, TNases and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 1-20, Aug. 1990.

SILVA, L. F. M. da; FERREIRA, K. S. Avaliação de rotulagem nutricional, composição química e valor energético de queijo minas frescal, queijo minas frescal “light” e ricota. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 3, p. 437-441, jul./set. 2010.

SOUZA, E. L. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 113, p. 38-42, jan. 2003.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1438-1443, Apr. 1995.

TEIXEIRA, L. V. **Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do soro de queijos minas padrão e mussarela produzidos em quatro regiões de Minas Gerais**. 2005. 42 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

THOMAS, D. Y. et al. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 8, p. 4724-4734, Aug. 2006.

TIRADO, C.; SCHIMDT, K. Who surveillance programme for control of food-borne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. **Journal of Infection**, London, v. 43, n. 1, p. 80-84, July 2001.

TRANter, H. S. Foodborne staphylococcal illness: food borne illness. **Lancet**, London, v. 27, n. 8722, p. 1044-1046, Oct. 1990.

UHART, M.; FERREIRA, N.; RAVISHANKAR, S. Effect of spices on growth and survival of *Salmonella* Typhimurium dt 104 in ground beef stored at 4 and 8°C. **Journal of Food Safety**, Malden, n. 26, v. 2, p. 115-125, May 2006.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. 113 p.

VELLUTI, A. et al. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, orégano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 145-154, Dec. 2003.

VERNOZY-ROSAND, J. et al. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goat's milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 271-280, July 1996.

WAHBA, N. M.; AHMED, A. S.; EBRAHEIM, Z. Z. Antimicrobial effects of pepper, parsley, and dill and their roles in the microbiological quality enhancement of traditional egyptian kareish cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 7, n. 4, p. 411-418, Apr. 2010.

WHITNEY, R. McL. Proteins of milk. In: WONG, N. P. et al. (Ed.). **Fundamentals of dairy chemistry**. 3. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988. p. 81-169.

YARWOOD, J. M. et al. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 277, n. 15, p. 13138-13147, Apr. 2002.

ZECCONI, A.; HANG, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin – FIL-IDF**, v. 345, n. 5, p. 15-18, Dec. 2000.

ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 168, n. 2, p. 227–233, Nov. 1998

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, Nov. 2001.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO 1** Microbiological risks associated to ricotta consumption

Artigo submetido à revista *International Journal of Dairy Technology*, sendo apresentado segundo suas normas de publicação.

DANILO F BRUGNERA^{1*}, MAÍRA M M de OLIVEIRA¹ and ROBERTA H PICCOLI¹

¹*Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, Minas Gerais, CEP 37200-000, Brazil*

* Author for correspondence. E-mail: danilobrugnera@hotmail.com

The objective of this research was to evaluate the microbiological quality of the ricottas marketed in the South of Minas Gerais, Brazil, as to the presence of total and thermotolerant coliforms, Staphylococcus sp., coagulase-positive staphylococci, Salmonella spp. and Listeria monocytogenes, comparing, when pertinent, the results obtained with the standards of the current law. Of the 28 analyzed samples, 67.85% presented counts above the standard for thermotolerant coliforms, 42.85% for coagulase-positive staphylococci and 75% of the samples were out of standard for thermotolerant coliforms as well as coagulase-positive staphylococci. All the samples presented an absence of Salmonella spp. and L. monocytogenes.

Keywords Ricotta, Milk products, Microbiology, Foodborne pathogens, Food safety.

INTRODUCTION

Ricotta is a soft cheese, not matured, traditionally produced in Italy from sheep milk. Currently it has achieved high popularity, being elaborated from whey or a mixture of whey and pasteurized whole or skimmed bovine milk (Farkye 2004).

Due to its intrinsic characteristics, fresh ricotta is considered one of the products that present better conditions for the development and growth of spoilage as well as pathogenic microorganisms, which compromises the product shelf life quality (Maia *et al.* 2004). In spite of the elevation of the whey or mixture temperature during ricotta production to favor the obtaining of a mass with a low microbial count, it is known that after its elaboration, that mass is exposed to numerous points of contamination (Ribeiro *et al.* 2005) and factors such as, high relative humidity in the production room, accentuated air contamination and manipulation can favor the contamination. The slow cooling, high moisture of the cheese and its pH favor the microbial growth (Kosikowski and Mistry 1999).

According to Costa *et al.* (2002), several outbreaks of food poisoning have been associated to the ingestion of dairy products. Among the microorganisms that can contaminate ricotta during its production and manipulation, contamination by total and thermotolerant coliforms, coagulase positive and negative staphylococci, *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes*, represent a public health problem, being able to cause poisoning and/or food-borne infections. In regard to the thermotolerant coliforms, one of the most important microorganisms that belongs to that group is the *Escherichia coli*, which when present indicates unsatisfactory hygienic-sanitary conditions (Calci 1998), and among the coagulase-positive species of staphylococci, *Staphylococcus aureus* is the more frequently associated to cases and outbreaks of food poisoning (Carmo 2002). De Buyser *et al.* (2001) report that *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. and *L. monocytogenes* are the species of pathogenic

bacteria that constitute great threat to the safety of cheeses. Timm *et al.* (2004) mention that the presence of those microorganisms in food is related to the poor quality of the raw material and adoption of inadequate hygienic techniques, that compromise the safety of the final product.

Due to its nutritional and sensorial characteristics, the ricotta is appreciated by a large variety of consumers. According to the Brazilian Cheese Industry Association (ABIQ), in 2008 the ricotta production reached 10,500 tons. Its versatility also contributed to this fact, because it can be used for countless purposes as an ingredient in the elaboration of different dishes, such as sweet or salty pies. However, the use of ricottas in ready to eat dishes, that will not undergo thermal treatment, such as natural snacks and pâtés, increases the risk of passing food poisoning, in case the product is microbiologically contaminated. This situation can be aggravated when the consumption is carried out by immunocompromised individuals or those belonging to risk groups, such as senior citizens, children and pregnant women. Therefore, it is emphasized that the evaluation and monitoring of the microbiological quality of ricotta are of extreme importance, in order to avoid foodborne diseases. Currently, studies available in the literature that were developed with this intention are scarce.

Given the above, this work had as an objective, to evaluate the microbiological quality of the ricottas with certification from the Brazilian regulatory agencies marketed in the south of Minas Gerais, Brazil, as to the presence of total and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus* sp., coagulase-positive staphylococci, *Salmonella* spp. and *L. monocytogens*, comparing, when pertinent, the results obtained with the standards of the current law.

MATERIALS AND METHODS

The ricotta samples with Federal Inspection (SIF) or State (IMA) stamp were acquired from the commerce of Lavras, Minas Gerais, Brazil. Ten different ricotta brands were analyzed, utilizing three samples per brand, except for one of the brands, for which just one sample was collected, totaling 28 analyzed samples. The collections were conducted from September, 2009 to February, 2010. All of the analyzed samples were within the expiration date established by the manufacturer and came from different production lots. The samples were conditioned in an isothermal box and immediately taken to the laboratory for the conduction of the microbiological analyses. The microbiological analyses were carried out at the Food Microbiology Laboratory of the Food Science Department of the Federal University of Lavras (Lavras, Minas Gerais, Brazil).

Sample preparation

The packaging of the ricottas were carefully cleaned with alkaline detergent, rinsed and sanitized with alcohol 70% (v/v). A sterile spatula was used to remove the analytical unit.

For quantification of *Staphylococcus* sp., coagulase-positive staphylococci, total and thermotolerant coliforms, analytical units of 25 g of the samples were homogenized in 225 mL of sodium citrate 2% (p/v), with the aid of a Stomacher sample homogenizer (490 strokes per minute, for 2 minutes), after the homogenization serial dilutions were made in peptone water 0.1% (p/v) (HIMEDIA[®]), and then the microbiological analyses were conducted (Silva *et al.* 2007).

***Staphylococcus* sp. and coagulase-positive Staphylococcus**

The methodology of the American Public Health Association (APHA) was used, described by Lancette & Bennett (2001). The quantification of *Staphylococcus*

sp. was conducted using the surface plating technique in Baird-Parker Base Agar (Difco™), with incubation at 37 °C for 24-48 hours. For determination of coagulase-positive staphylococci, the coagulase test was conducted with rabbit plasma, with incubation at 35 °C in bain-marie for 6 hours. The colonies submitted to the coagulase test were previously confirmed as Gram-positive cocci and catalase-positive.

Total and thermotolerant coliforms

The methodology of APHA was used as described by Kornacki and Jonhson (2001). The total and thermotolerant coliforms were quantified using the Most Probable Number technique (MPN) with a series of three tubes. The presumptive test was carried out in Lauryl Sulfate Broth (MICROMED) with incubation at 35 °C for 24-48 hours. The quantification of total coliforms was conducted in Brilliant Green Bile Broth 2% (HIMEDIA®), with incubation at 35 °C for 24-48 hours and the quantification of thermotolerant coliforms was conducted using EC Broth (HIMEDIA®), with incubation at 44.5 °C for 24 hours in bain-marie.

Listeria monocytogenes

The methodology of the US Food and Drug Administration was used (FDA) described by Hitchins (2003). Initially, the enrichment stage was conducted, that consisted of the homogenization of 25 g of the sample in a Stomacher sample homogenizer (490 strokes/minute, for 2 minutes) with 225 mL of the University of Vermont broth (UVM) (HIMEDIA®) and incubation at 30 °C for 24, 48 and 168 hours. After those periods, aliquots were streaked in Petri dishes containing Listeria Identification Agar Base (Palcam) (HIMEDIA®) and Listeria Oxford Medium Base (Oxford)(HIMEDIA®), which were incubated at 35 °C for 48 hours. Soon afterwards, typical colonies were transferred to tubes containing

Brain Heart Infusion Broth (BHI) (HIMEDIA[®]), with incubation at 37 °C for 24 hours. Later, grooves were accomplished in Palcam agar and Oxford agar to obtain pure cultures. The characteristic colonies were transferred to tubes containing BHI, with incubation at 37 °C for 24 hours. Later, the suspicious strains were submitted to the following biochemical tests: mobility, catalase, oxidase, urease and carbohydrate fermentation (Dextrose, Maltose, Esculin, Mannitol, Xylose and Rhamnose).

***Salmonella* sp.**

The analyses were made using the ISO 6579 (2007) methodology. For the pre-enrichment, a portion of 25 g of the sample was added in buffered peptone water (HIMEDIA[®]) and homogenized in a Stomacher (490 strokes/minute, for 2 minutes) and incubated at 35 °C for 18 hours. For the enrichment, Tetrathionate Broth was used (TT) (HIMEDIA[®]), with incubation at 37 °C for 24 hours and Rappaport Vassiliadis Broth (RR) (HIMEDIA[®]), with incubation at 41.5 °C for 24 hours. After the enrichment, aliquots of the TT and RR Broth were streaked on Hecktoen Enteric Agar (HIMEDIA[®]) and Rambach[®] Agar (Merck[®]), and incubated for 24 hours at 37 °C. Suspicious colonies of *Salmonella* sp. were removed and transferred to tubes containing Triple Sugar Iron Agar (Merck[®]) and Lysine Iron Agar (Merck[®]). For confirmation of *Salmonella* sp. presence, suspicious strains were submitted the Gram staining, the oxidase test and biochemical tests using Bactray[®] I and II.

RESULTS AND DISCUSSION

The results varied from < 0.48 to 8.04 Log MPN/g for total coliforms and from < 0.48 to 7.66 Log MPN/g for thermotolerant coliforms (Table 1).

Table 1 Result of total and thermotolerant coliforms counts from 28 samples analyzed, expressed as Log MPN / g

Sample	Total coliforms			Thermotolerant Coliforms		
	Collect 1	Collect 2	Collect 3	Collect 1	Collect 2	Collect 3
A	6.04	4.63	6.36	6.04	4.63	0.56
B	4.63	NC ^a	NC ^a	4.63	NC ^a	NC ^a
C	6.04	8.04	4.97	6.04	7.18	4.18
D	1.97	< 0.48	4.66	1.97	< 0.48	2.32
E	7.66	6.32	7.66	6.97	6.32	7.66
F	5.97	5.32	4.08	5.97	3.63	0.96
G	6.97	6.04	3.36	6.97	6.04	1.58
H	1.48	< 0.48	0.56	1.48	< 0.48	0.56
I	3.38	6.97	5.36	3.38	5.58	4.32
J	7.66	4.18	8.04	5.38	3.97	6.66

^aNot conducted due to sample unavailability in commerce during the collection period

Regarding the total coliforms count, although the current law does not establish a maximum limit for this group of microorganisms, it was verified that the results obtained in this work were superior to those found by Raimundo *et al.* (2005), who evaluated the microbiological quality of twelve samples of ricottas of six different brands marketed in the city of Alfenas, Minas Gerais, Brazil and obtained counts between 2.95 and 5.88 Log MPN/g.

For thermotolerant coliforms, 19 (67.85%) of the 28 analyzed samples presented counts above 2.7 Log MPN/g, the maximum value allowed by RDC No. 12 (Brasil 2001), being inappropriate for human consumption. The obtained results attest the unsatisfactory quality of the marketed ricottas, this fact also previously evidenced by Raimundo *et al.* (2005), who detected 83.3% of the

ricotta samples marketed in Alfenas, Minas Gerais, Brazil out of standard, and Esper (2006), who found 46.7% of the samples collected in Campinas, São Paulo, Brazil above the limit established by the legislation. However the quality of the ricottas produced by a dairy product producer in the municipal district of Sao José do Rio Preto was found within the current legislation. (Santos and Hoffmann 2010).

