

EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
CONDIMENTOS SOBRE O CRESCIMENTO DE
Staphylococcus aureus EM RICOTA CREMOSA

ALEXANDRE TOURINO MENDONÇA

2004

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

Mendonça, Alexandre Tourino

Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa / Alexandre Tourino Mendonça.

-- Lavras : UFLA, 2004.

72 p. : il.

Orientadora: Roberta Hilsdorf Picccoli.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Ricota. 2. Óleo essencial. 3. Estafilococo. 4. Orégano. 5. Manjeriço. 6. Cravo da Índia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-637.353

ALEXANDRE TOURINO MENDONÇA

Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004**

ALEXANDRE TOURINO MENDONÇA

Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 20 de DEZEMBRO de 2004

Profa. Dra Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada	UEM
Profa. Dra Maria das Graças Cardoso	UFLA
Profa. Dra Fabiana Queiroz Ferrua	UFLA
Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu	UFLA
Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo	UFLA

Profa Dra Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Ricota.....	3
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> e sua presença como contaminante nos alimentos.....	4
2.2.1 Produção de enterotoxinas por estafilococos.....	7
2.3 Agentes conservantes utilizados em alimentos.....	9
2.3.1 Bacteriocinas.....	9
2.3.1.1 Nisina.....	13
2.3.1.1.1 Espectro antimicrobiano da nisina.....	15
2.3.1.1.2 Modo de ação da nisina.....	15
2.4 Atividade antimicrobiana de condimentos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Local e condução do experimento.....	25
3.2 Extração dos óleos essenciais.....	27
3.3 Avaliação dos óleos essenciais.....	29
3.3.1 Avaliação <i>in vitro</i> dos óleos essenciais.....	29
3.3.1.1 Padronização do inóculo de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	29
3.3.1.1.1 Microrganismo utilizado.....	29
3.3.1.1.1.2 Manutenção das culturas.....	29
3.3.1.2 Teste da concentração mínima inibitória.....	30

3.4 Avaliação <i>in vitro</i> da potência inibitória da nisina.....	30
3.5 Produção da ricota.....	31
3.5.1 Coleta e preparo da amostras.....	33
3.8 Controle microbiológico.....	33
3.8.1 Determinação de coliformes a 35°C e termotolerantes na ricota.....	33
3.8.2 Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
3.9 Análise estatística.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Qualidade microbiológica, condimentos e da nisina.....	36
4.2 Formação de halo de inibição provocado pelo <i>Syzygium aromaticum</i> (cravo).....	37
4.3 Formação de halo de inibição pelo orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	39
4.4 Formação de halo de inibição pelo manjerição (<i>Ocimum basilicum</i>)..	41
4.5 Análise físico-química e microbiológica do soro e do leite.....	43
4.6 Análise físico-química e microbiológica das ricotas sem inoculação de <i>S.aureus</i> ATCC 25923.....	44
4.7 Análise microbiológica da ricota controle no decorrer do experimento.....	45
4.8 Ação dos óleos essenciais e da nisina na matriz alimentar, ricota cremosa.....	48
4.8.1 Ação da nisina.....	48
4.8.2 Ação dos óleos essenciais.....	49
4.8.3 Ação sinérgica dos condimentos mais nisina.....	53
5 CONCLUSÕES.....	59
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
---------------------------------	----

RESUMO

MENDONÇA, Alexandre. Tourino. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A segurança alimentar é uma preocupação geral, com base na qual consumidores buscam produtos seguros e as indústrias almejam alternativas para aumentar a vida de prateleira dos produtos com segurança. Com a cultura do produto orgânico no mundo globalizado, a adição de substâncias naturais para o controle microbiano tem sido muito utilizada. Os condimentos já eram adicionados aos alimentos como preservantes desde épocas remotas e ainda são utilizados. Contudo, busca-se, atualmente, a adição de suas essências, sendo alternativa viável e agregadora de valores aos produtos. Substâncias conservantes produzidas naturalmente por bactérias como a nisina também são empregadas em produtos alimentares, principalmente aqueles com grande possibilidade de contaminação. A ricota, queijo fabricado com o soro de leite doce, possui alta umidade, sendo muito susceptível a contaminações, principalmente de bactérias oriundas da manipulação, como o *Staphylococcus aureus*, patógeno causador de grave toxiose alimentar. O objetivo deste estudo foi a avaliação da concentração inibitória de óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*), orégano (*Origanum vulgare*) e manjericão (*Ocimum basilicum*), e posterior adição da concentração inibitória à ricota, adicionada ou não de nisina. Nos resultados dos testes *in vitro*, o óleo essencial de cravo apresentou maior halo de inibição a 1%, o de manjericão a 10% e o de orégano o maior halo de inibição a 5%. Na matriz alimentar ricota, o que mais inibiu o crescimento do *S.aureus* foi o cravo, com redução de 4,27 ciclos logarítmicos quando comparados ao crescimento do microrganismo em ricota sem conservante, seguido do manjericão, com 4,05 ciclos logarítmicos e o orégano, com 3,08 ciclos logarítmicos. A adição de nisina não provocou diminuição no número de microrganismo além de 24 horas quando o número de *S.aureus* voltou a crescer, chegando ao final com concentrações iguais ao controle. A interação óleos e nisina não foi verificada na condição experimental. A adição de óleos essenciais a alimentos como ricota é uma ferramenta para auxiliar no controle do crescimento de microrganismos contaminantes.

*Comitê Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Orientador)
Henrique César P. Figueiredo – UFLA; Maria das Graças Cardoso - UFLA

ABSTRACT

MENDONÇA, A. T. Effect of the essential oils of seasonings on the growth of *Staphylococcus aureus* in creamy ricotta. 2004. 72 p. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Food safety is of general concern, in which consumers look for safe products while industries search for alternatives to increase the life of shelf products with safety. With the culture of the organical products in the globalized world the addition of natural substances for the microbial control has been very used. The seasonings, which were added to victual as preservatives since remote times are still used. However, nowadays, the addition of essences is searched as a viable alternative for adding value to the product. Preservatives naturally produced by bacteria such as nisin, are also employed in victuals, mainly those with a high possibility of being contaminated. The ricotta, cheese produced from the serum of sweet milk, presents high moisture. It is very susceptible to contamination, mainly from bacteria derived from the manipulation, as *Staphylococcus aureus*, pathogen responsible by serious alimentary intoxication. The objective of this study was to evaluate the inhibition concentration of essential oil of carnation (*Syzygium aromaticum*), oregano (*Origanum vulgare*), and basil (*Ocimum basilicum*), and subsequent addition of the inhibitory concentration to the ricotta, added or not to nisin. In the results of the tests in vitro, the essential oil of carnation presented largest inhibition halo of 1%, the basil of 10% and oregano's the largest inhibition halo of 5%. On the ricotta alimentary matrix the oil that most inhibited the growth of *S. aureus* was the carnation with a reduction of 4.27 logarithmic units, when compared to the growth of microorganism in ricotta without conservants, followed by the basil with 4.05 logarithmic units and oregano with 3.08 logarithmic units. The addition of nisin did not caused a decrease in the number of microorganism besides 24 hours when the number of *S. aureus* grew again, arriving at the end with indexes equal to the control. The interaction between oils and nisin was not verified in the experimental condition. The addition of essential oil to victuals, as ricotta is an auxiliary technique to control the growth of microorganism **contaminants**.

*Comitê Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA (Advisor)
Henrique César P. Figueiredo - UFLA; Maria das Graças Cardoso - UFLA

A Deus pela força espiritual.

À minha esposa, Cristiane, pelo companheirismo, cumplicidade, incentivo e constantes demonstrações de amor.

Aos meus pais José e Otília; Adolpho e Aída, pelo incentivo, exemplo e carinho

Aos meus irmãos, Cynthia e Aloísio, pela amizade, confiança e apoio.

Ao que já se foram, mas ainda estão presentes, tio Ladinho, tia Dalzira e Ilda e vó Lita, pela presença espiritual.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), através do DCA, pela oportunidade de realização do curso e a Universidade Vale do Rio Verde (UNINCOR) pela confiança e apoio.

Aos meus orientadores, Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli, Profa. Maria das Graças Cardoso e Prof. Henrique César Pereira Figueiredo, pela orientação, amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores Luiz Ronaldo do Abreu, Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada, Fabiana Queiroz Ferrua, e Luiz Ronaldo de Abreu pela colaboração, sugestões e incentivo.

À professora Eliana Pinheiro de Carvalho

Ao amigo Allan Kardec Carlos Dias pelas orações e amizade.

A minha grande amiga e conselheira Roberta Hilsdorf Piccoli, pelo apoio nas horas difíceis.

A toda a minha família, pelas orações e incentivo.

A São Judas Tadeu, pelas graças e pela força espiritual.

Aos amigos Cleuza e Paulo, pelo apoio, orações, amizade e pela grande ajuda no experimento.

Aos colegas, Alessandra, Simone, Cleube, Vitor, André, Adenildes, Larissa, Fabiana, Fernando e Vanisse, e pela ajuda nas análises e companheirismo.

Aos funcionários Sr. Miguel, Sr. Piano e Eliane pela ajuda e pelo convívio.

Às secretárias Helena, Rafaela e Luciana, pela atenção ajuda e amizade.

Ao Prof. Julio Sílvio Bueno, pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos professores, funcionários e alunos do DCA, pela agradável convivência.

Enfim a todos que, direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da produção da indústria queijeira no Brasil e o surgimento de novos produtos e mercados consumidores têm contribuído para o aparecimento de novas técnicas de elaboração e conservação de produtos lácteos, principalmente aqueles tidos como frescos e de vida de prateleira curta (Silva & Gomes, 2001).

Dentre os produtos lácteos, destacam-se os queijos, os quais têm grande aceitação no mercado brasileiro. Destes, a ricota se destaca pelas suas características de alto valor protéico e fácil digestão.

A ricota tem origem na região Mediterrânea e no sul da Itália, sendo também denominada de queijo de albumina, porque é obtida pela precipitação das proteínas do soro de queijo, albumina e β -lactoglobulina após aquecimento e acidificação daquele soro.

Dentre suas características físico-químicas, a ricota apresenta todos os requisitos para ser potencial veiculador de toxinoses alimentares, pois possui elevada atividade de água, pH em torno de 5,5, e em sua forma original não é adicionada de sal. Por ser de fácil digestibilidade e não conter sal, a ricota é muito consumida por pacientes que apresentam alguma disfunção renal, pessoas sob dieta de restrição calórica ou com problemas de digestão.

Durante seu processo de fabricação, a massa da ricota é extremamente manipulada, o que pode promover a contaminação microbiana do produto, principalmente por *Staphylococcus aureus*, bactéria produtora de toxina, ocasionando, eventualmente, toxinoses alimentares. Apesar desse grande perigo microbiológico, poucos estudos são feitos quanto à microbiota contaminante nesse tipo de queijo. A legislação brasileira, visando evitar casos ou surtos de toxinfecções veiculadas pelo queijo, impõe padrões microbiológicos para este produto e que, devido às suas características de fabricação, muitas vezes, não

são respeitados. Para que queijos de alta umidade possuam período de vida de prateleira maior, permite-se, por lei, a utilização de determinados conservantes, sendo a nisina um deles. Apesar da bacteriocina poder ser utilizada na concentração até 12,5mg/kg, não se encontra na literatura relato a respeito da sua ação sobre o *S. aureus*, quando presente em ricota.

Hoje, com a tendência do mercado em utilizar produtos naturais destacam-se, dentre eles os agentes antimicrobianos naturais, extraídos de plantas como os óleos essenciais, os óleos voláteis, os óleos etéreos ou essências obtidas de partes de plantas pela destilação por arraste com vapor d'água ou outros métodos. Estes compostos são misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, cujas principais características são volatilidade e aroma intenso. A utilização de óleos essenciais para a conservação de alimentos vem sendo muito estudada, principalmente os obtidos de especiarias, como os óleos de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), de orégano (*Origanum vulgare*) e de manjeriço (*Ocimum basilicum*) que são ervas já empregadas como temperos alimentícios. Essas ervas têm sido utilizadas desde os tempos pré-históricos, como determinadas especiarias que eram empregadas no embalsamamento e outras com fins medicinais.

Com efeito antimicrobiano comprovado, os óleos essenciais oriundos de cravo-da-índia, orégano e manjeriço nunca foram testados como agente inibidor de *S. aureus* em ricota. Da mesma forma, se desconhece a atuação da nisina ou possível efeito sinérgico dessa junto com um óleo essencial sobre *S. aureus* nas condições já citadas. Assim, buscou-se avaliar a concentração de inibição mais adequada do óleo essencial de cravo-da-índia, orégano e manjeriço e posterior ação inibitória destes óleos na matriz alimentar inoculada com o microrganismo indicador *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A produção de leite no Brasil, em 2003, alcançou o número de 22 bilhões de litros (EMBRAPA, 2002). Entre estes números, esconde-se uma realidade muito preocupante, pois cerca da metade dessa produção é comercializada à margem de qualquer tipo de fiscalização efetiva por parte das autoridades competentes.

Este quadro tem sua origem principalmente no baixo nível cultural da população, que compra produtos lácteos clandestinos, acreditando estar consumindo produtos tidos como "puros da fazenda", mais consistentes, saborosos e nutritivos que os alimentos submetidos a processos tecnológicos adequados.

Alguns produtos são manufaturados com leite cru ou leite que não sofreu pasteurização, como a manteiga, coalhada e certos tipos de queijos, como o minas frescal. Este último hoje, em dia, tem grande aceitação no mercado, o que interessa ao produtor, pois, não necessita de grande estrutura para sua produção, proporcionando assim, maior percentual de lucro na venda. Além disso, após sua fabricação, o soro pode ser aproveitado para a fabricação de ricota (Almeida Filho, 1999).