According to Franco and Landgraf (2002), in processed foods the occurrence high coliforms counts indicates inadequate processing and/or post-processing recontamination, the most frequent causes being those coming from the raw material, incorrectly sanitized equipment or manipulation without hygienic care. Forsythe (2005) emphasizes that because the coliforms can be destroyed by heat with a certain facility, their counts can be useful in post-processing contamination tests.

The results obtained by Santos and Hoffmann (2010) demonstrate that it is possible to obtain a product with satisfactory quality. Due to the fact that the whey and the milk are heated to a temperature around 90-95°C and the coliforms are easily destroyed by heat, a product with low counts or even coliform absence was expected. Therefore, the high counts found can be a repercussion of the inefficiency of the sanitation processes of the industry or flaws in the good sanitation practices during the production and manipulation of the product.

For *Staphylococcus* sp. the counts varied from < 1.00 to 7.64 Log CFU/g and for coagulase-positive staphylococci, the values varied from < 1.00 to 6.68 Log CFU/g (Table 2).

High counts of bacteria of the genus *Staphylococcus* can indicate flaws in good manipulation practices, because food handlers can be asymptomatic bearers of these microorganisms, besides deficiencies in equipment and utensil sanitation used during production.

The genus *Staphylococcus* includes more than 30 species of interest in the food area (Forsythe 2005), being divided in two groups - negative and positive - according to the response to the coagulase test, in other words, to the ability that the group presents in coagulating the plasma. In spite of some lineages of coagulase-negative *Staphylococcus* also being associated to diseases of food origin, those more commonly involved in food poisoning are the coagulase-positive, *S. aureus* being the main representative (Mattos 2005; Carmo *et al.* 2002).

Table 2 Results of the *Staphylococcus* sp. and coagulase-positive staphylococci counts from 28 samples analyzed, expressed as Log CFU/g

<i>Sample</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.			<i>Coagulase-positive Staphylococci</i>		
	<i>Collect 1</i>	<i>Collect 2</i>	<i>Collect 3</i>	<i>Collect 1</i>	<i>Collect 2</i>	<i>Collect 3</i>
A	6.90	5.63	5.54	6.53	4.73	5.02
B	7.52	NC ^a	NC ^a	< 1.00	NC ^a	NC ^a
C	5.88	6.97	6.30	< 1.00	6.27	5.32
D	< 1.00	< 1.00	4.47	< 1.00	< 1.00	3.51
E	6.34	5.12	7.64	< 1.00	< 1.00	6.68
F	5.32	6.09	< 1.00	4.16	4.94	< 1.00
G	4.28	< 1.00	< 1.00	3.12	< 1.00	< 1.00
H	< 1.00	3.64	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
I	< 1.00	5.83	< 1.00	< 1.00	4.88	< 1.00
J	5.59	5.20	6.23	4.89	4.00	5.73

^aNot conducted due to sample unavailability in commerce during the collection period

The importance of pathogens such as *Staphylococcus* sp. in foods is linked to their enterotoxigenic strength with consequent gastrointestinal disturbances when contaminated foods are ingested. It is noteworthy that the microorganism is thermolabile, capable of being destroyed after the standard cooking process. However, the previously produced enterotoxin in the food is heat resistant, and could remain active for several days (Gomes and Furlanetto 1997).

The poisoning caused by foods containing *S. aureus* enterotoxins is one of the most common types of food-borne diseases throughout the world (Rodrigues *et al.* 2004). According to Atanassova *et al.* (2001), in many countries *S. aureus* is considered the second most common pathogen causing food poisoning.

Although the Brazilian legislation only establishes standards for coagulase-positive staphylococci, high counts of *Staphylococcus* sp. are worrying from a public health point of view, because the production of enterotoxins by non-coagulase producing microorganisms of the genus *Staphylococcus*, such as, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* and *S. saprophyticus*, has been related (Cunha *et al.* 2006). Thus, it is emphasized that the current Brazilian legislation should be reviewed as to the inclusion of limits for *Staphylococcus* sp., as well as for coagulase-negative staphylococci.

According to Oliveira *et al.* (2002), samples that present up to 5 Log CFU/g do not cause problems to the consumer. Mossel and Garcia (1975) affirmed that the minimum production of staphylococcal enterotoxin in a food occurs when there are favorable temperature and pH conditions for the multiplication of the staphylococci upto counts of 5 Log CFU/g of food.

Of the 28 analyzed samples 12 (42.85%) presented counts above 5 Log CFU/g, therefore the samples were potentially enterotoxin vehicles according to

Oliveira *et al.* (2002), being able to cause poisoning. A higher result was found by Raimundo *et al.* (2005), where the counts of *Staphylococcus* sp. varied from 5.11 to 6.02, therefore 100% of the samples were above 5 Log CFU/g.

In respect to the coagulase-positive staphylococci counts, the Brazilian legislation (Brasil 2001) establishes a limit of 2.70 Log CFU/g. Of the 28 analyzed samples 14 (50%) were over the standards established by the legislation. Therefore putting consumer health in risk, due to the risk of enterotoxin production. Similar values were found by Souza and Hoffmann (2010), who found concentrations varying from 2.84 to 4.43, and 41.66% of the samples were above the standards of the legislation. However, Esper (2006), evaluating the microbiological quality of the different ricotta brands marketed in the municipal district of Campinas, SP, Brazil, found values that varied from < 1 to 3.67 Log CFU/g, verifying that only 2.2% of the samples were above the standards for coagulase-positive staphylococci, a value that was well below that obtained in the present work.

One of the important sources of contamination by *S. aureus* in manipulated foods are the handlers, because they are bearers of that pathogen in the air pathways and cutaneous infections. However, in spite of the various pieces of research pointing to direct manipulator participation as sources of food contamination, most of the registered outbreaks are directed to contamination by *S. aureus* through surfaces and polluted utensils (Forsythe 2005). Therefore the high *Staphylococcus* sp. and coagulase-positive staphylococci counts found in this work are indicative of manipulator hygiene conditions, surfaces that enter in contact with the product and utensils used during its production.

When comparing the results of the thermotolerant coliforms and coagulase-positive staphylococci counts, only seven (25%) samples were within the limits of the current law.

Of the 28 analyzed samples, four (C, E, I and J) presented as out of standard in the three collections for thermotolerant coliforms and another two presented as out for coagulase-positive staphylococci (E and J) and the sample J presented out of standard in the three collections conducted for thermotolerant coliforms as well as coagulase-positive staphylococci.

The presences of *L. monocytogenes* and *Salmonella sp.* were not detected in any of the 28 samples analyzed. The results indicate that the ricottas were within the established limits of the Brazilian legislation for those requirements (Brasil, 2001), in other words, absence in 25 g of the product, not offering risks to consumer health as to the presence of these microorganisms.

Concerning the absence of *L. monocytogenes* and *Salmonella sp.* in ricotta, similar results were found by Cosseddu *et al.* (1998), Paris *et al.* (2004), Raimundo *et al.* (2005) and Santos *et al.* (2008). Although Esper (2006), evaluating 45 samples of ricottas marketed in the city of Campinas, São Paulo, Brazil, found an absence of *Salmonella sp.* in all of the analyzed samples, *L. monocytogenes* was detected in 6.7% of the samples. Zaffari *et al.* (2007) isolated three strains of *L. monocytogenes* in ricotta type cheeses, sold along highways of the north coast of Rio Grande do Sul.

According to Raimundo *et al.* (2005), the absence of *Salmonella sp.* and *L. monocytogenes*, can be due to higher thermal sensitivity of these microorganisms, since the ricottas are submitted at high temperatures (90-95°C) during production, besides the fact of there not being reports in the literature of the presence of these microorganisms in the normal microbiota of the human body, therefore exempting the handlers as source of such microorganisms.

Listeria monocytogenes is one of the most severe pathogenic microorganisms to human health. It has been associated to several outbreaks of food origin, having the environment and foods (vegetables, meats, milk and derivatives) as a vehicle, the cheeses standing out (Loncarevic *et al.* 1998).

According to Branco *et al.* (2003), the average and high moisture cheeses are the most studied regarding contamination by *L. monocytogenes*, having been implicated in several cases of listeriosis.

Salmonellosis, usually, is caused by the consumption of foods of animal origin contaminated by *Salmonella* sp., such as birds, eggs, meats, and milk and its derivatives, although many other foods, including contaminated vegetables, have been implicated in the transmission of the disease. This pathogen occurs from the chain of primary food production to the domestic environments or food service establishments and institutions. *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium are the most important serotypes in the transmission of human salmonellosis (D'Aoust *et al.* 2001).

Although the presence of *Salmonella* sp and *L. monocytogenes* was not detected in the present work, these microorganisms deserve great attention due to their high pathogenicity, therefore the ricottas should constantly be analyzed as to presences of these microorganisms.

CONCLUSION

Based on the results, it was concluded that most of the samples presented unsatisfactory microbiological quality. Although some samples were within the standards established by the current law, and all of the samples presented an absence of *L. monocytogens* and *Salmonella* sp, the high number of out of standard samples is worrying, because the out of standard samples can offer consumer health risks, possibly causing an infection or poisoning of food origin.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the granting of the scholarship and the Fundação de

Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the financial support.

REFERENCES

- Associação Brasileira das Indústrias de Queijos – ABIQ. Produção de queijo ricota no ano de 2007. [Internet document] URL <http://www.abiq.com.br>. Accessed 12/12/2008.
- Atassanova V, Meindl A and Ring C (2001) Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP – PCR. *International Journal of Food Microbiology* **68** 105-113.
- Branco M A de A C, Figueiredo E A T, Borges M de F, Silva M C D da and Destro M T (2003) Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. *Boletim do Centro de Pesquisas de Processamento de Alimentos* **21** 393-408.
- Brasil. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Internet document] URL http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Accessed 01/01/2011.
- Calci K R, Burkhardt W and Watkins W D (1998) Occurrence of male specific bacteriophage in fecal and domestic animal wastes, human feces and human associated wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* **64** 5027-5029.
- Carmo L S, Dias R S, Linardi V R, Sena M J, Santos D A, Faria M E, Pena E C, Jett M and Heneine G (2002) Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology* **8** 9-14.

- Cosseddu A M, Santis E P L de, Mazzette, R, Fresi A and Lai, G (1998) Fresh cows' milk Ricotta: microbiological characteristics of hygienic and sanitary interest. *Latte* **22** 76–81.
- Costa F N, Lima R M S and Rabelo, R N (2002) Comportamento frente à ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isolados de derivados lácteos. *Higiene Alimentar* **16** 80-83.
- Cunha M R L S, Peresi P, Calsolari R A O and Araújo Jr J P (2006) Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology* **37** 70-74.
- D'Aoust J Y, Maurer J and Bailey J S (2001) *Salmonella* species. In *Food microbiology, fundamentals and frontiers*, pp 383-409. Doyle M P, Beuchat L R and Montville T J, eds. 2. ed. Washington: ASM.
- De Buyser M L, Dufour B, Marie M and Lafarge V (2001) Implication of milk and milk products in food-borne disease in France and in difference industrialized countries. *International Journal of Food Microbiology* **67** 1-17.
- Esper L M R (2006) *Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas-SP*. pp 97. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Farkye N Y (2004) Acid and Acid/Renner curd-cheeses Part C. Acid-heat Coagulated Cheeses. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, pp 343-348. Fox P F, ed. 3 ed. London: Elsevier Academic Press.
- Forsythe S J (2005) *Microbiologia da segurança alimentar*, pp 424. Porto Alegre: Artmed.
- Franco B D G M and Landgraf M (2002) *Microbiologia de Alimentos*, pp 182. São Paulo, Editora Atheneu.

- Gomes M F F and Furlanetto, S M (1997) Grupos de bactérias isoladas a partir de amostra de fígado bovino. *Revista de Microbiologia* **18** 335-343.
- Hitchins A D. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In U S Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual Online, 2003. [Internet document] URL <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>. Accessed 12/12/2010.
- ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4th ed. 2002. The International Organization for Standardization, amendment 1:15/07/2007.
- Kornacki J L and Jonhson J L (2001) *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, pp 69-82. Downes F P and Ito K, eds. Washington: American Public Health Association.
- Kosikowski F V and Mistry V V (1999) Soft Italian Cheese-Mozzarella and Ricotta. In *Cheese and Fermented Milk Foods*, pp 174-179. vol. 1. Virginia: F V Kosikowski L L C.
- Lancette G A and Bennett R W (2001) *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, pp 387-403. Downes F P K, ed. Washington: American Public Health Association.
- Loncarevic S, Bille E B J, Tham M L D and Tham W (1998) Characterization of *Listeria* strains isolated from soft and semi-soft cheeses. *Food microbiology* **15** 521-525.
- Maia S R, Ferreira A C and Abreu L R (2004) Uso do açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota. *Ciência e Agrotecnologia* **28** 358-365.

- Mattos E C (2005) Caracterização genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de alimentos, mãos de manipuladores de alimentos e veiculadas por formigas. pp 74 . Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo.
- Mossel D A A and Garcia M B (1975) *Microbiologia de los Alimentos, Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*, pp 375. Zaragoza: Acribia.
- Oliveira N M S, Nascimento L C and Fiorini J E (2002) Isolamento e identificação de bactérias facultativas mesofílicas em carnes frescas bovinas e suínas. *Revista Higiene alimentar* **16** 68-74.
- Paris A, Bacci C, Salsi A, Bonardi S and Brindani F (2004) Microbial characterization of organic dairy products: stracchino and ricotta cheeses. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria* **24** 317-325.
- Raimundo I de C, Fiorini J E and Piccoli R H (2005) Avaliação microbiológica de amostras de ricotas comercializadas no município de Alfenas, MG. *Revista Higiene Alimentar* **19** 54-55.
- Ribeiro A C, Marques S C, Sodr e A F, Abreu L R de and Picooli R H (2005) Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. *Ciência e Agrotecnologia* **29** 113-117.
- Rodrigues K, Moreira A N, Almeida A T S, Chiochetta D, Rodrigues M J, Brod C S, Carvalhal J B and Aleixo J A G (2004) Intoxica o estafilocócica em restaurante institucional. *Ciência Rural* **34** 297-299.
- Santos V A Q and Hoffmann F L (2010) Evolu o da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* **69** 38-46.
- Santos V A Q, Carvalho C C P de, Gonçalves T M V and Hoffmann F L (2008) Controle microbiano em linha de produ o de queijos Minas Frescal e Ricota. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* **103** 219-227.

- Silva N da, Junqueira V C A, Silveira N F A, Taniwaki M H, Santos R F S dos, Gomes R A R (2007) *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*, pp 552. São Paulo: Livraria Varela.
- Timm C D, Ross T B, Gonzalez H L and Oliveira D S (2004) Pontos críticos de controle na pasteurização do leite em microusinas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* **59** 75-80.
- Zaffari C B, Mello J F and Costa M da (2007) Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* **37** 862-867.

ARTIGO 2 **Especiarias no controle de *Staphylococcus aureus* em queijo ricota**

Artigo a ser submetido à Revista *Food Research International*, sendo apresentado segundo suas normas de publicação.

D.F. Brugnera ^{a,*}, M.M.M. de Oliveira ^a, J.G.L.F. Alves ^b, L.R. de Abreu ^c, R.H. Piccoli ^a

^a *Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, Minas Gerais, CEP 37200-000, Brazil*

^b *Laboratório de Operações Unitárias e Bioengenharia, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, Minas Gerais, CEP 37200-000, Brazil*

^c *Laboratório de Laticínios, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, Minas Gerais, CEP 37200-000, Brazil*

Autor para correspondência. Tel.: +55 35 3829 1392; fax: +55 35 3829 1401.

E-mail: danilobrugnera@hotmail.com (D.F. Brugnera).

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito antibacteriano de *Origanum vulgare* e *Salvia officinalis* contra o crescimento e produção de enterotoxina A por *Staphylococcus aureus* inoculado em ricota cremosa, bem como a aceitação sensorial das ricotas adicionadas destas especiarias. Inicialmente, avaliou-se a atividade inibitória das especiarias *in vitro* e, posteriormente, fez-se o estudo em ricota cremosa, segundo um Delineamento Composto Central Rotacional. *S. aureus*, inoculado previamente nas amostras, foi quantificado após 12, 24, 120 e 240 horas de e os resultados avaliados pela metodologia de superfície de resposta (MSR). SEA foi analisada após 24, 120 e 240 horas. Por último, ricotas contendo diferentes concentrações de *O. vulgare* e *S. officinalis* foram submetidas à avaliação por meio de teste aceitação. Nas análises *in vitro*, ambas as espécies demonstraram atividade antibacteriana, porém, houve maior potencial de *S. officinalis*. Pela MSR observou-se que as especiarias foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* em ricota, com diferentes padrões dependendo da concentração e temperatura. Em algumas amostras não foi detectada a presença de SEA. Quanto aos aspectos sensoriais, houve maior preferência pelas ricotas com baixas concentrações de especiarias. Este estudo comprovou que as especiarias são potenciais antibacterianos naturais no controle de *S. aureus* em ricota, contudo, mais pesquisas devem ser realizadas objetivando uma combinação satisfatória entre aceitação sensorial e efeito antimicrobiano.

Palavras-chave:

Antibacterianos naturais

Salvia officinalis

Origanum vulgare

Enterotoxina A

ABSTRACT

The objective was to evaluate the antibacterial effect of *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* against the growth and production of enterotoxin A by *Staphylococcus aureus* inoculated in creamy ricotta, as well as the sensorial acceptance of the ricottas with these spices added. Initially, the inhibitory activity of the spices *in vitro* was evaluated and later the study in creamy ricotta was conducted according to the Central Composite Rotational Design. *S. aureus*, previously inoculated in the samples was quantified after 12, 24, 120 and 240 hours and the results appraised by the response surface methodology (RSM). SEA was analyzed after 24, 120 and 240 hours. Finally, ricottas containing different concentrations of *O. vulgare* and *S. officinalis* underwent evaluation through the acceptance test. In the *in vitro* analyses, both species demonstrated antibacterial activity, however there was a higher potential of *S. officinalis*. By MSR it was observed that the spices were capable of inhibiting the growth of *S. aureus* in ricotta, with different standards depending on the concentration and temperature. In some samples the presence of SEA was not detected. As for the sensorial aspects, there was a higher preference for the ricottas with low spice concentrations. This study proved that the spices are potential natural antibacterials in the control of *S. aureus* in ricotta, however, more research should be conducted to identify a satisfactory combination between sensorial acceptance and antimicrobial effect.

Keywords:

Natural antibacterial

Salvia officinalis

Origanum vulgare

Enterotoxin A

1. Introdução

A ricota é um queijo suave, não maturado, tradicionalmente produzido na Itália a partir do leite de ovelha. Na atualidade, atingiu maior popularidade, sendo elaborada de soro ou de mistura de soro e leite bovino pasteurizado integral ou desnatado (Farkye, 2004). Apesar da temperatura do soro ou da mistura durante a fabricação da ricota atingir entre 80 e 92 °C, favorecendo a obtenção de massa com baixa contagem microbiana, verifica-se que, após sua obtenção, essa massa fica exposta a inúmeras fontes de contaminação (Reij & Den Aantrekker, 2004; Ribeiro, Marques, Sodré, Abreu, & Picooli, 2005). O resfriamento lento, alta umidade do queijo e seu pH favorecem o crescimento microbiano (Kosikowski & Mistry, 1999) e, em razão de suas características intrínsecas, a ricota fresca é considerada um dos produtos que apresentam melhores condições para desenvolvimento e crescimento de microrganismos, tanto deterioradores quanto patogênicos, o que compromete a qualidade do produto em sua vida útil (Maia, Ferreira, & Abreu, 2004).

De acordo com Scallan et al. (2011), estima-se que, a cada ano, nos Estados Unidos, 31 patógenos causem 37,2 milhões de doenças, das quais 36,4 milhões são adquiridas domesticamente; e dessas, 9,4 milhões são veiculadas por alimentos, sendo 3,6 milhões causadas por bactérias.

Dentre os microrganismos capazes de contaminar a ricota, durante sua fabricação e que oferecem riscos à saúde dos consumidores, *Staphylococcus aureus* possui grande relevância. *S. aureus* é importante causador de intoxicações veiculadas por alimentos em todo o mundo (Le Loir, Baron, & Gautier, 2003), sendo, em 2008, considerada a quarta maior causa de toxinfecções alimentares na União Europeia (EFSA, 2010).

As intoxicações estafilocócicas são causadas pela ingestão de uma ou mais toxinas pré-formadas, produzidas por *S. aureus* durante sua multiplicação

no alimento (Balaban & Rasooly, 2000; Le Loir, Baron, & Gautier, 2003). Os sintomas surgem rapidamente e incluem náusea, vômito e diarreia (Jablonski & Bohach, 2001). *S. aureus* está associado a alimentos, geralmente ricos em proteínas, que requerem extensiva manipulação, frequentemente, em combinação com tratamento térmico inadequado e/ou temperatura de armazenamento inapropriada (Le Loir, Baron, & Gautier, 2003). Atualmente, 22 enterotoxinas ou proteínas que se assemelham a estas foram identificadas (Argudín, Mendonza & Rodicio, 2010), sendo a enterotoxina A a mais comumente encontrada em surtos relacionados a alimentos (Cha et al., 2006; Kérouanton et al., 2007; Wieneke, Roberts, & Gilbert, 1993).

Manter e melhorar a qualidade de queijos e produtos derivados é busca constante das indústrias laticinistas e pesquisadores (Gunasekaran, 2008). Atualmente, existe pressão por parte dos consumidores pela produção de alimentos livres de conservantes químicos, sendo os conservantes naturais de maior aceitação. Alguns trabalhos já foram realizados a fim de avaliar a eficiência da utilização de óleos essenciais e especiarias como antimicrobianos naturais (Ceylan, Fung, & Sabah, 2004; Leuschner & Zamparini, 2002; Liu, Tsau, Lin, Jan, & Tan, 2009; Uhart, Maks, & Ravishankar, 2006). Entretanto, a aplicação destes em alimentos pode ocasionar certos inconvenientes, visto que muitas vezes a concentração necessária para o efeito antimicrobiano é pouco aceita sensorialmente, o que torna a avaliação sensorial de grande relevância para uma abordagem completa.

Objetivou-se avaliar o efeito antibacteriano de *Origanum vulgare* e *Salvia officinalis* contra o crescimento e produção de enterotoxina A por *Staphylococcus aureus* inoculado em ricota cremosa, bem como a aceitação sensorial das ricotas adicionada destas especiarias.

2. Material e Métodos

2.1. Bactéria utilizada, padronização do inóculo e estocagem

Foi utilizado *S. aureus* ATCC 13565 produtor de enterotoxina A, cedido pelo Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade da Saúde pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil).

A padronização do inóculo foi realizada com base na curva de crescimento, utilizando-se a absorbância de 0,684 a 620 nm . Durante a realização do experimento, a cepa foi mantida a -20 °C em meio de cultura próprio para congelamento (por 100 mL de água destilada: 15 mL de glicerol; 0,5 g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; pH 7,2-7,4).

2.2. Obtenção, preparo e qualidade microbiológica das especiarias utilizadas

Origanum vulgare e *S. officinalis* (Santa Barbara[®], Franca, São Paulo) foram adquiridos no comércio da cidade de Lavras, Minas Gerais, Brasil, na forma desidratada, embaladas e prontas para o consumo. As especiarias foram moídas em moinho de faca, com peneira de 20 mesh, a fim de se obter uma granulometria fina.

A qualidade microbiológica das especiarias foi assegurada considerando as análises requeridas pela RDC nº 12 (Brasil, 2001), além de *S. aureus*, e realizadas de acordo com Silva et al. (2007).

2.3. Atividade antibacteriana in vitro das especiarias

Foi utilizada metodologia proposta por Shelef, Naglik e Bogen (1980) e Eruteya e Odunfa (2009), com adaptações. As especiarias moídas foram adicionadas em diferentes concentrações (0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 e 3,00 % m/v) em TSA e autoclavadas a 121 °C / 15 min. Além destas, foi

realizado o tratamento controle sem adição de especiarias. O meio de cultura, contendo ou não as especiarias, foi colocado em placas de Petri estéreis e, após solidificação, inocularam-se alíquotas de 100 µL de cultura contendo 3 Log UFC/mL de *S. aureus*. Foram feitas 5 repetições. As placas foram incubadas a 37 °C / 24 horas e, após esse período, as colônias foram quantificadas e o resultado expresso em porcentagem de inibição em relação ao número de colônias das placas controle (sem especiarias) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de inibição} = 100 - [(\text{n}^\circ \text{ de colônias} \times 100) / \text{controle}]$$

2.4. Atividade antimicrobiana das especiarias em ricota cremosa

2.4.1. Delineamento experimental e análise estatística

Foram selecionados cinco níveis de temperatura (7,3 – 20,7 °C), concentração de *O. vulgare* (0 - 3,4% m/m) e concentração de *S. officinalis* (0 - 3,4% m/m), utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três variáveis (Rodrigues & Iemma, 2005). Foram realizados 17 ensaios, sendo 8 referentes ao planejamento fatorial completo 2^3 (n=3), 6 pontos axiais e 3 repetições do ponto central. A faixa de variação para as 3 variáveis independentes são apresentados na Tabela 1. As variáveis respostas foram o Log UFC/g de *S. aureus* após 12, 24, 120 e 240 horas de armazenamento.

Os resultados das análises foram avaliados pela metodologia de superfície de resposta (MSR) utilizando o *software* Statistica 6.0. Foram ajustados os modelos de regressão de segunda ordem, contendo termos lineares, quadráticos e as interações binárias das três variáveis independentes (x1, x2 e x3). Para testar a adequação dos modelos, realizou-se a análise de variância, onde se observou a significância da regressão pelo teste F e pelo coeficiente de determinação.

Tabela 1

Variáveis e níveis do planejamento experimental.

Variáveis	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (x1)	7,3 °C	10 °C	14 °C	18°C	20,7 °C
Concentração de <i>O. vulgare</i> (m/m) (x2)	0 %	0,7 %	1,7 %	2,7 %	3,4 %
Concentração de <i>S. officinalis</i> (m/m) (x3)	0 %	0,7 %	1,7 %	2,7 %	3,4 %

2.4.2. Fabricação das ricotas e adição das especiarias

O tipo de ricota utilizada neste trabalho foi a cremosa, que difere da ricota tradicional pela adição de leite durante o processo de fabricação. A ricota cremosa consistiu na adição de 10% de leite em relação ao volume de soro.