2.1 Ricota

A fabricação de ricota é uma das opções tecnológicas mais simples para o aproveitamento do soro doce. Além de não requerer investimentos adicionais com equipamentos e infra-estrutura, pode constituir-se em excelente fonte de captação de recursos para as pequenas indústrias queijeiras (Pereira, 1998). A ricota tem sua origem na região do mediterrâneo, possuindo várias denominações, dentre as quais, queijo de albumina. Este queijo é resultante da precipitação das proteínas do soro pela ação conjunta do calor e da acidez do

soro, tem conservação limitada, devido aos seus elevados teores de umidade (mais ou menos 70%) e de lactose. Furtado (1994) cita que a acidez do soro no início da fabricação pode ser reduzida de 11°– 14°Dornic para 8°Dornic, com hidróxido de sódio (NaOH). Também pode ser adicionado de 10% a 15% de leite desnatado ou integral, elevando, em seguida, a temperatura da mistura para 80°C a 90°C. Após aquecimento, inicia-se a acidificação, que pode ser feita de três maneiras: pela adição de soro ácido, de ácido cítrico e de ácidos acético e láctico. O aquecimento é então interrompido a 90°C, quando a massa começa flocular. O rendimento médio da fabricação de ricota é de cerca de 4% a 6%, sendo um produto de pouca durabilidade e, portanto, considerado queijo fresco (Quadro 1).

O grande problema microbiológico para a fabricação da ricota é a higiene pós-processamento, o que pode ocasionar uma contaminação do produto com agentes patogênicos como o *Staphylococcus aureus*.

2.2 *Staphylococcus aureus* e sua presença como contaminante nos alimentos

Microrganismo muito comum em queijos de grande manipulação é o *Staphylococcus aureus*. Esta espécie do gênero *Staphylococcus* que se apresenta em forma de cocos Gram-positivos não esporulados, catalase e coagulase positivos se dividem em mais de um plano para formar racimos tridimensionais de células denominados como “cachos de uva”. Do ponto de vista morfológico,

QUADRO 1 Composição média esperada da ricota padrão fabricada a partir do soro doce leite bovino

Umidade	70 a 73%
Proteínas	8,0 a 12,0%
Gordura	4 a 8%
Colesterol	57mg/100g
pH	4,9 a 5,3
Calorias	136 a 146 kcal/100gr

Fonte: Marchismo et al., 1999.

os estafilococos são semelhantes ao gênero *Micrococcus*, porém, em contraposição ao metabolismo respiratório estritamente aeróbio dos micrococcos, crescem em anaerobiose, sendo aneróbio facultativo. A diferenciação entre espécies está amparada pela homologia do DNA e por estudos imunoquímicos. A diferenciação e a caracterização entre as espécies baseiam-se em provas bioquímicas e padrões de resistência a gentes antimicrobianos. O *S.aureus* pode se dividir em vários biótipos; além disso, pode ser classificado por fagotipagem, sorotipagem, perfil de plasmídeos e mediante ribotipagem (APHA, 1992; Holt et al., 1994; ICMSF, 1998; Pereira et al., 2000).

Atualmente, cerca de 33 espécies de *Staphylococcus* são reconhecidas e divididas em duas categorias: coagulase positivas e coagulase negativas. Essa divisão é baseada na capacidade de coagulação do plasma, que é uma propriedade considerada importante como marcador de patogenicidade dos estafilococos (Behme et al., 1996; Trabulsi et al., 1999). Entretanto, nenhuma destas provas é absolutamente específica, uma vez que outras espécies de estafilococos podem produzir quantidades pequenas de coagulase. Assim, recomenda-se a utilização de outros dispositivos de identificação bioquímica, como o sistema API Staph-Ident Biomeriex, France[®] e prova do fator de agregação em látex para determinar os produtores eficazes de coagulase (ICMSF, 1998; Pereira et al., 1999; Sharma, et al., 2000)

O método clássico para contagem e diferenciação dos estafilococcus é recomendado por vários autores (Mossel & Gracia, 1983; APHA, 1992; Silva et al., 1997) pelo uso do ágar de Baird-Parker. Seus agentes inibitórios, telurito, glicina e cloreto de lítio, são eficientes para selecionar *S. aureus* e a gema de ovo adicionada ao meio permite a regeneração das células injuriadas além de facilitar a diferenciação por meio da hidrólise da lipovitelina presente.

Os estudos relacionados aos fatores intrínsecos e extrínsecos que interferem na multiplicação de *S. aureus* foram feitos, em sua maioria, em

alimentos, por estar ser muito relacionado com casos de toxinoses alimentares (Stiles & Ng, 1981; ICMSF, 1983; Park et al., 1993).

A intoxicação estafilocócica é caracterizada por náusea vômitos, dores abdominais, diarreia e dores de cabeça. O início dos sintomas é normalmente rápido, dependendo da susceptibilidade individual à toxina, da quantidade de alimentos contaminado ingerido e da quantidade de toxina no alimento ingerido (Forsythe, 2002) .

A preocupação com a qualidade dos alimentos não só envolve os riscos de veiculação de doenças, como também as perdas econômicas oriundas das alterações microbianas. A redução da vida útil e a depreciação do produto para o consumidor geralmente estão associadas à matéria-prima de má qualidade e condições de manipulação inadequadas.

O contato com superfícies inadequadamente higienizadas dos equipamentos de produção ou a exposição do produto alimentício podem promover a contaminação por *S.aureus* do produto. Portanto, sua presença em linhas de processamento de alimentos tem sido considerada um indicador de condições precárias de higiene e manipulação inadequada da matéria-prima ou do produto final (Notermans & Wernars, 1991). A presença de *S.aureus* em alimentos *in natura* e produtos alimentícios representa risco potencial para a saúde, uma vez que algumas cepas são produtoras de enterotoxina termoestável. Dentre os principais substratos alimentícios, incriminados epidemiologicamente como capazes de tolerar o desenvolvimento microbiano *S.aureus*, podem ser citados os produtos lácteos (queijos, leite cru, pasteurizado e em pó, manteiga e sorvetes), produtos de confeitaria (bolos recheados, tortas e doces cremosos), carnes frescas e curadas, ovos e massas alimentícias (Ribeiro, 2002).

O *S. aureus*, freqüentemente encontrado em úberes de fêmeas lactantes e canais dos tetos, constitui-se em um dos principais agentes etiológicos da

mamite. Além disso, tais microrganismos têm sido frequentemente isolados de mãos e mucosas nasais de trabalhadores de laticínios (Assunção, 2001).

Os *Staphylococcus aureus* produzem vários fatores de virulência os quais incluem fatores de superfície (exopolissacarídeos capsulares, peptidoglicano da parede celular, proteína A)

2.2.1 Produção de enterotoxinas por estafilococos

Staphylococcus spp e, em especial, o *S.aureus* produzem ampla variedade de exoproteínas, que contribuem para a sua capacidade de colonizar e de causar doenças em hospedeiros mamíferos e aves. Quase, todas as cepas secretam enzimas e citotoxinas, as quais incluem quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lípases, hialuronidase e collagenase. A principal função destas proteínas é converter os tecidos locais do hospedeiro em nutrientes necessários ao seu crescimento. Algumas cepas produzem uma ou mais exoproteínas adicionais, as quais incluem a toxina da síndrome do choque tóxico, as enterotoxinas estafilocócicas (SE), toxinas esfoliativas e leucocidina. Cada uma destas toxinas é conhecida por seus potentes efeitos nas células do sistema imune dos hospedeiros (Dinges et al., 2000).

Em análises microbiológicas de alimentos, estafilococos coagulase positiva têm sido utilizados como microrganismo indicador, apesar da produção de enterotoxinas por algumas espécies não produtoras de coagulase positiva ser relatada (Vernozy-Rosand et al., 1996).

As enterotoxinas estafilocócicas (SES) são classificadas, de acordo com suas propriedades antigênicas, em nove grupos: SEA, SEB, SEC (dividido em três subclasses SEC₁ SEC₂ e SEC₃, baseadas em seus pontos isoelétricos), SED, SEE, SEG, SEH, SEI, e SEJ (Balaban & Rasoly, 2000).

As toxinas de *S. aureus* podem ser agrupadas pelo modo de ação e inclui citotoxinas, tais como α e β toxinas, as quais são hemolíticas formadoras de

poros e toxinas pro-inflamatórias e também a leucocidina. Existem também as toxinas pirogênicas, tais como exotoxinas A e B, que causam hemólise levando à febre. A toxina 1, da síndrome do choque tóxico (TSST-1), a qual é também uma exotoxina, é mais intimamente relacionada às enterotoxinas, atuando como superantígenos causando a proliferação de células T e liberação de citocinas levando, respectivamente, à síndrome do choque tóxico e a toxínose (Cardoso et al., 2000; Dinges et al., 2000)

Em sua forma biologicamente ativa, as enterotoxinas são termoestáveis, o que constitui-se em ponto crucial no controle da qualidade de alimentos, já que podem persistir no produto final, após processamento térmico (Bergdoll, 1989). As enterotoxinas estafilocócicas atuam como superantígenos e ativam sistemas de defesa humana quando causam toxínose ou outras doenças (Dinges et al., 2000). Geralmente, quanto menor a temperatura de cultivo, maior será o tempo necessário para a produção de enterotoxina. Em condições ótimas de crescimento, a enterotoxina torna-se detectável entre 4 a 6 horas. As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas globulares de cadeia simples, solúveis em água, com peso molecular entre 28.000 e 35.000 daltons (Bergdoll, 1989) e contêm muitos resíduos de lisina, aspartato, glutamato e tirosina em sua estrutura primária (Bergdoll, 1990).

Sua produção ocorre em pH ótimo de 6,14 a 7,95, sendo muito influenciada pelo meio. A enterotoxina A pode ser produzida, entre pH 4,6 a 6,5, em leite esterilizado. Em caldo BHI, sua produção ocorre em pH de 5,15 a 9,02 (Dinges et al., 2000).

As enterotoxinas são higroscópicas e facilmente solúveis em água e soluções salinas. Apresentam ponto isoelétrico entre os pH 7,0 e 8,6 e pico de absorvância a 277 nm, sendo resistentes a tripsina, miotripsina, renina, papaína e pepsina, com exceção da enterotoxina B, que é destruída por esta última enzima em pH em torno de 2 (Niskanen & Koiranen, 1977).

A SEA e SED predominam nos surtos de toxínose alimentar (Trabulsi, 1999) e cerca de 5% delas são causadas por enterotoxinas ainda não identificadas.

Existe discordância entre vários autores sobre a quantidade mínima de enterotoxina necessária para causar sintomatologia em seres humanos. De maneira geral estima-se entre 0,015 e 0,375 µg de enterotoxina por quilo de massa corpórea. Características individuais também devem ser consideradas (Franco & Franco, 1996).

O principal local de ação das enterotoxinas é o trato gastrintestinal, sendo o vômito o sintoma mais comum da toxínose causada por *S. aureus*. Mas outras alterações são evidenciadas na pressão arterial e na temperatura corpórea, indicando passagem para o sistema circulatório (Bergdoll, 1989).

Os métodos para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas são classificados em biológicos e imunológicos, sendo os últimos mais utilizados. Os métodos imunológicos baseiam-se no princípio da precipitação da reação antígeno-anticorpo. Atualmente, os ensaios RPLA e ELISA, os quais se baseiam no uso de anticorpos específicos, têm apresentado melhores resultados (Brabes, 1999).

2.3 Agentes conservantes utilizados em alimentos

2.3.1 Bacteriocinas

A constatação de que os alimentos podem constituir-se em agentes potenciais de veiculação de possíveis toxinfecções alimentares tem estimulado estudos de novos métodos para assegurar o controle desses patógenos e a produção de suas enterotoxinas em alimentos muito manipulados. Entre as técnicas que estão sendo investigadas, a identificação e a implementação de inibidores de origem microbiana têm recebido atenção crescente a partir da década de noventa.

As bactérias lácticas, representadas pelos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*, podem produzir diversos agentes antimicrobianos como ácidos orgânicos peróxidos de hidrogênio, lactoperoxidase e diacetil (Helander, 1997). A atividade antimicrobiana das bactérias do ácido láctico também pode resultar da produção da substância protéica denominada bacteriocina. Por definição, bacteriocinas são substâncias bactericidas, antibióticos altamente específicos de natureza protéica não multiplicável, sintetizada por certas linhagens de bactérias e ativa contra algumas linhagens de bactérias da mesma espécie estreitamente relacionadas. As bacteriocinas são substâncias bactericidas ou bacteriostáticas que diferem de outros agentes antimicrobianos pela presença de uma proteína essencial condicionada a genes contidos nos plasmídeos (Moreno et al., 1998).

O uso de bacteriocinas para potencial preservação da qualidade microbiológica é alvo de inúmeras pesquisas. O intuito dessas pesquisas é o aumento da vida de prateleira do produto, bem como a sua segurança alimentar, já que muitos patógenos que são transmitidos ao homem podem ser de origem alimentar e estas substâncias inibidoras apresentam-se como barreira natural às contaminações bacterianas de vários alimentos.

Ao contrário da maioria dos antibióticos, que não são permitidos nos alimentos, as bacteriocinas ou as estirpes que as produzem podem ser usadas como conservantes naturais, melhorando a segurança de alguns produtos como os derivados lácteos e cárneos (Vignolo et al., 1993). Algumas bacteriocinas, como a nisina, já estão sendo usadas na indústria como alternativa aos conservantes artificiais. A nisina foi liberada como aditivo em alimentos para o uso em mais de 45 países. Ela tem sua ação em várias bactérias Gram-positivas e previne o desenvolvimento de esporos de *Bacillus* e *Clostridium* e o crescimento de *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O117:H17, *Salmonella*

Thyphimurium, *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens* (Spelhaug & Harlander, 1989; Vignolo et al., 1993).