Após acondicionamento do soro em tanque com aquecimento indireto, procedeu-se à redução da acidez original (11 e 14 g de ácido láctico / 100g) para 8 g de ácido láctico / 100g, utilizando-se Hidróxido de Sódio (NaOH). Após a neutralização, o soro foi aquecido até 70 °C e o leite integral padronizado em 3 % de gordura foi adicionado. A acidez do leite foi previamente corrigida para 8 g de ácido láctico / 100g. A temperatura foi ajustada para 80°C sendo, em seguida, adicionados 80 mL de ácido láctico (85%) para cada 100 litros de soro. O aquecimento foi interrompido a 82 °C e a massa foi coletada.

A massa resultante foi acondicionada em recipiente estéril e, após o resfriamento, inoculou-se *S. aureus* (5 Log UFC/g). Posteriormente, a massa foi dividida em 22 porções iguais, 17 referentes aos ensaios do DCCR e cinco referentes à avaliação do crescimento de *S. aureus* em cada temperatura (7,3; 10; 14; 18 e 20,7 °C), que não receberam especiarias. As especiarias foram adicionadas, quando pertinente. As ricotas foram moldadas em formato cilíndrico e acondicionadas, individualmente, em embalagens de polietileno

tereftalato (PET) com as seguintes características: dimensões internas de 85 x 43mm, capacidade de 170 mL, transparente. Posteriormente foram armazenadas em diferentes temperaturas de acordo com o planejamento experimental durante 12, 24, 120 e 240 horas.

2.4.3. Análise microbiológica das ricotas

As amostras foram analisadas após 12, 24, 120 e 240 horas de armazenamento. Amostras de 10 g foram adicionadas em 90 mL de citrato de sódio 2% (m/v) e homogeneizadas em *Stomacher* (490 golpes por minuto, durante 2 minutos). A diluição foi feita em água peptonada 0,1% (p/v), seguida do plaqueamento em superfície em ágar Baird-Parker (BP) com incubação a 37 °C / 24-48 horas. A contagem de *S. aureus* foi expressa em Log UFC/g.

2.4.4. Análise de enterotoxina A

Com o objetivo de avaliar a capacidade de *O. vulgare* e *S. officinalis* inibirem a produção de enterotoxina em ricota cremosa, as amostras referentes aos ensaios do DCCR foram analisadas quanto à presença de enterotoxina após 24, 120 e 240 horas de armazenamento, utilizando-se o kit RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E (R-Biopharm, Germany), de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante, com limite de detecção de 0,2-0,7 µg/kg. As absorbâncias foram lidas em leitor de microplacas Anthos® 2010. Neste método, os valores de absorbância são correlacionados, positivamente, com a concentração de enterotoxina, quanto maior o valor da absorbância lida maior a concentração de enterotoxina na amostra analisada.

2.5. Análises da composição físico-química

A massa de ricota cremosa sem adição de *O. vulgare* e *S. officinalis* foi analisada quanto ao teor de umidade (AOAC, 2005); atividade de água (Aqualab

Decagon modelo 3 TE); gordura (AOAC, 2005); acidez titulável (AOAC, 2005); pH (Instituto Adolfo Lutz, 1985); e cinzas (AOAC, 2005). O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método micro Kjeldahl e o conteúdo de nitrogênio não proteico pelo método micro Kjeldahl. O nitrogênio proteico foi calculado a partir da diferença entre os percentuais de nitrogênio total e nitrogênio não proteico (AOAC, 2005) e o teor de proteína total foi obtido multiplicando-se o percentual de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,38.

2.6. Avaliação Sensorial das ricotas com diferentes concentrações de especiarias

Para avaliação sensorial foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC), onde o fator analisado foi o efeito das diferentes proporções de *O. vulgare* e *S. officinalis* adicionados em ricotas cremosas. Para análise estatística foi utilizado o programa SISVAR versão 5.3 (Ferreira, 2008), os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao índice de 95% de confiança.

A massa de ricota cremosa foi preparada conforme descrito no item 2.4.2 e, posteriormente, adicionadas de diferentes concentrações de especiarias conforme Tabela 2. A avaliação sensorial foi realizada em cabines individuais com provadores não treinados, sendo alunos, professores e funcionários da UFLA, com faixa etária entre 18 e 45 anos, num total de 50 provadores.

As amostras foram apresentadas com 1,5 cm de arestas, à temperatura ambiente (25 °C), em copos plásticos descartáveis codificados com números de três dígitos de forma balanceada (Wakeling & MacFie, 1995), em duas sessões. Na primeira sessão, apresentaram-se cinco amostras e, na segunda, as outras quatro. O teste foi realizado no período da manhã e tarde. Para limpeza do palato foi fornecido água.

As amostras foram avaliadas quanto à aceitação em relação aos atributos

aparência, cor, aroma, sabor, impressão global, utilizando a escala hedônica estruturada de nove pontos, variando entre os termos hedônicos “desgostei extremamente (escore 1)” e “gostei extremamente (escore 9)” (Stone & Sidel, 1993).

Após a avaliação das amostras, cada provador respondeu um questionário visando coletar informações a respeito do consumo e forma de consumo de ricota, bem como da opinião sobre a incorporação de especiarias nesse alimento.

Tabela 2

Tratamentos utilizados na avaliação sensorial das ricotas com diferentes concentrações de *O. vulgare* e *S. officinalis*.

Tratamentos	Concentração de especiarias (g/100g)	
	<i>O. vulgare</i>	<i>S. officinalis</i>
1	0,7	0,0
2	1,7	0,0
3	3,4	0,0
4	0,0	0,7
5	0,0	1,7
6	0,0	3,4
7	0,7	0,7
8	1,7	1,7
9	0,0	0,0

3. Resultados e Discussão

3.1. Atividade antimicrobiana *in vitro* das especiarias

Todas as concentrações de *S. officinalis* inibiram completamente o crescimento de *S. aureus*. No que diz respeito a *O. vulgare*, a inibição foi crescente, de acordo com o aumento da concentração, e a partir de 2% (m/v) houve inibição completa da bactéria (Tabela 3).

Tabela 3

Atividade antimicrobiana de *O. vulgare* e *S. officinalis* no controle do crescimento de *S. aureus* expressa em porcentagem de inibição em relação ao tratamento controle.

Concentração de especiaria (% m/v)	Porcentagem de Inibição (%)	
	<i>O. vulgare</i>	<i>S. officinalis</i>
0,03	13,79	100,00
0,06	19,21	100,00
0,12	23,94	100,00
0,25	26,49	100,00
0,50	45,55	100,00
1,00	92,17	100,00
2,00	100,00	100,00
3,00	100,00	100,00

Poucos são os estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de especiarias moídas adicionadas aos meios de cultura. Eruteya e Odunfa (2009) verificaram que cravo, alho e pimenta preta, adicionados em ágar nutriente, foram efetivos na inibição de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Enterobacter*. Já Pandit e Shelef (1994) comprovaram a atividade antilisterial de alecrim e cravo em *Brain Heart Infusion Agar*.

Maior atividade antibacteriana é observada quando a bactéria é adicionada em especiarias ou em meios de cultura, do que em alimentos (Uhart, Maks, & Ravishankar, 2006). O nível de especiarias e seus óleos essenciais necessário para inibir microrganismos em alimentos têm sido relatados como muito maior do que aquele determinado *in vitro*, quando se utilizam meios de cultura em laboratórios (Gould, 1996; Juven, Kanner, Schved, & Weisslowicz, 1994). Um dos motivos pode ser a interação com os componentes dos alimentos que reduz a atividade antimicrobiana, onde gorduras e/ou proteínas podem ser responsáveis pela redução na atividade bactericida de especiarias em matriz alimentar (Uhart, Maks, & Ravishankar, 2006). Portanto, afirmar que determinada especiaria possui atividade antimicrobiana apenas com testes *in vitro*, sem o estudo em matriz alimentar, pode ocasionar falsa afirmação. Desta forma, a avaliação *in vitro* dever ser utilizada como um teste rápido a fim de verificar se a especiaria tem potencial antimicrobiano e que, possivelmente, desempenhe tal comportamento em matriz alimentar.

A atividade antimicrobiana das especiarias está relacionada à sua composição química. Segundo Andersen e Markham (2006) e Triantaphyllou, Blekas, e Boskou (2001), compostos fenólicos, como flavonóides e ácidos fenolcarbônicos constituem um dos mais importantes grupos de substâncias farmacologicamente ativos, com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antiinflamatórias. Uhart, Maks, e Ravishankar (2006) citam que compostos fenólicos, polifenóis e flavonoides são importantes substâncias antibacterianas de plantas que possuem múltiplos modos de ação. Ayala-Zavala, Ayala-Zavala, González-Aguilar, e Del-Toro-Sánchez (2009) relatam que o mecanismo de ação de um dado constituinte pode diferir quando comparado ao de outros, sendo relatados vários alvos na célula microbiana: destruição da parede celular e membrana citoplasmática, danificação de proteínas de membrana, liberação de conteúdo celular, coagulação do citoplasma, depleção da força próton motiva,

inativação de enzimas essenciais e perturbação da funcionalidade do material genético.

A composição química de *O. vulgare* e *S. officinalis* já foi descrita na literatura e compostos com atividade antimicrobiana foram encontrados. Juglal, Govinden e Odhav (2002) e Daferera, Ziogas e Polissiou (2003) relatam que o *O. vulgare*, seja na forma *in natura*, de folhas secas ou de produtos derivados, tem se apresentado como interessante fonte de agentes antimicrobianos. Milos, Mastelic, e Jerkovic (2000) encontraram no óleo essencial de *O. vulgare* predominância de timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno, 1-octen-3-ol e borneol. Radušienė, Ivanauskas, Janulis, e Jakštas (2008) citam como compostos fenólicos de *O. vulgare* o ácido rosmarínico, ácido clorogênico, ácido cafeico, dentre outros. As folhas de *S. officinalis*, por sua vez, além de conter óleos essenciais, apresentam compostos fenólicos, ambos reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Delamare, Moschen-Pistorello, Artico, Atti-Serafini, e Echeverrigaray, (2007) encontraram no óleo essencial de *S. officinalis* especialmente α -tujona, 1,8-cineol, borneol, cânfora e β -pineno. Zheng e Wang (2001), pesquisando seus compostos fenólicos, encontraram ácido rosmarínico, luteonina, hispidulina, cirsimarina, ácido cafeico e ácido vanílico.

3.2. Composição físico-química da ricota cremosa

A ricota cremosa sem adição apresentou: 76,38 % de umidade, 0,99 de atividade de água, 23,62 % de extrato seco, 10,1 % de gordura, 0,27 de acidez (g/100g de ácido láctico), 13,36 % de proteína total, 7,27 % de proteína solúvel, 0,97 % de nitrogênio não proteico, 0,89 % de cinzas e pH 6,54.

3.3. Atividade antibacteriana das especiarias em ricota cremosa

Na Fig. 1, observa-se o crescimento de *S. aureus* em ricota cremosa, sem adição de especiarias, armazenada em diferentes temperaturas.

Microrganismos do gênero *Staphylococcus* são capazes de se desenvolver em ampla faixa de temperatura (7 a 48,5 °C), com ótimo entre 30 e 37 °C (Schmitt, Schuler-Schmid, & Schmidt-Lorenz, 1990).

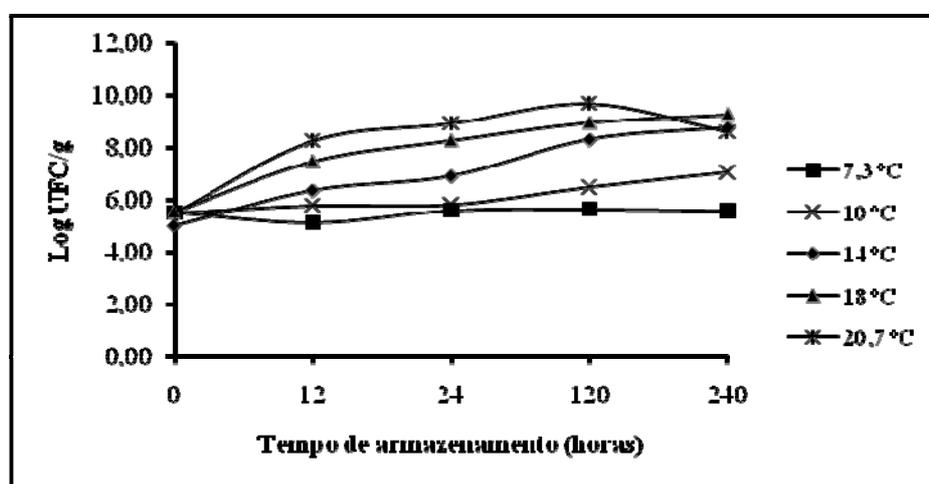


Fig. 1 Cinética de crescimento de *S. aureus* em ricota cremosa armazenada em diferentes temperaturas.

Observa-se que a 7,3 °C o número de microrganismos permaneceu constante, ou seja, sem crescimento, e as células se mantiveram viáveis. No entanto, à medida que o valor se aproximou da temperatura ótima de crescimento, a taxa de crescimento aumentou gradativamente (Fig. 1). O comportamento observado em todas as temperaturas demonstra que caso haja contaminação do alimento por *S. aureus* e este for mantido acima da temperatura de refrigeração (~5 °C) o microrganismo pode, rapidamente, atingir populações elevadas, produzindo enterotoxinas e tornando o alimento potencial causador de

toxinoses. Segundo Jablonski e Bohach (2001), para a formação de enterotoxinas em quantidade suficiente para provocar intoxicação são necessárias 10^5 a 10^6 UFC de *S. aureus* por grama de alimento. Portanto, é desejável que a população bacteriana fique abaixo de 10^5 UFC/g para evitar a produção de enterotoxina ou, então, que se utilizem compostos capazes de inibir a produção de enterotoxina caso a população bacteriana ultrapasse 10^5 UFC/g.

Os resultados do DCCR para avaliação da atividade antimicrobiana de *O. vulgare* e *S. officinalis* em ricota cremosa no controle de *S. aureus* encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4

Matriz do DCCR com níveis reais e codificados das variáveis independentes e respostas Log UFC/g de *S. aureus* após 12 (Y1), 24 (Y2), 120 (Y3) e 240 (Y4) horas de armazenamento.

Ensaio	x1 T ^a (°C)	x2 O ^b (% m/m)	x3 S ^c (% m/m)	Y1	Y2	Y3	Y4
1	-1 (10)	-1 (0,7)	-1 (0,7)	5,57	5,76	6,31	6,41
2	-1 (10)	-1 (0,7)	1 (2,7)	5,38	5,00	4,53	4,48
3	-1 (10)	1 (2,7)	-1 (0,7)	5,34	5,03	4,36	3,88
4	-1 (10)	1 (2,7)	1 (2,7)	5,23	4,84	4,81	4,79
5	1 (18)	-1 (0,7)	-1 (0,7)	6,68	8,10	8,66	8,83
6	1 (18)	-1 (0,7)	1 (2,7)	5,38	5,78	7,49	7,45
7	1 (18)	1 (2,7)	-1 (0,7)	5,40	5,76	6,78	6,60
8	1 (18)	1 (2,7)	1 (2,7)	5,08	5,08	5,42	5,54
9	-1,68 (7,3)	0 (1,7)	0 (1,7)	5,12	5,02	5,03	4,30
10	1,68 (20,7)	0 (1,7)	0 (1,7)	6,55	7,63	7,93	7,24
11	0 (14)	-1,68 (0)	0 (1,7)	5,47	5,79	8,31	8,58
12	0 (14)	1,68 (3,4)	0 (1,7)	5,05	5,14	4,16	7,03
13	0 (14)	0 (1,7)	-1,68 (0)	5,36	5,85	6,81	6,53
14	0 (14)	0 (1,7)	1,68 (3,4)	5,06	4,72	4,30	7,48
15	0 (14)	0 (1,7)	0 (1,7)	5,15	4,99	4,41	4,31
16	0 (14)	0 (1,7)	0 (1,7)	4,76	4,89	4,57	4,31
17	0 (14)	0 (1,7)	0 (1,7)	4,97	4,86	4,45	4,27

^aTemperatura. ^b*O. Vulgare*. ^c*S. officinalis*.

Com base na análise de variância, verificou-se que todas as variáveis estudadas (temperatura, concentração de *O. vulgare* e concentração de *S. officinalis*) tiveram efeito significativo no Log de UFC/g de *S. aureus* em ricota cremosa, para todos os tempos de armazenamento estudados (12 (Y1), 24 (Y2), 120 (Y3) e 240 (Y4) horas). A temperatura apresentou efeito positivo e a concentração de *O. vulgare* e *S. officinalis* apresentaram efeitos negativos.

Por meio dos resultados obtidos, foi possível determinar os coeficientes de regressão para as variáveis respostas Y1, Y2, Y3 e Y4, que estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5

Coeficientes de regressão para as respostas Y1, Y2, Y3 e Y4.

Coeficientes	Y1	Y2	Y3	Y4
Média	4,957	4,918	4,486	4,365
x1 (L)	0,251*	0,621*	0,968*	1,011*
x1 (Q)	0,320*	0,484*	0,677*	0,294 ^{NS}
x2 (L)	-0,195*	-0,368*	-0,923*	-0,657*
x2 (Q)	0,116 ^{NS}	0,179 ^{NS}	0,590*	1,015*
x3 (L)	-0,178*	-0,429*	-0,592*	-0,137 ^{NS}
x3 (Q)	0,098 ^{NS}	0,116 ^{NS}	0,349*	0,731*
x1 x2	-0,150 ^{NS}	-0,269*	-0,285 ^{NS}	-0,240 ^{NS}
x1 x3	-0,165 ^{NS}	-0,256*	-0,150 ^{NS}	-0,178 ^{NS}
x2 x3	0,133 ^{NS}	0,276*	0,255 ^{NS}	0,395 ^{NS}
R ²	85,37 %	94,74 %	94,74 %	85,00 %

*Significativo a 10%. ^{NS}Não significativo.

A adequação dos modelos pode ser verificada pelos coeficientes de determinação (R²), que explicam entre 85% a 94,74% da variância total das

respostas (Tabela 5) e pela análise de variância (Tabela 6). Para todas as respostas analisadas, o F tabelado foi menor que o F calculado, indicando que os modelos ajustaram bem aos dados, permitindo que fossem geradas as superfícies de resposta e curvas de contorno.

As superfícies de respostas e as curvas de contornos geradas a partir dos modelos completos para as variáveis respostas Log UFC/g de *S. aureus* após 12, 24, 120 e 240 horas de armazenamento, encontram-se nas Fig. 2, 3, 4 e 5, respectivamente. As variáveis independentes que não aparecem nos gráficos foram fixadas em seus respectivos pontos centrais exceto para variável temperatura a qual foi fixada no ponto -1,68 (7,3°C), em decorrência do maior interesse em se avaliar o efeito antimicrobiano do *O. vulgare* e *S. officinalis* em temperatura próxima à temperatura de refrigeração.

Baseando-se nas Fig. 2, 3, 4 e 5, observa-se que, para todos os tempos de armazenamento estudados, o Log de UFC/g de *S. aureus* aumentou, de acordo com o aumento da temperatura, no entanto, diminuiu com o aumento da concentração de *O. vulgare* ou *S. officinalis*.

A partir das curvas de contorno, observa-se que, para 12 horas de armazenamento, a maior atividade antimicrobiana foi à temperatura de 13,3 °C e concentração de 1,9 % de *O. vulgare* e *S. officinalis*. Para 24 horas de armazenamento, a maior atividade ocorreu à temperatura de 14,2 °C e concentração de *O. vulgare* e *S. officinalis* acima de 3,4 %. Houve interação significativa entre as variáveis analisadas, no entanto para a interação entre Concentração de *O. vulgare* x Concentração de *S. officinalis*, o efeito foi menor do que o efeito individual de cada variável. Com 120 horas de armazenamento o maior efeito antimicrobiano ocorreu na temperatura de 11,8 °C e concentração de *O. vulgare* e *S. officinalis* de 2%. Após 240 horas de armazenamento, observou-se que a maior atividade foi à temperatura de 7,3 °C , concentração de 1,8 % e 1,6 % para de *O. vulgare* e *S. officinalis*, respectivamente.

Tabela 6

Análise de variância dos modelos de regressão.

Respostas	FV ^a	SQ ^b	GL ^c	QM ^d	Fcal ^e	Ftab*
Y1	Regressão	3,50	9	0,39	4,54	3,68
	Resíduos	0,60	7	0,08		
	Total	4,10	16			
Y2	Regressão	14,00	9	1,56	18,14	3,68
	Resíduos	0,78	7	0,08		
	Total	14,78	16			
Y3	Regressão	37,63	9	4,18	48,77	3,68
	Resíduos	2,09	7	0,08		
	Total	39,72	16			
Y4	Regressão	36,07	9	4,00	46,75	3,68
	Resíduos	6,37	7	0,08		
	Total	42,44	16			

^aFontes de Variação. ^bSomas de quadrados. ^cGraus de liberdade. ^dQuadrados médios. ^eF calculado. *Valores tabelados de F, 5%.

Com exceção da resposta Y2, observa-se que, para as demais, o coeficiente de regressão para concentração de *O. vulgare* foi superior ao coeficiente para concentração de *S. officinalis*, o que indica que a concentração de *O. vulgare* exerceu maior efeito na variável resposta do que a concentração de *S. officinalis*.

Embora com 120 horas de armazenamento, a concentração ótima tanto para *O. vulgare* quanto para *S. officinalis* foi de 2% (Fig. 4 F), observando-se a superfície de resposta para as duas variáveis (Fig 4 E). Verifica-se que *O. vulgare* teve maior capacidade em inibir o crescimento bacteriano do que *S.*

officinalis, este maior efeito de *O. vulgare*, também, foi comprovado pelo maior coeficiente de regressão em relação a *S. officinalis*.

Com 240 horas de armazenamento (Fig. 5), a concentração ótima de *O. vulgare* (1,8 %) foi maior do que a de *S. officinalis* (1,6 %), no entanto, *O. vulgare* apresentou capacidade antimicrobiana maior quando comparado a *S. officinalis*, o que foi comprovado pelos coeficientes de regressão (Tabela 5).

O maior efeito antimicrobiano de *O. vulgare* em relação a *S. officinalis* pode ser explicado em virtude da maior proporção de compostos fenólicos presentes em *O. vulgare*.

Observa-se que a temperatura ótima para a atividade do *O. vulgare* e *S. officinalis* esteve entre 7,3 e 14,2 °C. A recomendação dos fabricantes é que produtos como ricota devem ser armazenados a 5 °C, no entanto, observa-se que, muitas vezes, essa temperatura não é respeitada nos locais de comercialização e nem mesmo nos refrigerados domésticos. Portanto, caso o produto esteja contaminado com *S. aureus* a elevação da temperatura poderá favorecer o crescimento deste, podendo ocorrer a produção de enterotoxinas, tornando o alimento um potencial causador de intoxicações. No entanto, a presença de especiarias, como *O. vulgare* e *S. officinalis*, pode controlar o crescimento bacteriano, impedindo que ocorra elevação da população e a consequente produção de enterotoxina, ou mesmo, que a população esteja elevada a produção de enterotoxina pode ser inibida.

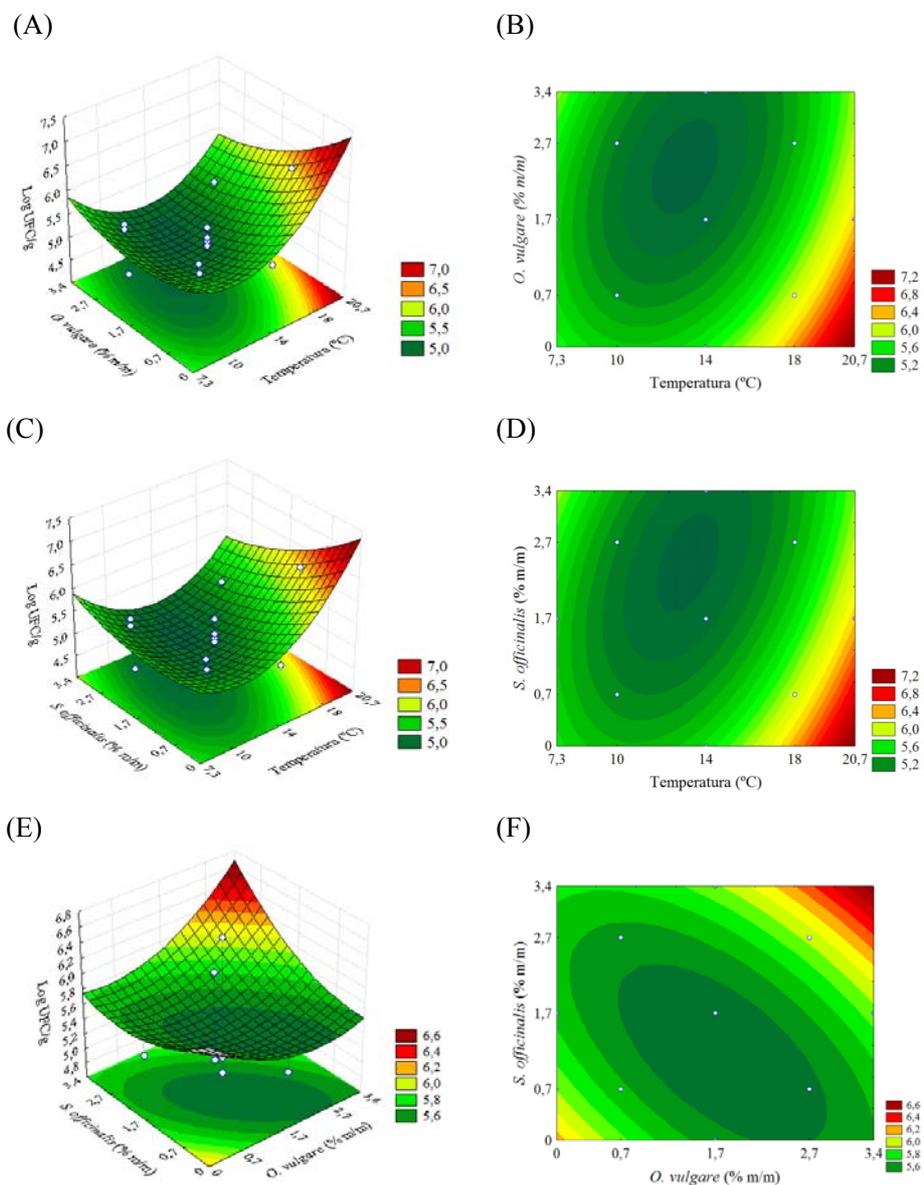


Fig. 2 Superfícies de resposta (A, C e E) e curvas de contorno (B, D e F) obtidas em função da contagem (Log UFC/g) de *S. aureus* em queijo ricota após 12 horas de armazenamento. (A e B) *O. vulgare* versus temperatura. (C e D) *S. officinalis* versus temperatura. (E e F) *S. officinalis* versus *O. vulgare*.