As bacteriocinas têm maior espectro de ação em bactérias Gram-positivas. O sítio de ação destas substâncias está concentrado na membrana celular (Goa & Komings, 1991; Moreno et al., 2001). O modo de ação das bacteriocinas demonstra que elas possuem caráter anfipático, pelo qual possivelmente se ligam eletrostaticamente com componentes da membrana celular, formando poros por onde os conteúdos intracelulares extravasam, causando a morte celular (Bruno et al., 1992, Riley & Wertz, 2002). Já em bactérias Gram-negativas, os lipopolissacarídeos (LPS), em sua estrutura da membrana externa, funcionam como barreira à ação de bacteriocinas. Os LPS possuem caráter hidrofílico, devido à sua composição de carboidratos, sendo estabilizados por ligações divalentes Mg^{+2} . A remoção destes cátions que estabilizam os LPS pode ser o caminho para a ação das bacteriocinas. Agentes como o EDTA promovem a mesma ação, retirando o íon Mg^{+2} , liberando os LPS e, nesta conformação de membrana, as bactérias Gram-negativas ficam susceptíveis ao ataque das bacteriocinas que se acoplaram na membrana formando poros e causando a lise celular (Helander et al., 1997; Moreno et al., 2001).

Outras bacteriocinas estão sendo pesquisadas e testadas para o uso em alimentos. Vários pesquisadores têm obtido e caracterizado inúmeras bacteriocinas para o uso em laticínios (Nuñez et al., 1997).

Moreno et al. (1998) compararam o efeito inibidor da bacteriocina Bac ITAL 383 com o das nisinas produzidas por *Lactococcus lactis subsp lactis* ATCC 11454 e por *Lactococcus lactis subsp lactis* CNRZ 150, sobre a diminuição ou eliminação de contaminantes de queijos frescos pré e pós-pasteurização, como *Listeria monocytogenes*, *Listeria spp* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram que a *L. monocytogenes*, foi mais inibida pela

nisina, enquanto as linhagens de *S. aureus* foram mais inibidas pela bacteriocina denominada de Bac 383.

Todorov et al. (1999) caracterizaram a bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* ST31. A bacteriocina denominada de plantaricin ST31 foi obtida em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) em produção máxima, pH 6, à temperatura de 30°C, na fase estacionária do crescimento celular. A bacteriocina foi caracterizada contendo 20 aminoácidos residuais com massa de 2755 Daltons, estabilidade em pH 3 a 8, não sendo afetada por enzimas amilolíticas, com espectro de ação sobre bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, e bactérias que causam toxinfecções alimentares severas como o *S. aureus*. Já a bacteriocina, enterocin 4, avaliada por Nuñez et al. (1997) tem sua ação de inibição contra a *L. monocytogenes* Ohaio e Scott, sendo esta produzida por *Enterococcus faecalis* INIA 4 durante manufatura e maturação do queijo “Mancheco”, um queijo de massa cozida, elaborado com leite de ovelhas.

Três metodologias para a fabricação do queijo foram utilizadas. Primeiramente, as culturas produtoras da enterocin 4 foram adicionadas durante a fabricação do queijo; na segunda metodologia, foi inoculado caldo de cultivo com a bactéria produtora da enterocin 4 com níveis da enterocin 4 capazes de controlar a proliferação da bactéria indicadora; o último método foi a junção dos dois primeiros, ou seja, a adição do caldo de cultivo mais a colocação durante a fabricação das culturas produtoras de bacteriocina.

A contagem de *L. monocytogenes* Ohaio decresceu em 3 ciclos logarítmicos após 8 horas, quando o queijo foi inoculado com *Enterococcus faecalis* INIA 4 em caldo adicionado no início do processo de produção do queijo. Quando usado o primeiro método para a fabricação do queijo, não foi observada inibição após 60 dias. A *Listeria monocytogenes* Scott não foi inibida

com a utilização das duas primeiras metodologias, porém, decresceu em um ciclo logarítmico após 7 dias e dois ciclos logarítmicos após 60 dias.

2.3.1.1 Nisina

A nisina é caracterizada como substância inibidora para os microrganismos, a nisina é produzidas por algumas linhagens de *Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis*. Este microorganismo é encontrado naturalmente em queijos, nos quais a nisina é naturalmente produzida, inibindo o crescimento de outros microrganismos. O nome nisina deriva de NIS (N – Group Inibitoru *Streptococcus*, reclassificado de *Lactococcus*) e o sufixo INA. Esta substância é constituída por um peptídeo de 34 aminoácidos e está inserida na família dos lantibióticos, os quais são peptídeos modificados (Figura 1 e 2). Em sua estrutura, ela é constituída por oito alaninas, quatro ácidos aminobutíricos (ABA), três isoleucinas apresentando uma amino-terminal, três lisinas – sendo uma carboxi-terminal, duas leucinas, histidinas e metionina, uma serina, valina, prolina asparagina e os aminoácidos mais raros deidroalanina (DHA) e deidrobutirina (DHB), com peso molecular de 3.500 Da (Moreno et al., 2001).

A alta proporção de aminoácidos básicos na nisina lhe confere carga líquida positiva com ponto isoelétrico de 10,5. Os aminoácidos DHA e DHB são suscetíveis ao ataque de nucleofílicos (grupos hidroxil ou R nucleofílicos) presentes em pH alto. Esta pode ser a explicação para a instabilidade da nisina em pH alcalino ou condições básicas. A nisina é insolúvel em solventes apolares. Sua solubilidade em meio aquoso é altamente dependente do pH, sempre que este aumenta, a solubilidade da molécula diminui, passando de 57mg/mL em pH 2 para 0,25mg/mL em pH 8 (Liu & Hansen, 1992).

A nisina possui uma propriedade muito interessante que é sua estabilidade ao calor. Ela pode ser submetida à autoclavagem (121°C/15min) em pH 2,5, sem modificação ou perda de sua atividade.

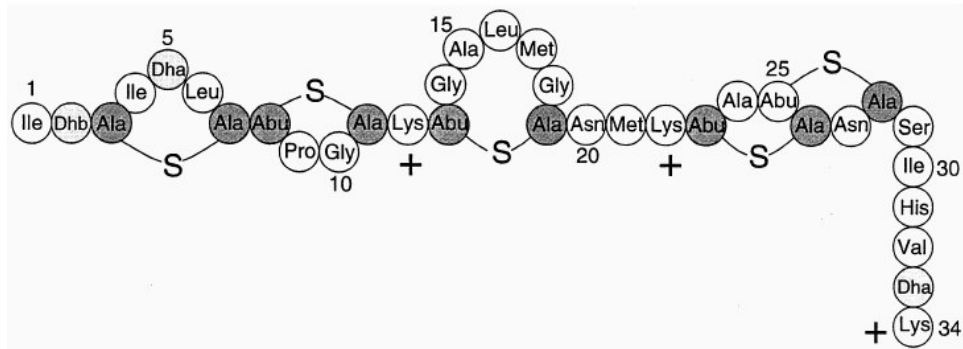


FIGURA 1 Estrutura primária de nisina. Os resíduos típicos em lantioninas estão em cinza (Breukink & Kruijff, 1999).

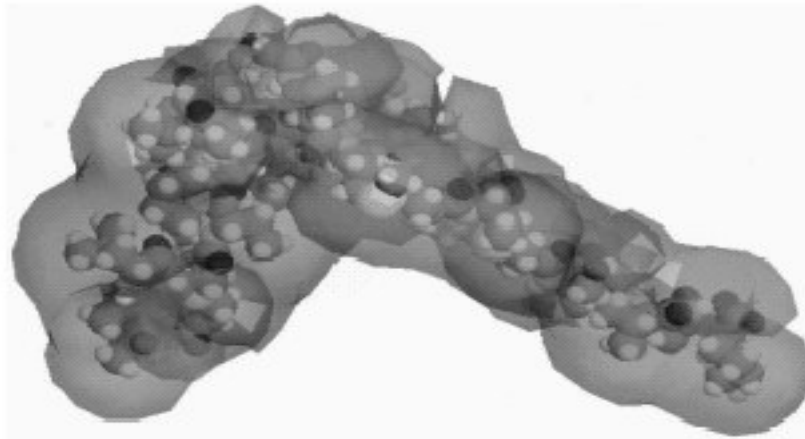


FIGURA 2 Potencial de hidrofobicidade molecular ao redor de nisina. Envelopes representam potenciais hidrófilos e hidrofóbicos (Breukink & Kruijff, 1999).

Porém, quando o pH é elevado para 5, ocorre perda de 40% de sua atividade e com pH acima de 6,8 a perda é de 90% (Daeschel, 1992). A estabilidade da nisina é devido em parte às suas cinco pontes de enxofre, que lhe dão estrutura tridimensional bem rígida, apesar de não apresentar estrutura secundária.

2.3.1.1.1 Espectro antimicrobiano da nisina.

Quando a nisina se apresenta isolada, ou seja, livre da influência de outros fatores ela apresenta espectro de atividade restrito, praticamente sem efeito em bactérias Gram negativas, fungos e leveduras, com exceção de bactérias pertencentes ao gênero *Neisseria* (Hurst, 1983). Contudo, Stevens et al. (1991) demonstram atividade da nisina sobre microrganismos Gram-negativos (*Salmonella* e outras bactérias como *Enterobacter aerogens*, *Shigella flexneri*, *Citrobacter freundii* e *Escherichia coli*) quando associada a agentes quelantes como o EDTA. Em outro estudo, observou-se que a inibição de bactérias Gram-negativas só ocorria quando os elementos quelantes eram adicionados em conjunto com a nisina e que não apresentava efeito inibidor se estes fossem adicionados em separados (Boziaris & Admas, 1999).

2.3.1.1.2 Modo de ação da nisina

O modo de ação dos lantibióticos é bastante complexo e ainda não foi plenamente elucidado. Sabe-se que eles levam à formação de poros, sendo que a primeira etapa para formação destes poros consiste na ligação da nisina à membrana, seguida pela sua inserção na fase lipídica desta (Breukink & Kruijff, 1999).

A ação antimicrobiana da nisina (Liu & Hansen, 1992) é atribuída aos deidro-resíduos, que podem desempenhar importante papel em sua propriedade antibacteriana pela ação com um ou mais nucléofílicos num alvo sensível na

célula. Após reagir com os compostos nucleofílicos que modificam os deidrogrupos dos resíduos de DHA e DHB, a nisina perde sua atividade biológica. Ray (1992) descreve que a atividade da nisina pode ser devido aos resíduos de DHA, uma vez que eles podem reagir com compostos metabolicamente importantes, como enzimas que contêm grupos sulfidrílica. Acredita-se que seja por esse mecanismo que a nisina inibe o crescimento de esporos recém-germinados

A característica básica da molécula da nisina sugere sua ligação em membranas carregadas negativamente, o que foi comprovado em estudos que revelaram a ligação preferencial da nisina em membranas que continham quantidades relativamente altas de lipídeos aniônicos. De modo geral, as bactérias Gram-positivas apresentam alta concentração desses lipídeos em comparação às Gram-negativas, o que pode explicar parcialmente a atividade da nisina contra Gram-positivos (Breukink & Kruijff, 1999). Como a nisina não foi capaz de difundir-se rapidamente para outros lipossomos, conclui-se que essa ligação é muito forte.

Segundo Mohallem (1994), a primeira etapa necessária para ocorrer à inibição pela nisina é a sua absorção pelo microrganismo alvo da destruição, com formação de complexo entre o microrganismo e a nisina. Seus resultados evidenciaram que substâncias presentes que interferem na formação destes complexos, como o carvão vegetal, tornam os microrganismos resistentes à sua ação.

Henning et al. (1986) observaram que o efeito antimicrobiano da nisina é causado por interação com os fosfolipídeos componentes da membrana citoplasmática e que os microrganismos Gram-positivos são sensíveis à sua ação. O ácido murâmico é também inibido, ocasionando efeito sinérgico no distúrbio das funções da membrana. Assim, a lise celular pode ser induzida pela adição de qualquer composto que dissipe um ou ambos os componentes da força

protomotora. No caso de *Staphylococcus simulans* 22, que sofre autólise pela ação da nisina, o sistema autolítico é controlado por enzimas que se encontram ligadas a substratos, como os ácidos teicóicos, lipoteicóicos e teicurônico. A nisina, em virtude de sua forte natureza catiônica, liga-se a esses ácidos, liberando e ativando o sistema autolítico (Jack et al., 1995). Toledo (2000) observou que a nisina pode afetar a síntese da parede celular microbiana com a formação de complexo entre a bacteriocina (nisina) e os lipídeos intermediários da mureína. Porém, este efeito só pode ser comprovado pelo uso de concentrações elevadas da nisina o que pode inviabilizar seu uso.

A ação da nisina parece estar dividida em duas fases. A primeira envolve a adsorção não específica da nisina sobre a parede celular dos microrganismos sensíveis. Esta adsorção é reversível dependente pH, com valor mínimo de 3,0 e máximo de 6,5 (Parente et al., 1994). Outro fator envolvido na adsorção é a composição fosfolipídica da membrana citoplasmática das células microbianas sensíveis, como a presença de cátions divalentes e trivalentes (Mg^{+2} e Ca^{+2}) e da concentração utilizada (Ming & Deschel, 1995). Na fase posterior, a nisina torna-se insensível às proteases, afetando irreversivelmente a parede celular.

2.4 Atividade antimicrobiana de condimentos

A utilização de produtos naturais extraídos de plantas é tão remota quanto à civilização na terra; os egípcios utilizavam amplamente os extratos e óleos extraídos de plantas para tratamento farmacológico e também como conservante de alimentos. Com o desenvolvimento de novas técnicas de produção destes compostos e o desenvolvimento da Química, ocorreu melhoria na obtenção de óleos essenciais e extrato de plantas (Rates, 2001).

No Brasil, o emprego de plantas medicinais está presente desde antes da colonização, quando os índios já utilizavam ervas, passando pelos colonizadores e, hoje, é amplamente empregada na medicina caseira nas formas de chás, xaropes, entre outros (Matos, 1994; Rates, 2001).

Os condimentos são definidos como produtos aromáticos de origem vegetal, utilizados com a finalidade principal de temperar alimentos (FDA, citado por Dziezak, 1989). Os condimentos também possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais. De acordo com Shelef (1983), existem aproximadamente 70 tipos de condimentos, cultivados e utilizados em todo o mundo. Apesar de serem cultivados em diversos países tropicais, sua produção em escala comercial restringe-se a poucas regiões do sul e do sudeste da Ásia, sendo a Índia o maior exportador. Segundo Phuthi (1980), países como Estados Unidos da América, Singapura e Austrália destacam-se como os maiores importadores.