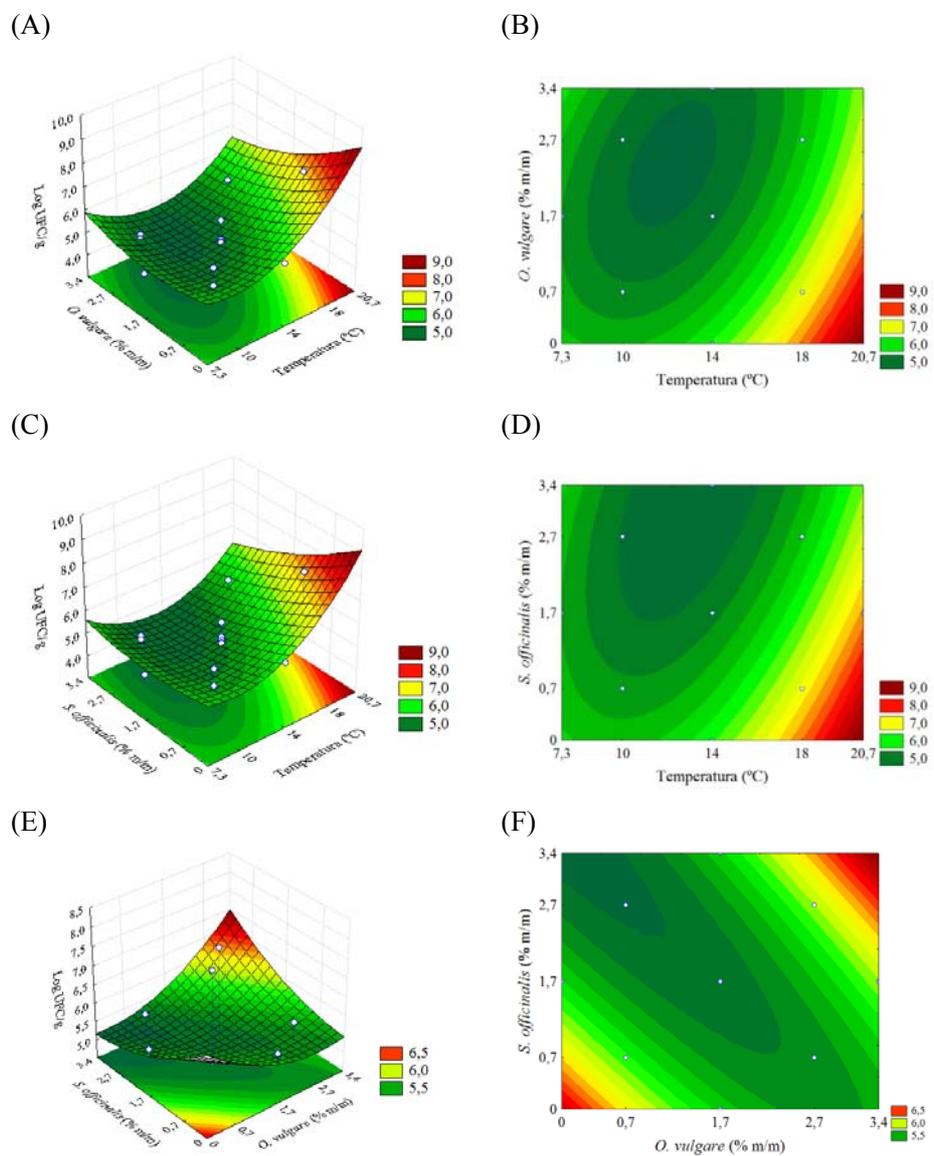


Fig. 3 Superfícies de resposta (A, C e E) e curvas de contorno (B, D e F) obtidas em função da contagem (Log UFC/g) de *S. aureus* em queijo ricota após 24 horas de armazenamento. (A e B) *O. vulgare* versus temperatura. (C e D) *S. officinalis* versus temperatura. (E e F) *S. officinalis* versus *O. vulgare*.

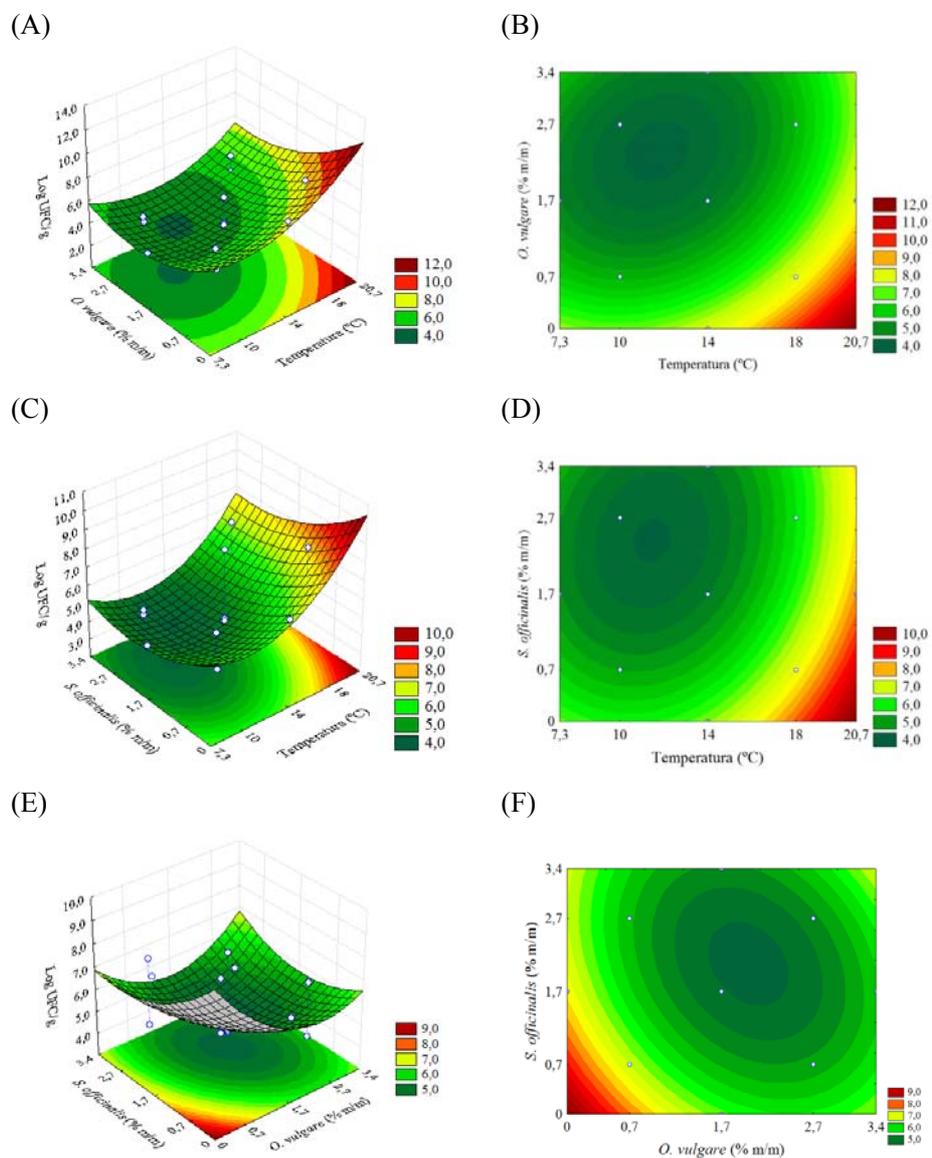


Fig. 4 Superfícies de resposta (A, C e E) e curvas de contorno (B, D e F) obtidas em função da contagem (Log UFC/g) de *S. aureus* em queijo ricota após 120 horas de armazenamento. (A e B) *O. vulgare* versus temperatura. (C e D) *S. officinalis* versus temperatura. (E e F) *S. officinalis* versus *O. vulgare*.

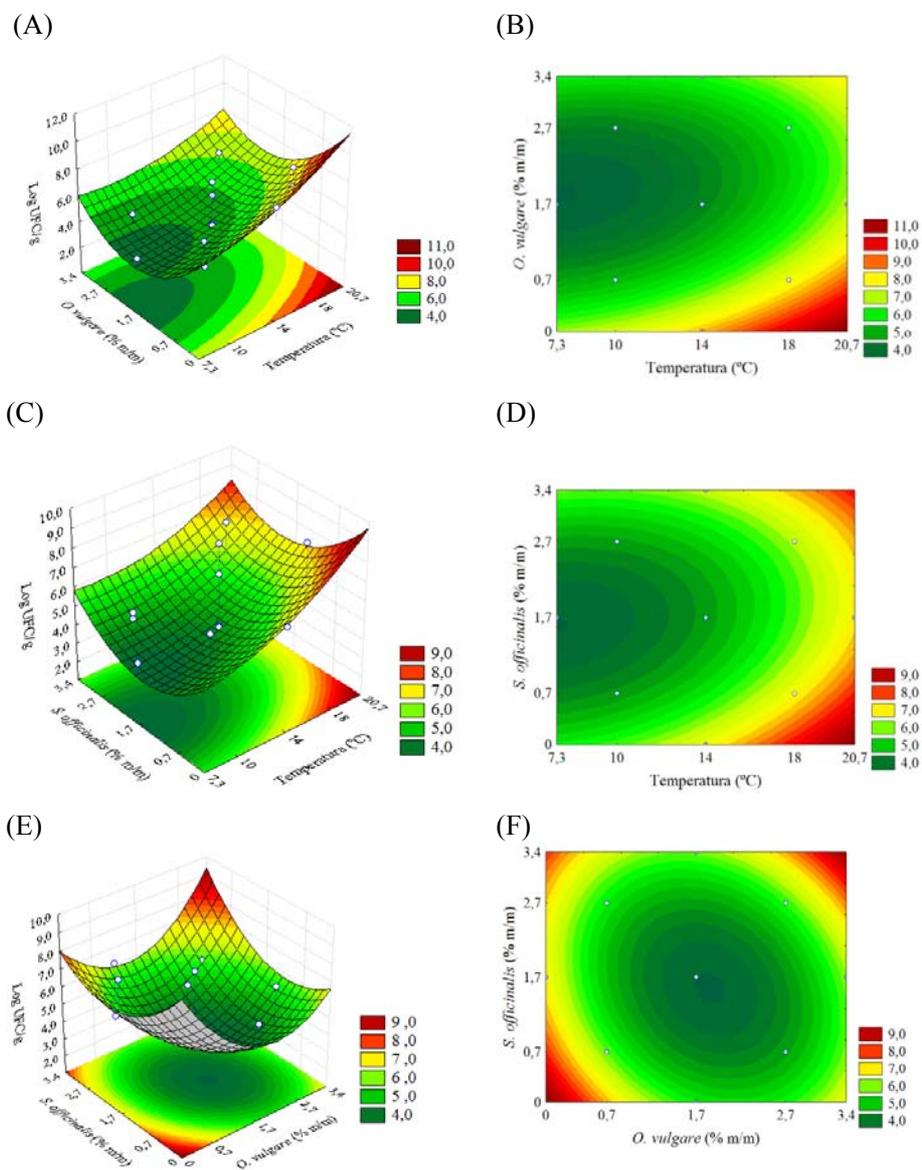


Fig. 5 Superfícies de resposta (A, C e E) e curvas de contorno (B, D e F) obtidas em função da contagem (Log UFC/g) de *S. aureus* em queijo ricota após 240 horas de armazenamento. (A e B) *O. vulgare* versus temperatura. (C e D) *S. officinalis* versus temperatura. (E e F) *S. officinalis* versus *O. vulgare*.

Verifica-se nas Fig. 2, 3, 4, e 5 que o efeito antibacteriano foi predominantemente bacteriostático e não bactericida. O efeito bacteriostático das especiarias pode auxiliar a manutenção da qualidade microbiológica do produto, durante seu armazenamento, impedindo a multiplicação bacteriana e o alcance de níveis capazes de produzir enterotoxinas. No entanto, para que a qualidade microbiológica seja atingida e mantida é necessário, também, a adoção de práticas higiênicas adequadas durante a produção do queijo ricota.