Atualmente, as propriedades antimicrobianas dos condimentos têm despertado grande interesse devido às perspectivas de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores, quanto à utilização de aditivos naturais em alimentos. De acordo com Shelef (1983), a concentração de condimento necessária para a inibição do crescimento bacteriano encontra-se na faixa de 1% a 5%. As concentrações normalmente utilizadas com a finalidade de realçar o sabor e o aroma dos alimentos variam de 0,5% a 1%, porém, não inibem o crescimento bacteriano. A determinação da concentração ideal que exerça, simultaneamente, efeito antimicrobiano e realçador do sabor e do aroma dos alimentos, é fundamental para a utilização dos óleos essenciais de plantas, em substituição aos aditivos sintéticos para alimentos (Ferreira, 2003).

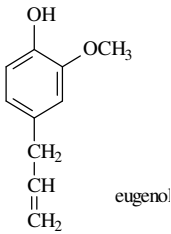
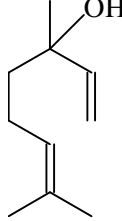
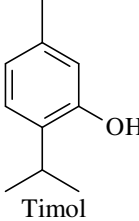
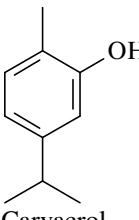
Vários estudos têm evidenciado que os princípios ativos dos condimentos localizam-se na fração do óleo essencial (Parry, 1962; Phuthi, 1980; Farag et al., 1989). Sua obtenção foi aprimorada na Idade Média, com o

advento da destilação, introduzida na Europa pelo povo mulçumano (Tyrrel, 1990). Os óleos essenciais dos condimentos são misturas complexas de diferentes compostos, que contribuem para as propriedades antimicrobianas bem como dando ao alimento características de sabor e aroma especiais (Parry, 1962; Aridogan et al., 2002). Os óleos essenciais são geralmente isolados de partes verdes de plantas por vários métodos de destilação; o mais comum é o arraste de vapor ou hidrodestilação. Os componentes químicos dos óleos essenciais são representados por várias misturas de terpenóides, especificamente monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}); embora alguns diterpenos possam estar presentes (C_{20}), outros compostos de baixo peso molecular podem fazer parte da composição química dos óleos essenciais, como hidrocarbonetos alifáticos (linear, ramificados, saturados e insaturados), ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas e, excepcionalmente, compostos nitrogenados e sulfurados, cumarinas e homólogos de fenilpropanóides. Os terpenos são os compostos responsáveis pelas atividades medicinais, culinárias e aromáticas das plantas medicinais. A maioria deles é derivada das ligações no carbono cinco dos isoprenos, sendo esses compostos classificados de acordo com o número de carbonos presentes em seu esqueleto carbônico (Dorman, 1999). Esse mesmo autor ressalta que a composição final de óleos essenciais é influenciada pelas condições climáticas do local de origem das plantas. Outro fator de grande importância é a temperatura empregada na secagem dos condimentos, a qual pode levar a grandes perdas, por volatilização dos princípios antimicrobianos presentes nos óleos. Os principais constituintes químicos de óleos essenciais de alguns condimentos e a parte da planta onde são encontrados estão relacionados no Quadro 2.

Estudos realizados por diversos autores relacionaram a estrutura química e a atividade antimicrobiana dos componentes principais dos óleos essenciais, demonstrando não haver diferença na atividade antibacteriana com a variação do

número de duplas ligações nem com a presença de um radical cetona no núcleo aromático de tais compostos. Entretanto, verificam-se que a introdução de uma hidroxila nesse núcleo resulta em aumento na atividade antibacteriana. O eugenol, timol, carvacrol, isobernelo, a vanilina e o aldeído salicílico são compostos que apresentam a hidroxila ligada ao anel ciclohexano e estão entre os mais potentes agentes antimicrobianos encontrados nos condimentos (Laekeman , 1990; Lemos, 1990; Mohmound, 1994 e Ansari et al., 1996).

QUADRO 2 Constituintes químicos dos óleos essenciais de condimentos.

Condimento	Nome científico	Principal constituinte do óleo essencial	Estruturas
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i>	2-metoxi-4-(2-propenil) fenol (eugenol)	 <p>eugenol</p>
Manjeriço	<i>Ocimum basilicum</i>	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (linalol) ; metil-alil fenol estragol	 <p>linalol</p>
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	5-metil-2-(1-metiletil) fenol(timol); 2-metil-5-(1-metiletil) fenol (carvacrol)	 <p>Timol</p>  <p>Carvacrol</p>

*Fonte: Adaptado de Parry (1962) e Dziezak (1989)

Embora a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tenha sido relatada em numerosos trabalhos, poucos estudos têm relacionado o mecanismo de ação desses produtos naturais na célula microbiana. Segundo Conner & Beuchat (1984), os óleos essenciais provavelmente danificam vários sistemas enzimáticos, inclusive os envolvidos na produção de energia celular e na síntese de compostos estruturais. Pesquisas sobre o efeito de óleos essenciais em leveduras injuriadas pelo calor indicaram que o tratamento térmico subletal danifica, metabólica ou estruturalmente, as células. A presença de óleos essenciais interfere também com o mecanismo de reparo necessário para a divisão celular. Sugere-se ainda que o tratamento térmico cause danos ou lesões na membrana citoplasmática, permitindo que os componentes antimicrobianos dos óleos se movam mais rapidamente para o interior da célula, danificando o metabolismo normal.

Estudos realizados por Barbel & Yashphe (1989) com *E. coli* isoladas em meio contendo óleo essencial de *Achillea fragmentissima* reforçaram as evidências de que os óleos de plantas atuam principalmente na membrana bacteriana, inibindo a respiração celular, reduzindo o conteúdo de ATP, além de facilitarem a liberação de polipeptídeos e íons K^+ para o meio. Os resultados apresentados por Nychas et al. (1990) também evidenciaram o aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática com perda de constituintes celulares de *S. aureus* cultivado na presença de compostos fenólicos extraídos de plantas. As propriedades antimicrobianas dos condimentos e de seus óleos essenciais têm sido estudadas, principalmente com relação ao efeito inibidor sobre microrganismos patogênicos presentes em alimentos.

Lackeman et al. (1990) demonstraram a atividade *in vitro* do eugenol sobre o crescimento de fungos, leveduras, bactérias, não ocorrendo atividade do eugenol sobre vírus. Recomenda-se, portanto, que o eugenol seja utilizado como estrutura básica para o desenvolvimento de drogas antimicrobianas.

De Wit et al. (1979) estudaram o efeito inibitório dos óleos essenciais de alho e cebola sobre produção da toxina botulínica, verificando que, na concentração de 1500µg/g, há efeito na produção da toxina botulínica tipo A, mas não na produção das toxinas tipo B e E. Huhtanen (1980) avaliou a inibição do crescimento de *Clostridium botulinum* pela ação de 33 extratos alcoólicos de condimentos, demonstrando que louro, pimenta-preta e noz-moscada foram agentes antibotulínicos muito eficientes.

Garg & Garg (1980) verificaram que, dentre os óleos de gerânio, gengibre, cedro e citronela, os dois primeiros foram os mais eficientes contra nove espécies de bactérias patogênicas. O crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas pyocyanea* na presença de compostos isolados de Artemísia foi observado por Tharib et al. (1983) que verificaram que, com a exceção da *P.pyocynea*, houve inibição dos microrganismos.

Em estudo relacionando o efeito da sálvia no crescimento de bactérias, enteropatogênicas e deterioradoras, em alimentos e caldo nutriente, Shelef et al. (1984) demonstraram que o *Bacillus cereus* foi o menos resistente ao condimento seguido por *S. aureus*, *Pseudomonas sp* e *S. thyphimurium*. Este estudo concluiu que a sálvia foi mais eficiente contra bactérias Gram-positivas, sendo o seu efeito antimicrobiano mais acentuado em caldo nutriente do que em alimentos, devido aos compostos nutrientes do alimento que protegem a célula microbiana do efeito deletério do composto.

A sensibilidade de *S. Thyphimurium*, *S. aureus* e *V. parahaemoliticus* ao tomilho, menta, louro e de seus respectivos extratos alcoólicos, foi avaliada por Aktug & Karapinar (1987). Estes autores concluíram que o *S. aureus* é o microrganismo mais afetado, sendo tomilho o condimento mais inibidor. Esses mesmos autores, em estudo semelhante, avaliaram o efeito inibidor da flor de tília e de seus extratos alcoólicos no crescimento de *S. Thyphimurium*, *S. aureus* e *V. parahaemoliticus* e constataram, novamente, a maior sensibilidade do *S.*

aureus. Foi verificada também a inibição do crescimento dos microrganismos por timol, eugenol, mentol e anetol, que são, respectivamente, os componentes principais dos óleos de orégano, cravo-da-índia, menta e aniz, concluindo-se que o eugenol possui o maior efeito inibidor sobre o crescimento bacteriano.

A suscetibilidade de bactérias patogênicas veiculadas por alimentos, em particular *Listeria monocytogenes*, a extratos de seis plantas chinesas, foi analisado por Chung et al. (1990). Estes autores observaram acentuado potencial inibidor do crescimento bacteriano apresentado por esses produtos naturais. Deans & Svoboda (1989) demonstraram a atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Satureja hortensis* sobre 25 espécies de bactérias e cinco espécies de fungos. O óleo teve pouca inibição sobre *E. coli* e *S. aureus*. Outros microrganismos de grande significado para a saúde pública, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella pulorum*, foram sensíveis ao óleo essencial deste condimento.

Alguns poucos estudos têm demonstrado o efeito dos condimentos no comportamento de bactérias lácticas, principalmente aquelas responsáveis pela iniciação de processos fermentativos de produtos cárneos. Zaika & Kissinger (1979) analisaram a atividade do gengibre, da pimenta vermelha, da mostarda, da noz moscada, da canela e do cravo-da-índia no crescimento e na produção de ácido por culturas de *Lactobacillus planturum* e *Pediococcus cerevisiae*. Eles observaram a estimulação da produção de ácidos, embora não tenha sido constatado aumento da população bacteriana.

3 MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 Local e condução do experimento

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos. A extração dos óleos essenciais foi feita no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da UFLA e a fabricação das ricotas realizada no Laboratório de Laticínios da UFLA.

O experimento foi conduzido em duas etapas. Na primeira, verificou-se o comportamento *in vitro* dos óleos essenciais de cravo-da-índia, orégano e manjerição e da nisina com o método da difusão em ágar, segundo Baydar et al. (2004), Ponce et al. (2003) e Deans & Ritchie (1987) modificados. A segunda etapa consistiu no estudo do processo de inibição dos óleos essenciais e da nisina adicionados à matriz alimentar, ricota cremosa sobre *S.aureus* ATCC 25963. Cada óleo foi estudado separadamente e conjuntamente com nisina que foi também testada separadamente. O fluxograma do experimento está descrito na Figura 3.

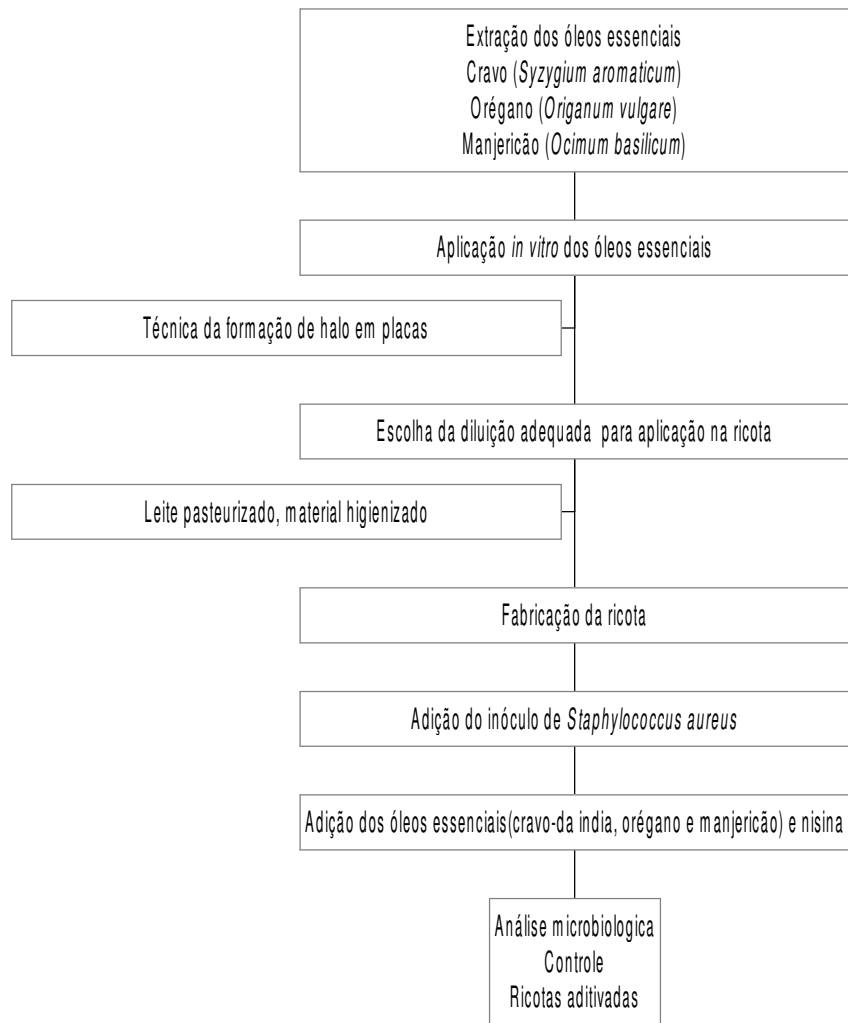


FIGURA 3 Fluxograma das principais etapas do experimento

3.2 Extração dos óleos essenciais.

A extração dos óleos foi feita utilizando-se condimentos secos adquiridos no mercado municipal de São Paulo estes, analisados microbiologicamente. Os frascos onde foram coletados os óleos essenciais passaram por desinfecção prévia com álcool 70% e posterior exposição à luz ultravioleta por uma hora. A extração foi feita sempre do mesmo lote de condimento à mesma temperatura de 97°C. A cada novo condimento, o aparelho de extração (Aparelho de Clevenger modificado) (Figura 5) era desmontado, lavado com água e detergente neutro, seguido de água destilada. Após a lavagem, o aparelho era novamente montado e ligado com acetona para a remoção de qualquer resíduo. Depois da evaporação da acetona era colocada água destilada no balão de destilação. Esta limpeza foi feita após extração de cada óleo.

Para a extração do óleo do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), foram pesados 200 gramas de condimento seco. Este, juntamente com água, foi colocado em balão de fundo redondo e boca esmerilada e adaptado ao aparelho de Clevenger modificado. Deixou-se em ebulição por 2 horas. Após, o hidrolato (água + óleo) foi levado a uma centrífuga (3000rpm), separando-se a fase orgânica da fase aquosa. Adicionou-se à fase aquosa sulfato de magnésio anidro, filtrando-se. Levou-se o restante a centrífuga, obtendo-se o óleo puro. Foram utilizados em todo o processo de extração 2.000g de cravo-da índia (*Syzygium aromaticum*).

A extração dos óleos do *Origanum vulgare* (orégano) e do *Ocimum basilicum* (Manjericão) foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: em cada etapa de extração foram pesados 80g do condimento e colocados em balão, ficando este em contato com água em ebulição por duas horas, quando o hidrolato foi coletado. Este composto foi particionado com diclorometano (Quimex[®]), em balão de separação. Para a retirada de toda a água remanescente,

o composto foi tratado com sulfato de magnésio anidro (Synth[®]). Após a retirada da água, a mistura diclorometano e óleo foi filtrada, retirando-se o dessecante. Logo após a separação do dessecante, a mistura diclorometano e óleo foi rotaevaporada em evaporador rotativo (BUCHI B-480[®]), retirando-se o solvente utilizado. A retirada completa do solvente foi realizada pela passagem do óleo por pistola de secagem, quando todo o resíduo do solvente foi retirado. Após esta etapa, o óleo foi colocado em vidros previamente pesados para a verificação do rendimento. Para a extração do orégano e manjerição foram utilizados, 3.000 e 8.000g dos condimentos secos, respectivamente.



FIGURA 4 Aparelho extrator de óleos Clevenger modificado.

3.3 Avaliação dos óleos essenciais.

3.3.1 Avaliação *in vitro* dos óleos essenciais

3.3.1.1 Padronização do inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3.3.1.1.1 Microrganismo utilizado

Foi utilizada cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 cedida pelo Professor Dr. Henrique César Pereira Figueiredo, do Departamento de Medicina Veterinária. Na realização dos ensaios *in vitro* como cultura reveladora e posteriormente como contaminante padrão, foram obedecidas as contagens obtidas em curva padrão, confeccionada para revelar o número exato de microrganismos inoculados nas duas etapas do experimento.

3.3.1.1.2 Manutenção das culturas e padronização.

Durante o experimento, o microrganismo foi mantido em slants de TSA (Tryptic Soy Agar Merck®) em refrigeração (4°C), repicados em caldo TSB para a ativação da cultura e a realização dos ensaios. A cada nova repicagem, foi verificada a pureza das colônias com testes específicos, coloração de Gram e testes bioquímicos de oxidase, crescimento em NaCl 15%, catalase, coagulase, termonuclease, produção de acetoina, hemólise, uréase, pigmentação e fermentação aeróbica e anaeróbica de manitol e glicose segundo Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994), para o microrganismo utilizado.

A cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi padronizada por curva padrão, utilizando-se densidade óptica a 620 nm versus o número de unidades formadoras de colônia. A cultura ativa foi repicada para caldo infusão de cérebro e coração (BHI Oxoid®), ficando incubada a 37°C por 24 horas. Após decorrido este período, uma alíquota de 8µl foi transferida para caldo Tryptic Soy (TSB Merck®). A partir dessas inoculações, foram feitas sementeiras da cultura em ágar Baird-Parker (Merck®), acompanhadas por leitura em espectrofotômetro em períodos de uma hora, até completar 24 horas de cultivo.

Após a leitura das placas, juntamente com a leitura da absorbância, foi feita análise de regressão, permitindo adequação da quantidade de inóculo utilizada nas duas fases do experimento, onde se utilizou inóculo de 10^8 UFC/g de ricota.

3.3.1.2 Teste da concentração mínima inibitória

A metodologia empregada foi a de difusão em ágar, empregando-se para tal ágar Mueller Hinton. A concentração de cada óleo foi determinada pelo tamanho do diâmetro do halo de inibição formado. Alíquotas de 8µl de óleos essenciais foram transferidas para os slots feitos no ágar, que continha 3mm de diâmetro e volume de 7 mm³.

A cultura reveladora (*Staphylococcus aureus* ATCC 25963) foi adicionada em Erlenmeyer com 200 mL de TSB e colocada em incubadora BOD a 37°C por 24 horas. Após esse período, a cultura foi repicada para novo meio TSB e, a partir destes, as leituras em espectrofotômetro foram feitas até se atingir 10^8 UFC/mL. O ágar Miller Hilton semi-sólido foi inoculado com cultura reveladora padronizada e depositado sobre camada do mesmo ágar. Após a solidificação slots foram feitos no ágar. Os poços de deposição ou slots foram preenchidos com os óleos nas concentrações de 0,1%; 0,5%; 1%; 5%; 10%; 20%; 30%; 40% e 50% de óleos de orégano, cravo-da-índia e manjerição e as placas incubadas em BOD 37°C por 24 horas. Foram medidos os diâmetros dos halos formados.

3.4 Avaliação *in vitro* da potência inibitória da nisina

A potência da nisina foi testada pelo método de difusão em ágar como descrito no item 3.4.1.2. As concentrações escolhidas para o teste foram 1mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 12,5 mg/kg (Máximo permitido por lei para adição em alimentos (ANVISA, 1996) e 18 mg/kg.

3.5 Produção da ricota

Esta etapa consistiu na fabricação de ricota e adição dos aditivos a serem testados. Esta etapa foi realizada respeitando-se sempre o mesmo protocolo. Na fabricação, todo o leite utilizado foi pasteurizado e suas características físicas e microbiológicas foram certificadas. Antes de cada fabricação, os equipamentos foram lavados com água e detergente, depois passados por água destilada e posterior desinfecção em solução iodada (10%). Logo após cada fabricação, as ricotas enformadas foram colocadas para esfriar, protegidas da poeira e de contaminantes. Decorridas duas horas após a enformagem, amostras de ricota foram examinadas microbiologicamente antes de serem inoculadas com o microrganismo. A nisina utilizada foi submetida à análise microbiológica para detectar algum problema de diminuição de atividade, devido ao fato de a filtração em membrana milipore 0,22 μ m reter o princípio ativo do produto.

A ricota foi fabricada no Laboratório de Laticínios do Departamento de Ciências dos Alimentos. Primeiro, fabricou-se o queijo minas frescal, coletando-se o soro. Depois, o soro foi colocado em tanques, onde era aquecido; a acidez original do soro foi reduzida (11°Dornic a 14°Dornic) para 8°Dornic, utilizando-se NaOH (Figura 6). A técnica utilizada para a fabricação de ricota permite que ela tenha consistência mais cremosa, facilitando, assim, a incorporação dos aditivos bem como o inóculo. A cada fabricação foram utilizados 100 litros de leite, obtendo-se assim 4,5kg de ricota.

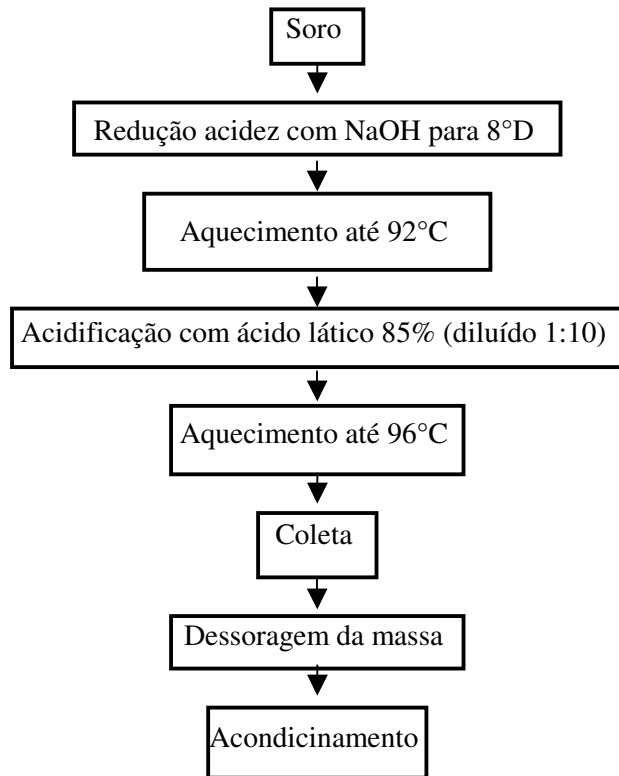


FIGURA 5 Fluxograma da fabricação da ricota cremosa (Fonte: Ribeiro, 2002 modificado).

3.5.1 Coleta e preparo da amostras

As amostras de ricota foram acondicionadas em potes plásticos tratados com solução clorad, e colocadas sob luz ultravioleta (UV) por uma hora. Cerca de 4,5kg de ricota foram elaborados em três fabricações, utilizando-se 720g por cada fabricação, que foram divididos em 90g por tratamento, sendo todos adicionados de *S aureus* ATCC 25923 com concentração celular de 10^8 UFC/g e de óleos essenciais, óleos essenciais e nisina, apenas nisina (12,5mg/kg) e o controle, sem adição de antimicrobiano. Após a adição, o produto foi novamente dividido em potes com 10 gramas de produto para serem analisados após 0, 6, 12, 24, 48 horas e 5, 10, 15 e 21 dias, constituindo assim oito tratamentos e nove tempos de análise.

Os óleos essenciais foram adicionados na ricota nas seguintes concentrações: cravo-da-índia 1%, manjerição 10% e orégano 5%, a nisina foi adicionada a 12,5mg/kg.

3.5.2 Controle microbiológico.

A ricota sem adição de microrganismo e apenas com adição da cultura de *S.aureus* foi os controles utilizados. Todos os tratamentos foram submetidos à análise de coliformes e de contagem de *Staphylococcus aureus*, assegurando que somente o microrganismo inoculado estivesse presente na ricota. Os potes contendo ricota foram armazenados em estufa BOD a 7°C, previamente sanificada com formol a 5%. A higienização da BOD foi certificada pela exposição de placas de Petri contendo Baird Parker, por 48 horas.

3.5.3 Determinação de coliformes a 35°C e termotolerantes na ricota

Os coliformes a 35°C e termotolerantes foram determinados pela técnica do Número Mais Provável (NMP), utilizando-se três séries de três tubos. O teste presuntivo foi constituído pela homogeneização de 10 g de cada amostra em

90mL de citrato de sódio a 2% em homogeneizador tipo Stomacher (Metroterm®). Em seguida, foram feitas diluições seriadas em água peptonada a 0,1%. Alíquotas de 1 mL das diluições apropriadas foram semeadas em caldo lauril sulfato tripitose e incubadas a 37°C por 24-48 horas. Após esse período, os tubos positivos, com apresentação de gás e turvação, foram transferidos para tubos contendo caldo verde brilhante e incubados a 37°C por 24-48 horas, constituído-se essa etapa no teste confirmativo dos tubos positivos. No teste presuntivo, alíquotas de cultura foram transferidas com auxílio de alça de níquel cromo para tubos contendo caldo EC, os quais foram incubados, a 45°C, por 24-48 horas, constituindo o teste para a determinação do NMP de coliformes temotolerantes.

3.5.4 Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

Foi semeado 0,1 mL do homogenato de cada diluição preparada, em superfície de meio Ágar Baird Parker (BPA), que foi incubadas a 37°C, por 48 horas. Posteriormente à contagem e observação de colônias, foram selecionados 10% das colônias (colônias que apresentaram as seguintes características: negras, pequenas e brilhantes, com a presença de dois halos, sendo um translúcido e outro opaco) que foram transferidas para caldo BHI por 24 horas. Após este período, foram realizadas provas confirmativas, coloração de Gram e testes bioquímicos de oxidase, crescimento em NaCl 15%, catalase, coagulase, termonuclease, produção de acetoina, hemólise, urease, pigmentação e fermentação aeróbica e anaeróbica de manitol e glicose, segundo *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994), para certificação de *S.aureus*.

3.6 Análise estatística

O experimento foi acompanhado por modelo linear misto (mod = tempo + Tratamento:tempo + tempo² + Tratamento:tempo²) com intervalo de confiança de

95%, no qual projetou-se a ação dos aditivos (nisina e óleos essenciais). Todo o experimento foi realizado em triplicata, podendo-se acompanhar a cinética de crescimento do microrganismo nas ricotas em diferentes tempos (0, 6, 12, 24, 48, 5, 10, 15, 21 dias). O delineamento experimental foi em blocos casualizados com oito tratamentos e nove tempos de análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Qualidade microbiológica dos condimentos e da nisina

Os resultados das análises microbiológicas dos condimentos e da nisina estão apresentados no Quadro 3. Os condimentos apresentaram índices negativos de coliformes, indicados por valores menores que 0,3 número mais provável (NMP/g) de coliformes. Não foi detectada a presença de *S.aureus* nos condimentos e a análise microbiológica da nisina apresentou os menos resultados negativos. Estes resultados mostram que os condimentos e a nisina estavam com boa qualidade microbiológica, não apresentando nenhum microrganismo competidor ou mesmo algum que pudesse interferir no experimento.

Como pode haver variações entre os compostos antimicrobianos do mesmo condimento devido a vários fatores, tais como secagem, época de plantio, horário de coleta e tipo de solo, todo o óleo utilizado durante as fases do experimento foi obtido na fase de extração para evitar resultados diferentes.