No que diz respeito à *S. aureus*, o controle da produção de enterotoxinas é fundamental, visto que as toxinoses causadas *S. aureus* não são decorrentes da ingestão de alimentos que contenham a bactéria, mas sim em decorrência da presença de enterotoxinas que foram produzidas durante sua multiplicação no alimento. Uma vez produzida, sua eliminação é difícil por causa de sua característica termorresistente, resistindo a tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização. No caso de queijos, que são alimentos prontos para o consumo (*read to eat foods, RTE*), esta característica se torna, ainda, mais preocupante (Borges, Nassu, Pereira, Andrade, & Kuaye, 2008)

Os resultados da análise da produção de enterotoxina A foram calculados por meio da subtração do valor de corte do valor da absorbância lida da amostra. O valor de corte foi calculado pela média da absorbância do controle negativo somado a 0,15. Desta forma, os valores negativos indicam ausência e os valores positivos presença de enterotoxina. Os resultados encontram-se na Tabela 7. Observa-se que nos tratamentos 2, 7 e 8 não foi detectada a presença de enterotoxina em nenhum dos tempos de armazenamento estudados (24, 120 e 240 horas). Já em outros tratamentos que, também, continham especiarias, a produção de enterotoxina foi observada somente a partir das 120 horas de armazenamento (tratamentos 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15) ou a partir das 240 horas de armazenamento (tratamentos 3 e 4). Enfatiza-se que, mesmo sendo observada a produção de enterotoxina em alguns tratamentos que continham

especiarias, nota-se, ao comparar os valores das absorvâncias dos mesmos com os valores dos tratamentos controles (sem adição de especiarias) correspondentes, que estes apresentaram uma concentração de enterotoxina menor do que nas amostras controle. Este fato pode ter ocorrido em consequência do menor crescimento de *S. aureus*, do efeito inibitório das especiarias ou de um efeito inibitório da produção de enterotoxina decorrente da presença das especiarias. No que se refere aos tratamentos controle (sem a adição de especiarias), pode-se observar que a produção de enterotoxina A depende da temperatura de armazenamento, sendo maior na ricota controle armazenada a 20,7 °C e menor na armazenada a 7,3 °C (Tabela 7).

Gonzalez-Fandos, Sierra, Garcia Lopez, Otero, e Sanz (1996) pesquisaram o efeito de orégano em salsichas fermentadas espanholas sobre *S. aureus*. Apesar de não ser muito efetivo no controle do crescimento microbiano, o orégano (2% m/m) não permitiu a síntese das enterotoxinas A, C e D e inibiu, parcialmente, de enterotoxina A. No entanto, baixos níveis de orégano (0,12 e 0,5%) estimularam a síntese de enterotoxinas A, B e D.

Como citado anteriormente, lipídeos e proteínas podem reduzir a atividade antimicrobiana das especiarias em matriz alimentar. Esse comportamento, também, foi observado no presente estudo. Quando comparados os resultados da avaliação *in vitro* (Tabela 3), com os resultados das especiarias em ricota cremosa (Figuras 2, 3, 4 e 5), observa-se que os resultados do teste *in vitro* foram, consideravelmente, superiores aos obtidos em ricota cremosa. De acordo com Farbood, Macneil, e Ostovar (1976), a elevada fração lipídica pode absorver a especiaria e, então, reduzir sua concentração da fase aquosa e, conseqüentemente, seu efeito bactericida. É possível, também, que a gordura presente na ricota englobe a célula bacteriana, reduzindo a penetração da especiaria e a atividade antimicrobiana.

Tabela 7

Absorbâncias obtidas pela diferença entre o controle positivo e o valor de corte, referentes à produção de enterotoxina A por *S. aureus* em ricota cremosa adicionada ou não de especiarias.

Tratamentos	24 horas	120 horas	240 horas
1	0,1655	0,1535	0,1170
2	-0,1625	-0,1525	-0,1425
3	-0,1460	-0,1465	2,3660
4	-0,1480	-0,1445	0,2940
5	-0,0570	1,3515	1,3055
6	-0,1450	0,0970	-0,0340
7	-0,1380	-0,1215	-0,0985
8	-0,1440	-0,1635	-0,1145
9	-0,1490	0,0405	0,3980
10	-0,1360	0,4485	0,5100
11	-0,1460	1,0430	1,6700
12	-0,1195	0,5750	0,3840
13	-0,0900	0,4585	0,3105
14	0,1385	0,0880	0,5480
15	-0,1480	1,3745	0,4760
Controle ^a 7,3 °C	-0,1760	1,3335	-0,1355
Controle ^a 10 °C	-0,0390	0,7020	9,8025
Controle ^a 14 °C	-0,1520	1,2495	9,8140
Controle ^a 18 °C	0,0185	9,8110	9,8145
Controle ^a 20,7 °C	2,0810	9,8120	9,8130

^aRicotas cremosas sem adição de especiarias.

Atualmente, existem poucos estudos disponíveis na literatura que avaliaram a utilização de especiarias como conservantes naturais em alimentos, como os realizados por Ceylan, Fung, e Sabah (2004), Leuschner e Zamparini (2002), Liu, Tsau Lin, Jan, e Tan (2009) e Uhart, Maks, e Ravishankar (2006). Segundo Bedin, Gutkoski, e Wiest (1999) e Souza (2003), além da propriedade aromatizante, as especiarias poderiam aumentar a vida útil dos alimentos por sua atividade bacteriostática e bactericida, retardando o começo da deterioração e o crescimento de microrganismos indesejáveis, interferindo, significativamente, na epidemiologia e profilaxia de surtos de toxinfecções alimentares.

Resultados de diferentes estudos sugerem que óleos essenciais e extratos de especiarias são antimicrobianos mais efetivos do que especiarias secas, já que os componentes ativos são mais concentrados nestas substâncias. Entretanto, em situações reais de preparo de alimentos, consumidores utilizam especiarias secas, e não óleos essenciais (Uhart, Maks, & Ravishankar, 2006). As especiarias utilizadas neste estudo apresentaram atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, podendo ser alternativa no controle desta bactéria, tanto em nível industrial quanto doméstico, visto que especiarias desidratadas são de fácil aquisição e podem ser adquiridas e utilizadas facilmente mesmo em cozinhas residenciais. A utilização de concentrações entre 1,6 e 2% (m/m) de *O. vulgare* e *S. officinalis* podem ajudar a garantir a segurança microbiológica da ricota cremosa armazenada em temperaturas entre 7,3 e 14°C, auxiliando na inibição do crescimento de *S. aureus* e produção de enterotoxina.

3.4. Análise Sensorial das ricotas com diferentes concentrações de especiarias

Os provadores preferiram quanto à aparência, cor, sabor e impressão global, as ricotas cremosas que continham baixa concentração de especiarias (1 e 4). Estas amostras praticamente não diferiram da amostra controle (9) quanto a estes atributos. Em seguida, os provadores preferiram as amostras 2, 5 e 7. Já

as amostras 3, 6 e 8, com as maiores concentrações de especiarias, receberam as menores notas. Nota-se que quanto ao sabor a maior preferência foi por *O. vulgare* (Tabela 8).

Tabela 8

Médias das notas atribuídas pelos provadores para aceitação em relação à aparência, cor, aroma, sabor e impressão global das ricotas cremosas adicionadas de especiarias.

Amostra	Aparência	Cor	Aroma	Sabor	Impressão Global
1 (0,7% O ^A + 0% S ^B)	6,90 ^c	7,06 ^d	6,76 ^b	6,46 ^d	6,66 ^d
2 (1,7% O ^A + 0% S ^B)	6,45 ^b	6,60 ^c	6,88 ^b	5,64 ^c	6,02 ^c
3 (3,4% O ^A + 0% S ^B)	4,72 ^a	4,78 ^a	6,32 ^a	4,30 ^b	4,60 ^a
4 (0,7% S ^B + 0% O ^A)	7,18 ^c	7,40 ^d	6,66 ^b	5,74 ^c	6,28 ^c
5 (1,7% S ^B + 0% O ^A)	6,42 ^b	6,46 ^c	6,16 ^a	4,28 ^b	5,14 ^b
6 (3,4% S ^B + 0% O ^A)	5,38 ^a	5,62 ^b	5,78 ^a	3,02 ^a	4,04 ^a
7 (0,7% O ^A + 0,7% S ^B)	6,48 ^b	6,44 ^c	6,36 ^a	5,14 ^c	5,58 ^c
8 (1,7% O ^A + 1,7% S ^B)	4,86 ^a	5,02 ^a	5,84 ^a	3,78 ^b	4,42 ^a
9 (0% O ^A + 0% S ^B)	7,50 ^c	7,62 ^d	6,82 ^b	6,86 ^d	7,18 ^d
CV (%)*	24,71	24,16	27,64	40,92	33,84

Letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Scott-knott. ^A*O. vulgare*. ^B*S. officinalis*.

*Coeficiente de variação.

No presente estudo, 80% dos provadores declararam consumir ricota e 20% declararam não consumir o produto. Dentre os que consomem ricota, 64% declararam que a utilizam para o preparo de lanches, patês ou outros pratos, e 36% declararam consumir a mesma pura. Dentre os provadores que participaram

da avaliação sensorial, 92% declararam que passariam a consumir mais ricota se esta fosse comercializada com a adição de especiarias. Este resultado indica que a fabricação de ricotas com especiarias pode estimular a comercialização.

O interesse por queijos com especiarias tem crescido e a ricota com especiarias tem aparecido como boa opção de consumo, por se tratar de um alimento de fácil digestão e uma das formas mais simples e econômicas de aproveitamento do soro proveniente de vários tipos de queijos, obtendo-se produto de fácil comercialização e baixo custo (Maia, Ferreira, & Abreu, 2004).

A maior preferência dos consumidores foi por ricotas com baixa concentração de especiarias: amostra 1, com 0,7% de *O. vulgare* e, amostra 4, com 0,7% de *S. officinalis*. No entanto, observou-se que a maior atividade antibacteriana foi obtida em maiores concentrações, entre 1,6 a 2,0% (m/m) de *S. officinalis* e *O. vulgare*. A solução para aliar atividade antibacteriana e aceitação sensorial pode estar na utilização de métodos combinados, onde o efeito das especiarias será somado a outras alternativas de controle, preferencialmente natural, como bacteriocinas, atmosfera modificada e filmes ou revestimentos comestíveis com incorporação de antimicrobianos. O estudo da associação de outras espécies de plantas, também, não pode ser descartado, pois, pode amenizar ou mesmo solucionar as alterações organolépticas indesejáveis.

4. Conclusão

As especiarias *O. vulgare* e *S. officinalis* foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* em ricota cremosa, bem como reduzir a produção de enterotoxina A. Quanto à aceitação sensorial, houve maior preferência pelas amostras que continham baixa concentração de especiarias.

Assim, conclui-se e se enfatiza que a importância deste estudo foi fornecer informações a respeito de uma alternativa natural nova e promissora para o controle de *S. aureus* em alimentos.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de estudo e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

5. Referências

- Andersen, O. M. & Markham, K. R. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and applications*. Boca Raton: CRC Press.
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Toxins*, 2, 1751-1773.
- AOAC-Association of Official Analytical Chemists. (2005). *Official methods of analysis of the association analytical chemists*. (18th ed.). Maryland: AOAC.
- Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A., & Del-Toro-Sánchez, L. (2009). Enhancing Safety and Aroma Appealing of Fresh-Cut Fruits and Vegetables Using the Antimicrobial and Aromatic Power of Essential Oils. *Journal of Food Science*, 74, 84-91.
- Balaban, N.; & Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 1-10.
- Bedin, C., Gutkoski, S. B., & Wiest, J. M. (1999) Atividade antimicrobiana das especiarias. *Higiene Alimentar*, 13, 26-29.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Resolução RDC ° 12, de 02 de janeiro de 2001*. Aprova regulamento técnico sobre os

- padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de janeiro de 2001. Recuperado em 17 agosto, 2010, de <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>.
- Borges, M. de F., Nassu, R. T., Pereira, J. L., Andrade, A. P. C. de, Kuaye, V. A. Y. (2008). 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*, 38, 1431-1438.
- Ceylan, E.; Fung, D. Y. C.; & Sabah, J. R. (2004). Antimicrobial Activity and Synergistic Effect of Cinnamon with Sodium Benzoate or Potassium Sorbate in Controlling *Escherichia coli* O157:H7 in Apple Juice. *Journal of Food Science*, 69, 102-106.
- Cha, J. O., Lee, J. K., Jung, Y. H., Yoo, J. I., Park, Y. K., Kim, B. S., & Lee, Y. S. (2006). Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *Journal of Applied Microbiology* 101, 864–871.
- Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; & Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinera*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22, 39-44.
- Delamare, A. P. L.; Moschen-Pistorello, I. T.; Artico, L.; Atti-Serafini, L.; & Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100, 603–608.
- Eruteya, O. C., & Odunfa, S. A. (2009). Antimicrobial properties of three spices used in the preparation of suya condiment against organisms isolated from formulated samples and individual ingredients. *African Journal of Biotechnology*, 8, 2316-2320.

- EFSA - European Food Safety Authority. (2010). *The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008*. Recuperado em 16 janeiro, 2011, de <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1496.htm>.
- Farbood, M. I., Macneil, J. H., & Ostovar, K. (1976). Effect of rosemary spice extraction on growth of microorganisms in meats. *Journal of milk and food technology*, 39, 675–679.
- Farkye, N. Y. (2004). Acid and Acid/Renner curd-cheeses Part C. Acid-heat Coagulated Cheeses. In P. F. Fox. (Ed.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (pp. 343-348). London: Elsevier Academic Press.
- Ferreira, D. F. (2008). SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Científica Symposium, Lavras*, 6, 36-41.
- Gonzalez-Fandos, E.; Sierra, M. L.; Garcia Lopez, M. L.; Otero, A.; & Sanz, J. (1996). Effect of the major herbs and spices in Spanish fermented sausages on *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 47, 43-47.
- Gould, G. W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection*, 59(Suppl.), 82–86.
- Gunasekaran, S. (2008). Chemical and biological study of aerial parts of dill (*Anethum graveolens* L.). *Egyptian Journal of Biomedical Sciences*, 23, 73–90.
- Instituto Adolfo Lutz. (1985). *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. (3rd ed.). São Paulo: IAL.
- Jablonski, L. M., & Bohach, G. A. (2001). *Staphylococcus aureus*. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville. (Eds.), *Food microbiology, fundamentals and frontiers* (pp. 411-434). Washington: ASM.