QUADRO 3 Análise microbiológica dos condimentos (cravo-da-índia, orégano e manjeriço) e nisina

Amostras	*CT (NMP/g)	**CF(NMP/g).	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g).
Condimentos	<0,3	<0,3	<1 x 10 ²
Nisina	<0,3	<0,3	<1 x 10 ²

CT coliformes a 35°C **CF coliformes a 45°C

4.2 Formação de halo de inibição provocado pelo *Syzygium aromaticum* (cravo-da índia)

O cravo-da-índia possui propriedades antimicrobianas excelentes. Dentre os seus componentes com atividade contra microrganismo, destaca-se o eugenol (Janssen et al., 1987), muito usado na odontologia como componente de seladores e outros produtos anti-sépticos de higiene bucal, tendo efeito bactericida comprovado (Shapiro et al., 1994; Cai & Wu 1996, Chong et al., 1997; Kaplan et al., 1999).

As propriedades bactericidas do cravo-da índia sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram testadas em várias concentrações, 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%. Devido ao forte aroma do condimento as concentrações utilizadas para o teste foram até 50%, pois, acima desta concentração, o flavor do condimento ficaria muito marcante no alimento alterando assim o flavor original da ricota, conforme descrito por Lambert et al. (2001).

Para o teste da difusão em ágar do óleo de cravo-da-índia, foi utilizado o etanol como diluente, como descrito por Bagamboula et al. (2004), nas concentrações citadas e colocadas nos “slots” do ágar na placa (Figura 6). Observa-se que, nas concentrações de 0,1 e 0,5%, não houve formação de halo de inibição pronunciados, provavelmente pela baixa concentração do principio ativo. Os valores de inibição acima de 1% permanecem constantes, o que pode ser devido a varias hipóteses. Entre elas, o etanol pode influenciar na entrada do óleo na célula bacteriana, ou seja, quanto mais diluído o óleo, mais facilmente ele atinge a célula bacteriana. Hoje ainda se conhece pouco sobre o modo de ação dos óleos essenciais em extrato alcoólico na célula microbiana, porém, sabe-se que eles podem afetar o sistema de troca da membrana citoplasmática, causando desestruturação enzimática. Isto pode ser influenciado pelo óleo diluído que atinge mais facilmente a célula devido à maior difusibilidade do

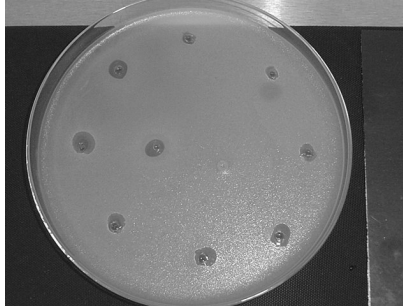


FIGURA 6 Placa com cultura reveladora de *S.aureus*, mostrando a formação de halos de inibição pelo óleo essencial de cravo-da-índia.

QUADRO 4 - Valores médios em milímetro formado pelos halos de inibição de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), em placas inoculadas com cultura reveladora *S. aureus* ATCC 25923

Diluição	Diâmetro do halo (mm)
0,1	0,5
0,5	0,5
1%	5,6
5%	6
10%	6
20%	6
30%	6
40%	6
50%	6,1

etanol no ágar (Cox et al., 2000). A concentração escolhida para ser utilizadas no teste na matriz alimentar foi de 1% pois apresenta um halo maior de 3mm e não tem grande flavorização do produto. Como apenas o etanol não afeta a célula não houve a formação de halo nas concentrações menores que 1%, assim percebe-se que o etanol é apenas um veículo transportador dos princípios ativos, não apresentando atividade antimicrobiana.

4.3 Formação de halo de inibição pelo orégano (*Origanum vulgare*)

Orégano tem como princípios ativos o timol e o carvacrol, que representam de 70% a 80% dos compostos deste óleo (Adam et al., 1998). O óleo essencial de orégano, como preservante de alimentos, está sendo muito usado, já que algumas cepas de microrganismos patogênicos já adquiriram bastante resistência aos preservantes químicos (Gould, 1996). O timol presente no orégano é um composto fenólico, com ação sobre a célula bacteriana, não muito bem descrito. Mas, Davidson (1993) descreve que a ação destes compostos é sobre a membrana celular onde o timol desorganiza sua estrutura, promovendo desnaturação de enzimas essenciais. Ocorre também alterações na força protomotora pela dissipação dos componentes como o diferencial de pH e o potencial elétrico.

A ação do orégano sobre as cepas de *S.aureus* foi menor que a do cravo-da-índia, que age mais fortemente, inibindo o crescimento microbiano em concentrações menores. Já o orégano promoveu boa formação de halo na concentração de 5%. Este resultado já foi descrito por Zaika (1988). O cravo-da-índia tem ação antimicrobiana mais efetiva e o orégano mais amena, quando comparados entre si. As medições dos halos de inibição estão apresentadas no Quadro 5 e Figura 7, no qual nota-se que não houve formação de halos em concentrações de extrato de orégano inferiores a 1%, resultado também descrito por Zaika (1988).

QUADRO 5 Valores médios em milímetro formados pelos halos de inibição de orégano (*Origanum vulgare*), em placas inoculadas com cultura reveladora *S. aureus* ATCC 25923.

Diluição	Diâmetro do halo (mm)
0,1	0,0
0,5	0,0
1%	1
5%	3,83
10%	3,83
20%	4,16
30%	3,83
40%	3,5
50%	3,83

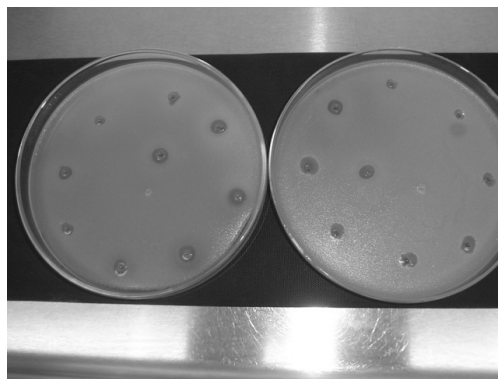


FIGURA 7 Placa com cultura reveladora *S.aureus*, mostrando a formação de halos de inibição pelo óleo essencial de orégano.

A diluição escolhida para o teste na matriz alimentar foi a de 5%, a menor diluição que apresentou a formação de maior halo (halo superior a 3mm); as outras diluições maiores apresentaram praticamente o mesmo halo de inibição, não justificando sua utilização, uma vez que o produto ficaria com sabor muito acentuado (Lambert et al., 2001).

4.4 Formação de halo de inibição pelo manjericão (*Ocimum basilicum*)

O manjericão (*Ocimum basilicum*) é uma planta aromática e medicinal pertencente à família Lamiaceae, com cerca de 60 espécies. Destaca-se por apresentar substâncias de interesse para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. O manjericão tem como princípios ativos vários derivados fenólicos, como eugenol, metil chavicol e metil cianeto, freqüentemente combinados com linalol, um nomoterpeno (Fleisher & Fleisher, 1992).

Ocimum basilicum fornece, sem dúvida, o óleo que possui maior valor no mercado internacional. Conhecido pelo nome de manjericão branco, é designado comercialmente por óleo basílico doce. Este óleo é produzido em larga escala em vários locais do mundo: Índia, Bulgária, Egito, Paquistão, Israel, Yugoslávia, USA, Madagascar, Albânia e Hungria, perfazendo um total de 42,5 toneladas/ano, cotado no mercado internacional a US\$1,450/kg. O tipo europeu é considerado de altíssima qualidade, produzindo delicado aroma devido à mistura de linalol e estragol em sua composição química, sendo extensivamente utilizado como aromatizante de licores finos e perfumes raros (Figura 5)

O teste de inibição do *S aureus* pelo manjericão apresentou baixa inibição, ou seja, foi necessária concentração maior do óleo para apresentar inibição. Estes halos estão listados no Quadro 6. A menor concentração que apresentou melhor inibição (5 mm de halo), foi com 10% de óleo essencial, valor bem elevado, já que com esta concentração o alimento apresenta grande aromatização pelo composto.



FIGURA 8 Placa com cultura reveladora *S.aureus*, mostrando a formação de halos de inibição pelo óleo essencial de manjericão

QUADRO 6 Valores médios em milímetro, formados pelos halos de inibição de orégano (*Origanum vulgare*), em placas inoculadas com cultura reveladora *S. aureus* ATCC 25923.

Diluição	Diâmetro do halo (mm)
0,1	0
0,5	0
1%	1,3
5%	2,3
10%	5
20%	4,6
30%	5
40%	5
50%	5

4.5 Análise físico-química e microbiológica do soro e do leite

Os resultados das análises físico-químicas do soro e do leite encontram-se no Quadro 7 e das análises microbiológicas, também do soro e do leite, estão no Quadro 8. Observa-se que ambos encontram-se dentro dos padrões físico-químicos determinados pela legislação, mas o leite apresentava contagens microbiológicas abaixo do que é exigido para leite pasteurizado tipo B, o que torna um bom produto pra ser utilizado no experimento.

QUADRO 7 Resultados de alguns componentes físico-químicos do leite e do soro, utilizado nas três fabricações de ricota

Componentes	Leite	Soro
Densidade	1,030±0,002	1,028±0,002
Gordura	3,0±0,2	1,2±0,41
Acidez (°D)	15,3±1,16	12,3±1,52

QUADRO 8 Resultado das análises microbiológicas do leite e do soro empregados na fabricação das ricotas.

Amostra	*CT (NNP/mL)	**CF(NNP/mL).	Estafilococos coagulase positiva (UFC/mL).	*Aeróbios mesófilos (UFC/mL)
Leite	< 0,3	< 0,3	< 1,0 x 10 ²	3,3 x 10 ³
soro	< 0,3	< 0,3	< 1,0 x 10 ²	1,8x10 ³

CT coliformes a 35°C **CF coliformes a 45°C

A contagem total de microrganismos mesófilos apresentou alguns valores, porém, sabe-se que é muito difícil ou praticamente impossível obter ausências deste grupo de microrganismos. A legislação brasileira (Brasil, 2001), estabelece um total de 8×10^4 UFC/mL para este grupo de microrganismo, o que foi obtido nas amostras de leite e soro das três fabricações.

4.6 Análise físico-química e microbiológica das ricotas sem inoculação de *S.aureus* ATCC 25923

As análises das amostras de ricota coletadas logo após a enformagem, sem adição de microrganismo e antimicrobiano, encontram-se no Quadro 9 no qual observa-se elevada qualidade microbiológica e físico-química do produto e que o indicativo de qualidade higiênico-sanitária coliformes (ICMSF, 1998), obteve índices negativos. A contagem total de microrganismos mesófilos obteve também baixos números. Produto com grande umidade e fresco apresenta, normalmente, algum número deste grupo de microrganismos. Porém, como a ricota foi armazenada a 7°C, esses microrganismos não interferiram no crescimento do microrganismo inoculado. Não foi detectada a presença de estafilococos coagulase positiva viabilizando a inoculação, já que o microrganismo testado pertenceu a este grupo indicando que, em contagens posteriores, só serão detectados os microrganismos oriundos da inoculação intencional.

QUADRO 9 Análise microbiológica da ricota antes da inoculação com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Amostra	*CT (NMP/g)	**CF(NMP/g).	Estafilococos UFC/g) ¹ .	*Aeróbios mesófilos (UFC/g)
Ricota	< 0,3	<0,3	< 1,0 x 10 ²	3,0 x 10 ³
Padrão*	10 ³	10 ²	10 ²	Sem padrão

*Padrão Brasil 2002, para queijos com alta umidade. 1 Estafilococos coagulase positiva

A qualidade físico-química (Quadro 10) da ricota também se apresentou dentro dos padrões brasileiros (Brasil, 2002). A ricota cremosa possui característica de ser menos gordurosa que a ricota comum, pois, em sua formulação, não se coloca leite, o que torna o produto com baixa percentagem lipídica, sendo melhor para o consumo por pessoas que não queiram ingerir altas quantidades de lipídeos em sua dieta. Porém, as ricotas apresentaram uma concentração de lipídeos acima do regulamentado pela legislação, que esta entre 8% e 9%, o que não interferiu no decorrer do experimento. Outra característica desta ricota é que, em sua formulação, não constou a presença cloreto de sódio, estendendo assim o uso deste tipo de alimento para pessoas que não querem ou não podem utilizar com alimentos com este tipo de ingrediente.

4.7 Análise microbiológica da ricota controle no decorrer do experimento

As análises microbiológicas da ricota controle mostraram o crescimento padrão dos microrganismos no produto sob armazenamento. As análises foram feitas nas três repetições. A ricota controle não foi inoculada com *S. aureus* e nem adicionada de antimicrobianos. A partir dela, verificou-se que, durante as três fabricações, o local de estoque permaneceu livre de microrganismos ou com níveis muito baixos, não provocando a contaminação do produto.

QUADRO 10 Composição da ricota antes da inoculação do microrganismo e a adição dos óleos.

Parâmetros analisados	Valor
Gordura	11%
Acidez pH	5
Umidade	75%
Proteína	8,35%

A contagem de coliformes, já no teste presuntivo, apresentou ausência de microrganismo, indicando valores sempre inferiores a 0,3 NMP de coliformes/g da ricota em todos os tempos avaliados, estando o produto livre de competição desses microrganismos com o inoculado (Quadro 11).

A contagem de estafilococos coagulase positiva apresentou sempre baixas contagens, ou seja, sempre menor que $1,0 \times 10^2$ UFC/g de ricota, esta contagem foi o índice que mais se destacou, uma vez que a presença de *S. aureus* não inoculado na ricota poderia comprometer as análises.

QUADRO 11 Análise microbiológica do controle, ricota cremosa, durante o experimento.