- Juglal, S., Govinden, R., & Odhav, B. (2002). Spices oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *Journal of Food Protection*, 65, 638-687.
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F. & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 626–631.
- K erouanton, A., Hennekinne, J. A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., & De Buyser, M. L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 369–375.
- Kosikowski, F. V., & Mistry, V. V. (1999). Soft Italian Cheese-Mozzarella and Ricotta. In F. V. Kosikowski, & V. V. Mistry (Eds.), *Cheese and Fermented Milk Foods. Volume 1. Origins and Principles* (pp. 174-179). Westport: FV Kosikowski, LLC.
- Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2, 63–76.
- Leuschner, R. G. K., & Zamparini, J. (2002). Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. *Food Control*, 13, 399–404.
- Liu, D. C., Tsau, R. T., Lin, Y. C., Jan, S. S., & Tan, F. J. (2009). Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 117, 106–113.
- Maia, S. M., Ferreira, A. C., Abreu, L. R. de. (2004). Uso do açafrão (*Curcuma longa* L.) na redu o da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota. *Ciência e Agrotecnologia*, 28, 358-365.

- Milos, M., Mastelic, J., & Jerkovic, I. (2000) Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from orégano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry*, 71, 79-83.
- Pandit, V. A., & Shelef, L. A. (1994). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiology*, 11, 57-63.
- Radušienė, J.; Ivanauskas, L.; Janulis, V.; & Jakštas, V. (2008) Composition and variability of phenolic compounds in *Origanum vulgare* from Lithuania. *Biologija*, 54, 45-49.
- Reij, M. W., & Den Aantrekker, E. D. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 1-11.
- Ribeiro, A. C., Marques, S. C., Sodré, A. F., Abreu, L. R. de, & Picooli, R. H. (2005). Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. *Ciência e Agrotecnologia*, 29, 113-117.
- Rodrigues, M. I., & Iemma, A. F. (2005). *Planejamento de Experimentos e Otimiza o de Processos*. (1 ed.). Campinas: Editora Casa do Pão.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M-A., Roy, S. L., Jones, J.L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7-15.
- Schmitt, M., Schuler-Schmid, U., & Schmidt-Lorenz, W. (1990). Temperature limits of growth, TNases and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 1-20.
- Shelef, L. A.; Naglik, O. A.; Bogen, D. W. (1980). Sensitivity of some common foodborne bacteria to the spices sage, rosemary and all spices. *Journal of Food Science*, 45, 1042-1044.

- Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S., & Gomes, R. A. R. (2007). *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. (3rd ed.). São Paulo: Livraria Varela.
- Souza, E. L. (2003) Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. *Higiene alimentar*, 17, 113, 38-42.
- Stone, H. S., & Sidel, J. L. (1993). *Sensory evaluation practices*. San Diego: Academic.
- Triantaphyllou, K., Blekas, G., & Boskou, D. (2001). Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52, 313-317.
- Uhart, M., Maks, N., & Ravishankar, S. (2006). Effect of spices on growth and survival of *Salmonella* Typhimurium dt 104 in ground beef stored at 4 and 8 °C. *Journal of Food Safety*, 26, 2115–2125.
- Wakeling, I. N., & MacFie, H. J. H. (1995). Designing consumer trials balanced for first and higher orders of carry-over effect when only a subset of k samples from t may be teste. *Food Quality and Preference*, 6, 299-308.
- Wieneke, A. A., Roberts, D., & Gilbert, R. J. (1993). Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–90. *Epidemiology and Infection*, 110, 519–531.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.

ANEXOS

ANEXO A		Página
Tabela 1A	Valores experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR, do Log UFC/g de <i>S. aureus</i> após 12 horas de armazenamento.....	99
Tabela 2A	Valores experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR, do Log UFC/g de <i>S. aureus</i> após 24 horas de armazenamento.....	100
Tabela 3A	Valores experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR, do Log UFC/g de <i>S. aureus</i> após 120 horas de armazenamento.....	101
Tabela 4A	Valores experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR, do Log UFC/g de <i>S. aureus</i> após 240 horas de armazenamento.....	102
Tabela 5A	Análise de variância para aceitação sensorial do atributo aparência em função dos tratamentos estudados.....	103
Tabela 6A	Análise de variância para aceitação sensorial do atributo cor em função dos tratamentos estudados.....	103
Tabela 7A	Análise de variância para aceitação sensorial do atributo aroma em função dos tratamentos estudados.....	103
Tabela 8A	Análise de variância para aceitação sensorial do atributo sabor em função dos tratamentos estudados.....	104
Tabela 9A	Análise de variância para aceitação sensorial do atributo impressão global em função dos tratamentos estudados.	104

ANEXO A

Tabela 1A Valores experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR, do Log UFC/g de *S. aureus* após 12 horas de armazenamento.

Ensaio	Valor experimental (Log UFC/g)	Valor previsto (Log UFC/g)	Desvios	Desvio relativo (%)
1	5,57	5,43	0,14	2,51
2	6,68	6,56	0,12	1,77
3	5,34	5,07	0,27	4,97
4	5,40	5,61	-0,21	-3,82
5	5,38	5,14	0,24	4,46
6	5,38	5,61	-0,23	-4,30
7	5,23	5,31	-0,08	-1,61
8	5,08	5,19	-0,11	-2,08
9	5,12	5,44	-0,32	-6,20
10	6,55	6,28	0,27	4,12
11	5,47	5,61	-0,14	-2,60
12	5,05	4,96	0,09	1,87
13	5,36	5,53	-0,17	-3,22
14	5,06	4,94	0,12	2,46
15	5,15	4,96	0,19	3,74
16	4,76	4,96	-0,20	-4,14
17	4,97	4,96	0,01	0,26

Tabela 2A Valores experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR, do Log UFC/g de *S. aureus* após 24 horas de armazenamento.

Ensaio	Valor experimental (Log UFC/g)	Valor previsto (Log UFC/g)	Desvios	Desvio relativo (%)
1	5,76	5,62	0,14	2,36
2	8,10	7,92	0,18	2,27
3	5,03	4,87	0,16	3,12
4	5,76	6,09	-0,33	-5,73
5	5,00	4,73	0,27	5,46
6	5,78	5,99	-0,21	-3,70
7	4,84	5,08	-0,24	-4,98
8	5,08	5,27	-0,19	-3,80
9	5,02	5,24	-0,22	-4,40
10	7,63	7,33	0,30	3,96
11	5,79	6,04	-0,25	-4,37
12	5,14	4,81	0,33	6,49
13	5,85	5,96	-0,11	-1,96
14	4,72	4,52	0,20	4,14
15	4,99	4,92	0,07	1,44
16	4,89	4,92	-0,03	-0,58
17	4,86	4,92	-0,06	-1,20

Tabela 3A Valores experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR, do Log UFC/g de *S. aureus* após 120 horas de armazenamento.

Ensaio	Valor experimental (Log UFC/g)	Valor previsto (Log UFC/g)	Desvios	Desvio relativo (%)
1	6,31	6,47	-0,16	-2,53
2	8,66	9,28	-0,62	-7,12
3	4,36	4,68	-0,32	-7,43
4	6,78	6,35	0,43	6,33
5	4,53	5,08	-0,55	-12,05
6	7,49	7,28	0,21	2,77
7	4,81	4,31	0,50	10,39
8	5,42	5,38	0,04	0,80
9	5,03	4,77	0,26	5,15
10	7,93	8,02	-0,09	-1,19
11	8,31	7,70	0,61	7,31
12	4,16	4,60	-0,44	-10,63
13	6,81	6,47	0,34	5,04
14	4,30	4,48	-0,18	-4,14
15	4,41	4,49	-0,08	-1,73
16	4,57	4,49	0,08	1,83
17	4,45	4,49	-0,04	-0,82

Tabela 4A Valores experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR, do Log UFC/g de *S. aureus* após 240 horas de armazenamento.

Ensaio	Valor experimental (Log UFC/g)	Valor previsto (Log UFC/g)	Desvios	Desvio relativo (%)
1	6,41	6,16	0,25	3,84
2	8,83	9,02	-0,19	-2,17
3	3,88	4,54	-0,66	-17,01
4	6,60	6,44	0,16	2,46
5	4,48	5,46	-0,98	-21,78
6	7,45	7,60	-0,15	-2,06
7	4,79	5,41	-0,62	-12,98
8	5,54	6,60	-1,06	-19,12
9	4,30	3,49	0,81	18,73
10	7,24	6,89	0,35	4,80
11	8,58	8,33	0,25	2,89
12	7,03	6,12	0,91	12,88
13	6,53	6,66	-0,13	-1,96
14	7,48	6,20	1,28	17,13
15	4,31	4,36	-0,05	-1,27
16	4,31	4,36	-0,05	-1,27
17	4,27	4,36	-0,09	-2,22

Tabela 5A Análise de variância para aceitação sensorial do atributo aparência em função dos tratamentos estudados.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	8	401,88	50,23	21,27	0,0000*
Erro	441	1041,34	2,365		
Total corrigido	449	1443,22			
CV (%) = 24,71					
Média geral: 6,22					
Número de observações: 450					

*Significativo, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Tabela 6A Análise de variância para aceitação sensorial do atributo cor em função dos tratamentos estudados.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	8	403,32	50,41	21,53	0,0000*
Erro	441	1032,68	2,34		
Total corrigido	449	1436,00			
CV (%) = 24,16					
Média geral: 6,34					
Número de observações: 450					

*Significativo, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Tabela 7A Análise de variância para aceitação sensorial do atributo aroma em função dos tratamentos estudados.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	8	68,38	8,55	2,73	0,0060*
Erro	441	1379,42	3,13		
Total corrigido	449	1447,80			
CV (%) = 27,64					
Média geral: 6,40					
Número de observações: 450					

*Significativo, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Tabela 8A Análise de variância para aceitação sensorial do atributo sabor em função dos tratamentos estudados.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	8	648,99	81,12	19,20	0,0000*
Erro	441	1863,74	4,23		
Total corrigido	449	2512,73			
CV (%) = 40,92					
Média geral: 5,02					
Número de observações: 450					

*Significativo, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Tabela 9 Análise de variância para aceitação sensorial do atributo impressão global em função dos tratamentos estudados.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	8	463,56	57,95	16,44	0,0000*
Erro	441	1553,96	3,52		
Total corrigido	449	2017,52			
CV (%) = 33,84					
Média geral: 5,55					
Número de observações: 450					

*Significativo, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

ANEXO B

Página

Figura 1B	Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para as respostas Y1 (A), Y2 (B), Y3 (C) E Y4(D).....	106
-----------	---	-----

ANEXO B

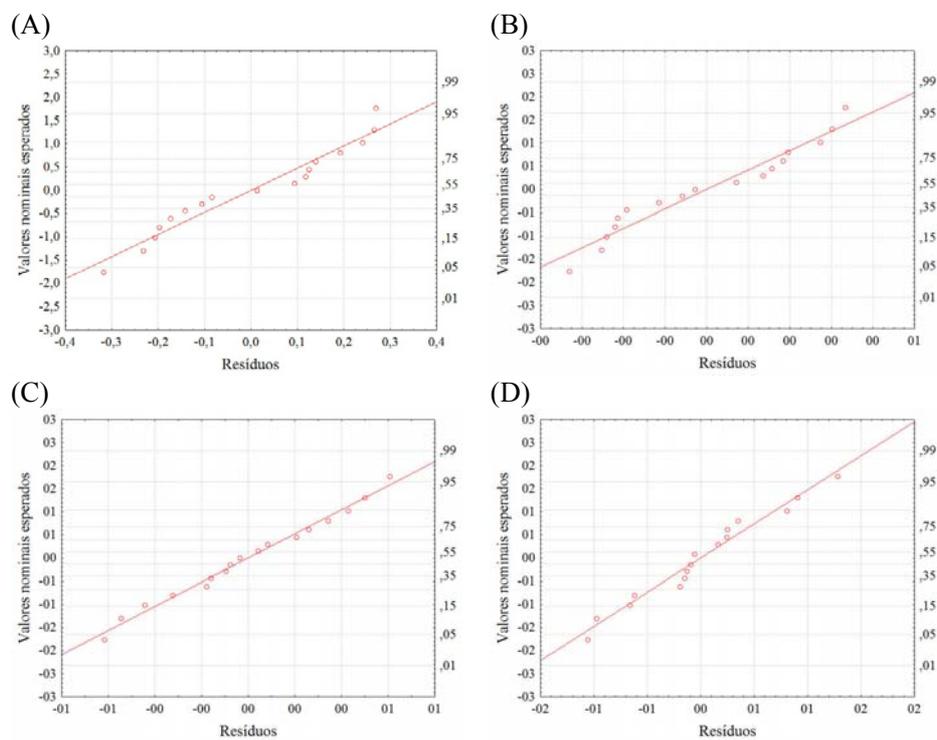


Figura 1B Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para as respostas Y1 (A), Y2 (B), Y3 (C) E Y4(D).