Período horas	*CT (NMP/g)	**CF (NMP/g).	Estafilococos (UFC/g) ¹ .	*Aeróbios mesófilos (UFC/g)
0	< 0,3	< 0,3	< 1,0 x 10 ²	3,0 x 10 ³
6	< 0,3	< 0,3	< 1,0 x 10 ²	2,8 x 10 ³
12	< 0,3	< 0,3	< 1,0 x 10 ²	3,3 x 10 ²
24	< 0,3	< 0,3	< 1,0 x 10 ²	2,01x 10 ²
48	< 0,3	< 0,3	< 1,0 x 10 ²	4,12x 10 ²
120	< 0,3	< 0,3	< 1,0 x 10 ²	3,17x 10 ²
240	< 0,3	< 0,3	< 1,0 x 10 ²	2,01x 10 ²
360	< 0,3	< 0,3	< 1,0 x 10 ²	3,0x 10 ²
504	< 0,3	< 0,3	< 1,0 x 10 ²	2,17x 10 ²
*Padrão	10 ³	10 ²	10 ²	Sem padrão

*Padrão Brasil 2002, para queijos com alta umidade.

¹ Estafilococos coagulase positiva.

4.8 Ação dos óleos e da nisina na matriz alimentar, ricota cremosa

4.8.1 Ação da nisina

A nisina é um antibacteriano, produzido por cepas de *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, mais ativa contra bactérias Gram-positivas. A nisina tem seu modo de ação na membrana citoplasmática, formando poros na membrana e, com isso, ocorrerá um efluxo de pequenas moléculas causando um colapso celular. A aplicação prática da nisina em alimentos é afetada pela sua baixa capacidade de adsorção em pH 3,0, valor mínimo e máximo em pH 6,5 (Parente et al., 1994). Por esta razão, em algumas matrizes alimentares, o uso da nisina não é recomendado. A concentração utilizada para o experimento foi de 12,5mg/kg de ricota, já que valores acima deste não são permitidos na legislação e valores abaixo não apresentaram ação significativa contra o microrganismo estudado.

A nisina apresentou ação na matriz alimentar contra o *S. aureus*, reduzindo 3 e 3,5 ciclos logarítmicos no período entre 12 a 24 horas, o que pode ser observado na Figura 8. Entretanto, após 48 horas, o microrganismo voltou a crescer, o que permite dizer que a nisina ficou adsorvida na membrana de maneira irreversível ou de maneira não específica.

Já que tem ação única, ou seja, a molécula adere na membrana formando poros, e não age em outra célula, e isso ocorre sempre quando a nisina entra em contato com microrganismos sensíveis, ocorre a diminuição do seu título, o que foi notado no experimento. Então, as células sobreviventes retomam seu crescimento, alcançando uma população de 8 ciclos logarítmicos com 504 horas de crescimento, ou seja, similar ao controle. Isto ocorreu devido à adição de concentrações insuficientes de bacteriocina para inibição total da carga de microrganismo presente na ricota.

O modo de ação é dependente de vários fatores, entre eles a concentração de microrganismo. A inibição de células persiste enquanto houver

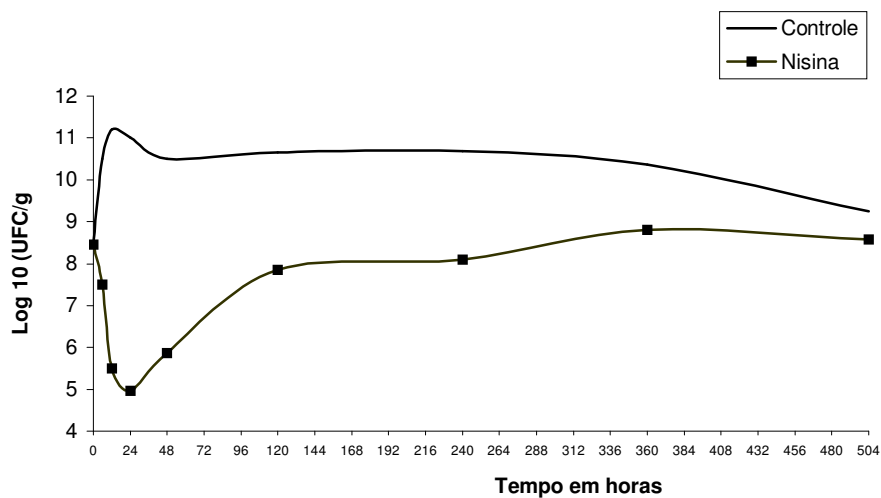


FIGURA 9 Acompanhamento do crescimento de *Staphylococcus aureus*, inoculado em ricota cremosa adicionada de nisinina (12,5 mg/kg) durante 21 dias ou 504 horas. $P \leq 0,005$

bacteriocina ativa remanescente no meio de crescimento. Esta concentração alta de microrganismo foi proposital, pois desejava-se saber se grande contaminação pode ser controlada pelo aditivo adicionado à ricota.

4.7.1 Ação dos óleos essenciais

A nisinina apresentou ação apenas durante 24 horas de vida de prateleira da ricota. Após este período, o microrganismo teve seu desenvolvimento novamente estabelecido. Como já discutido, a nisinina fica adsorvida na membrana celular, não restando moléculas disponíveis para a adsorção na membrana de outros microrganismos como observado na Figura 9. Os óleos essenciais demonstram inibição maior que a nisinina e a ricota apresenta uma alta

atividade de água; com isso os óleos chegam mais rapidamente à membrana celular, onde desempenham sua função como descrito por Smith-Palmer et al. (1998). Além disso, a quantidade de óleo foi suficiente para inibir toda a concentração de células em níveis bem baixos, cerca de 3,5, ciclos logarítmicos para o cravo-da-índia e manjeriço e 3 ciclos para o orégano, mantendo este valor até 504 horas (21 dias).

Esta ação mais efetiva dos óleos em relação à nisina é influenciada pela hidrofobicidade do óleo, indo para as regiões mais lipofílicas, como a membrana celular, onde interage com os lipídeos da membrana matando as células, como observado por Juven et al. (1994). As concentrações de óleos adicionados à ricota foram suficientes para a inibição do microrganismo. Porém, Mendonza-yepes et al. (1997) descrevem que, para se alcançar a mesma inibição *in vitro*, a concentração colocada no alimento dever ser maior, o que não foi notado no experimento.

O *S. aureus* é um microrganismo Gram-positivo, o que melhora ação dos óleos, ou seja, há maior incorporação do aditivo na parede celular (Harpaz, 2003). Em estudo usando o mesmo teste realizado *in vitro*, Dorman & Deans (2000) utilizaram óleos essenciais de cravo-da-índia, orégano, gerânio e pimenta, para avaliar sua atividade sobre 25 espécies de bactérias Gram-positivas e negativas, observou-se que bactérias Gram-positivas realmente eram mais suscetíveis aos óleos essenciais estudados do que as Gram-negativas.

A ação do cravo-da-índia é apresentada na Figura 10; a redução logarítmica de 3,5 ciclos logarítmicos acontecem após 6 horas de inoculação. O princípio ativo do óleo de cravo-da-índia é o eugenol, que compõe cerca de 80% deste óleo. Em estudos com *B.cereus* foi notada a interferência deste composto na síntese de amilase deste microrganismo bem como destruição celular. Em estudo com *S.aureus*, Farag et al. (1989), Smithi-Palmer et al. (1998) e Hammer

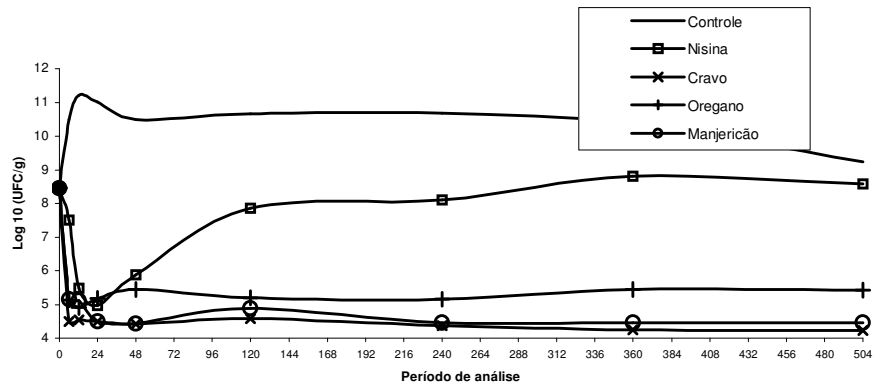


FIGURA 10 Acompanhamento do desenvolvimento de *S. aureus*, inoculado em ricota cremosa adicionada de óleos essenciais de cravo-da-índia, orégano e manjeriçao e nisina no decorrer de 21 dias ou 504 horas. As inibições causadas pelos óleos essenciais são estatisticamente semelhantes $P \leq 0,005$.

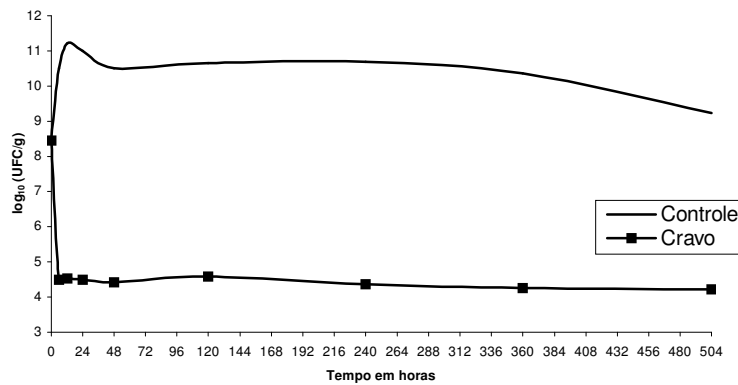


FIGURA 11 Acompanhamento do desenvolvimento de *S. aureus*, inoculado em ricota cremosa adicionada de óleos essencial de cravo-da-índia no decorrer de 21 dias ou 504 horas. $P \leq 0,005$.

et al. (1999) obtiveram boa inibição *in vitro* deste microrganismo pelo óleo essencial de cravo-da-índia. Em estudo realizado com iogurte, com adição de cravo-da-índia observou-se que este óleo possui boa e eficaz inibição microbiana (Bayoumi, 1992)

A adição do óleo de manjerição na ricota foi na concentração de 10%, valor muito elevado, pois o óleo de manjerição possui fortes características flavorizantes. Porém, esta concentração foi testada com a finalidade de inibir o crescimento de *S.aureus*. A redução do número de microrganismos foi na ordem de 3,5 ciclos logarítmicos nas seis primeiras horas e, com 24 horas, ocorreu diminuição de mais um ciclo, permanecendo até 21 dias (504 horas) (Figura 12).

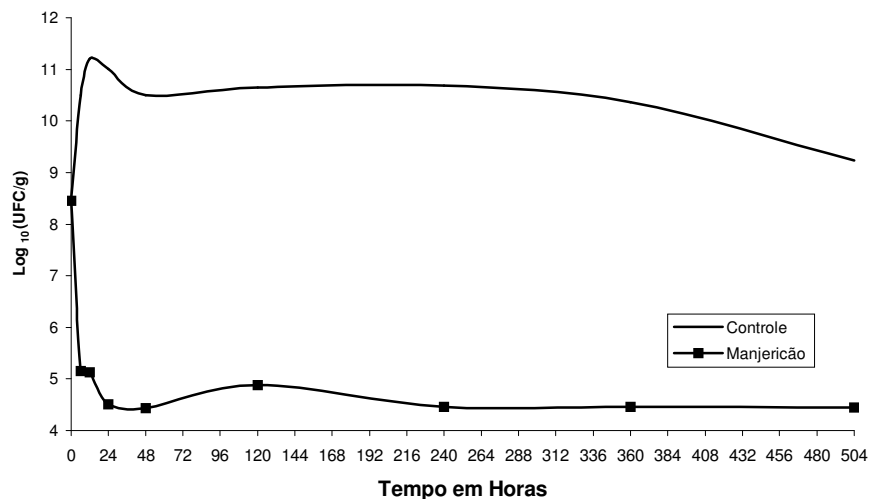


FIGURA 12 Acompanhamento do desenvolvimento de *S. aureus*, inoculado em ricota cremosa adicionada de óleos essencial de manjerição no decorrer de 21 dias ou 504 horas. $P \leq 0,005$.

O manjeriço tem como princípios ativos, segundo Opalchenova e Obreshkova, (2003) linalol (54,95%), metil chavicol (11,98%), metil cianeto (7,24%) e linoleno (0,14%) Neste mesmo estudo, os autores testaram a ação do óleo essencial de manjeriço, em *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp e *Pseudomonas* spp, e obtiveram bons resultados em experimentos *in vitro*.

O óleo essencial de orégano foi adicionado na concentração de 5%, pois foi a concentração menor que apresentou maior halo de inibição no teste *in vitro*. O óleo essencial de orégano tem como principais componentes o carvacrol e o timol, que têm ação sinérgica, como demonstraram Lambert et al. (2001), testando o óleo essencial de orégano, timol e carvacrol e obtendo inibição total de *S.aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Demonstrou-se que o óleo pode ser adicionado em matrizes alimentares, desde que não interfira no *flavor* normal do alimento. Estes mesmos autores citam que o carvacrol foi o composto que mais recebeu atenção para elucidar seu modo de ação, que timol é bem parecido estruturalmente com o carvacrol; tendo o hidroxil se agrupando em local diferente no anel fenólico, as duas substâncias agem na membrana celular ocasionando aumento na sua permeabilidade. Em estudos com *Bacillus cereus*, Utee et al. (1998) demonstraram que o carvacrol interage com a membrana celular associando-se a camada fosfolipídica e causando o aumento da fluidez da membrana. A redução do microrganismo inoculado foi de 3,35 ciclos log para as seis primeiras horas de inoculação, porém com 21 dias (504 horas), a redução foi menor, 3,0 ciclos log (Figura 12). Isso demonstra que uma menor ação nos últimos dias de análise, ocorre é devido a uma redução na atividade microbiana destes composto, principalmente o timol, que pode ser afetado por proteínas.

4.7.2 Ação sinérgica dos condimentos e nisina.

Várias interações ou sigergismos entre os óleos essenciais e compostos do alimento foram sugeridos, como interações entre pH, atividade de água, entre

outros. Porém, nem todos estão esclarecidos ou estudados. Um sinergismo que ocorre entre o eugenol e o NaCl a 5% no alimentos foi estudado por Tassou et al. (1995), quando com a adição de 2% a 3% de NaCl mais 5% de pó de cravo-da-índia, ocorreu aumento na permeabilidade celular, causando entrada de NaCl no interior da célula e aumentando a redução microbiana.

A ação antimicrobiana da nisina juntamente com o cravo-da-índia está representada na Figura 13. Pode-se observar que, durante o período de análise (504 horas ou 21 dias), o comportamento de inibição não sofreu alteração pela inclusão da nisina nas ricotas com cravo-da-índia, ou seja, não houve sinergismo

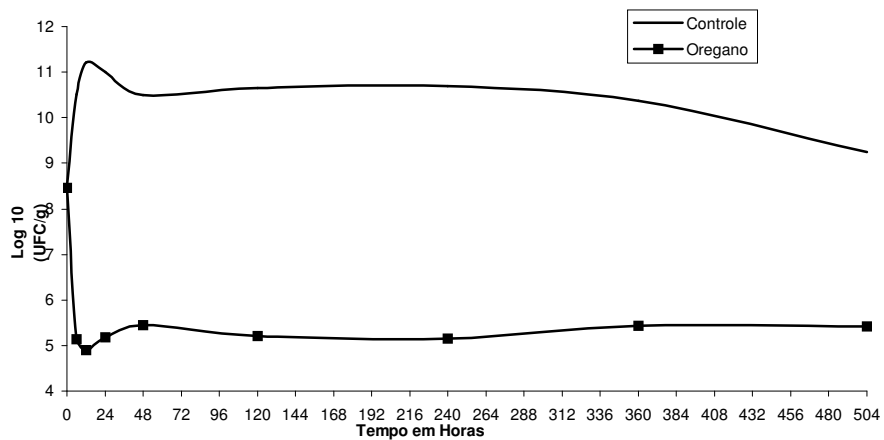


FIGURA 13 Acompanhamento do desenvolvimento de *S. aureus*, inoculado em ricota cremosa adicionada de óleo essencial de orégano no decorrer de 21 dias ou 504 horas. $P \leq 0,005$.

nas condições experimentais utilizadas. A ação de inibição pertenceu somente ao condimento adicionado e as reduções logarítmicas para o cravo-da-índia com nisina e para o cravo-da-índia somente foram as mesmas durante o período de análise. O efeito da nisina não foi observado, mesmo com a diminuição da concentração celular nas primeiras horas de inoculação, ou seja, se o efeito da nisina sobre o microrganismo estivesse presente, nas primeiras 24 horas a diminuição seria maior. Porém, esta interação não foi observada. A nisina teve sua ação diminuída por algum componente do óleo essencial.

A Figura 14 apresenta o comportamento de inibição da nisina juntamente com o manjericão. Neste caso, também não foi notado nenhum sinergismo entre o óleo e a nisina. As reduções logarítmicas são as mesmas para o manjericão com nisina ou o manjericão apenas; não houve sinergismo aparente. A Figura 15 demonstra a ação antimicrobiana do orégano com e sem nisina.

Em trabalho realizado por Pol & Smid (1999) com nisina e carvacrol, princípio ativo do orégano, foi observada redução adicional de 3 ciclos log quando o princípio ativo foi adicionado juntamente com a nisina. Porém, os autores do trabalho sensibilizaram as células com lisozima, o que pode ter influenciado neste sinergismo. O mesmo sinergismo não foi notado para a ricota, mesmo usando dose letal de óleo essencial.

Em estudos realizados por Periago et al. (2001) com adição de timol, carvacrol e nisina em *B. cereus*, a diminuição do número de células foi conseguida após o tratamento térmico a 42°C das células microbianas. Em outros estudos realizados por Utee et al. (1998) e Periago & Moezelar (2001), estes resultados também foram observados. A diminuição do número de microrganismo só ocorreu com o tratamento térmico das células microbianas.

O calor pode ser um agente que facilita a adsorção da nisina na membrana celular, mesmo em dosagens mais baixas. A ação da nisina é mais

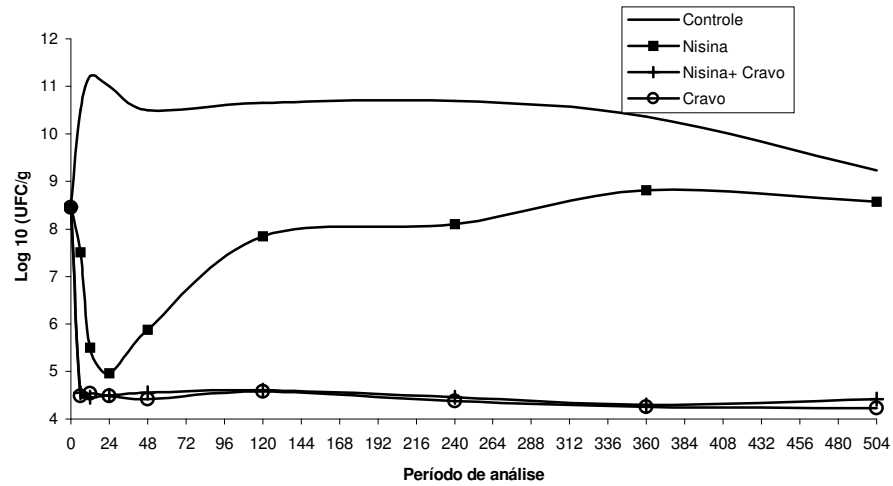


FIGURA 14 Acompanhamento do crescimento de *S. aureus* inoculado em ricota cremosa adicionada de óleo essencial cravo-da-índia e nisina.

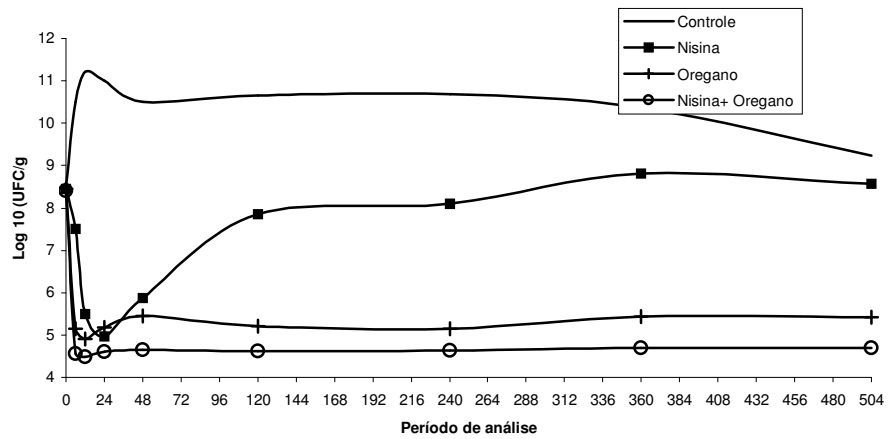


FIGURA 15 Acompanhamento do crescimento de *S. aureus* inoculado em ricota cremosa adicionada de óleo essencial de orégano e nisina

eficiente na fase de crescimento celular do que na fase estacionária. Como inocularam-se 10^8 UFC/g do produto, a fase de crescimento foi muito rápida, passando o microrganismo logo para fase estacionária, o que pode ter levado a esta inatividade da nisina. Isso indica variação na ação da nisina em condições fisiológicas diferentes, fator importante quando se usa nisina como conservante de alimentos. Porém, os óleos essenciais não apresentam esta limitação. Assim ocorreu esta diminuição, do número de microrganismo pela ação dos óleos com ou sem nisina.

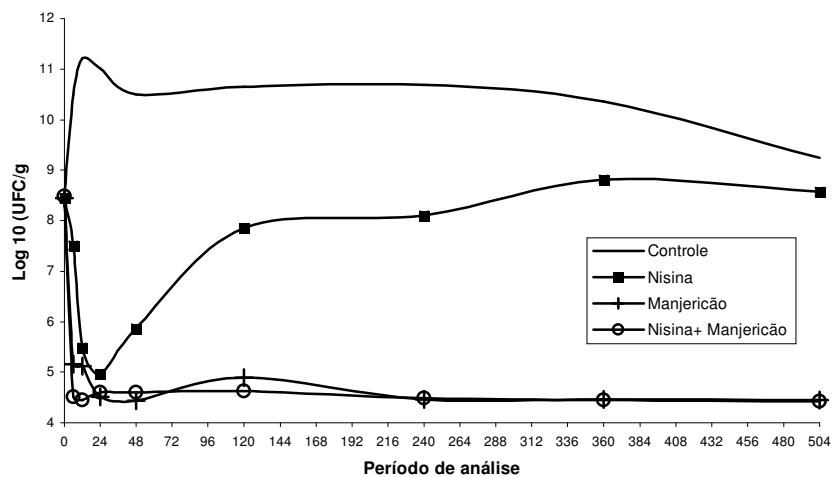


FIGURA 16 Acompanhamento do crescimento de *S. aureus* inoculado em ricota cremosa adicionada de óleo essencial de manjerição e nisina.

5 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais utilizadas, os resultados obtidos permitem concluir que:

- A técnica utilizada para determinação da quantidade inibitória dos condimentos, pode ser aplicada para outras substancias, se forem obedecidos os protocolos estabelecidos.
- A nisina não obteve inibição devido a alta concentração celular utilizada 10^8 UFC/g.
- Os óleos essenciais tiveram ação antimicrobiana esperada. O óleo essencial de cravo-da-índia obteve a melhor inibição se comparado aos óleos essenciais de orégano e manjeriço.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O experimento mostrou que a aplicação de antimicrobianos naturais extraídos de plantas, como os óleos essenciais, são, hoje, grande oportunidade de agregação de valores aos produtos. Porém, sendo necessários mais estudos como a ação sensorial no produto, as interações com componentes intrínsecos dos alimentos e a ação sobre os patógenos alimentares associados a cada produto. A nisina poderá ser testada com concentrações menores de *S.aureus*. O efeito sinérgico pode ser testado utilizando-se utilizando concentrações mais baixas de óleos e nisina onde não ocorreria o mascaramento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, K., SIVROPOULOU, A., KOKKINI, S., LANARAS, T., ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, n.5 v.46, p.1739–1745, may 1998.
- AKTUG, S. E. ; KARAPINAR, M. Inhibitory effect of linden Flower (*Tilia* flower) on the growt of fooborne Pathogens. **Food Microbiology**, Amesterdam, n.1, v.4, p.97-100, 1987.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Marvim L.Speck Editor, Washington, 1992a.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3.ed. Washington, 1992b. 1219 p.
- ANSARI, S. H.; ALI, M.; SIDDIQUI, A.A; RIZZO, L.; BIANCO, A Food handlers and foodborne diseases: knowledge, attitudes, and reported behavior in Italy. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 63, n.3, p. 381-385, Mar. 2000.
- ANSARI, S.H.; ALI, M.; SIDDIQUI, AA .Evaluation of chemical constituents na trade potencial of *Cymbopogon citratus* (lemongress). **Hamdard medicus**, Karachi, v. 39, n.1, p.55-59, 1996.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância sanitária. Ministério da Saúde.Portaria DETEN/MS nº29, de 22 de Janeiro de 1996.
- ARIDOGAN, B.C.; BAYDAR, H.; KAYA, S.; DEMIRCI, M.; OZBASAR, D.; MUMCU, E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential olis. **Archives Pharmacal Research**, Seoul, v. 25, n. 6, p.860-864, Dec. 2002.
- ASSUNÇÃO, E.G. **Identificação dos pontos de contaminação microbiana ao logo do processamento de queijo prato: estudo de caso**. 2001. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras.
- BAGAMBOULA, C.F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri* **Food Microbiology**, Amsterdam, n.1, v.21 33–42, april 2004

BALABAN, N.;RASOOLY, A . Review: Staphylacoccal enterotoxin. **International Journal of Food Microbiology**, Amesterdam, v.61, n.1, p.1-10. Oct 2000

BARBEL, S.; YASHPHE, J. effect of the essential Oil from *Achillea fragrantissima* on *Eschericha coli* Cells. **Current Microbiology**, Oxford, v. 19, p.337-341, 1989.

BAYOUMI, S Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of yogurt. **Chemie, Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel** Hamburg, n.1, v.14, pg.21-26,1992..

BAYDAR, H.; SAGDIC, O.; TAHSIN, K Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, Oxford, n.3v.15, pg. 169-172, Apr 2004

BEHME, R.J.; SHUTTLEWORTH, R.; McNABB, A.; COLBY, W.D. Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. **Journal of Clinical Microbiology**, Washignton, v.34, n.12, p.3075-3084, Dec. 1996.

BERGDOLL,M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amesterdam, v.10,n.2,p.91-100,Mar.1990

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

BERGEY'S MANUAL[®] OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. **Bacteriological Analytical Manual**. 9.ed. Baltimore; Willians & Wilkins, 1994. 1687p

BOZIARIS, I.S.; ADMAS, M.R. Effects of chelators and nisim produced in situ on inhibition and inactivation of gram negatives. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.53, n.2/3, p. 105 – 113, Dec. 1999.

BRABES, K.C.S. **Detecção de *Staphylococcus aureus* e suas toxinas em leite provenientes de bovinos leiteros com mastite**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras ,MG.

BRASIL. Leis, decretos, etc. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. RISPOA. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa, nº51 de 19 de setembro de 2002

BREUKINK, E.; KRUI, B. The antibiotic nisin, a special case or not? **Biochimica et Biophysica Acta**, Paris, n1-2,v.1462, pg 223-234, 1999.

BRUNO, M.E.C., KAISER, A., MONTOILLE, T.J. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. **Applied Environmental Microbiology** Washington, n.7,v.58 pg. 2255-2259 July1992.

CAI, L.N.; WU, C.D.. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **Journal of Natural Products** Cincinnati n.10 v.59: pg.987-990 Oct 1996

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.1, p. 7-10, Fev. 2000

CARMIATI, D ; GIRAFFA, G; BOSSI, M.G. Bacteriocin-like inhibitors of *Staphylococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. **Journal Food Protection**, nº59 v 9 p 614-617, Sept. 1989

CHONG, B.S., FORD, T.R.P.; KARIYAWASAM, S.P. Short-term tissue response to potential root-end filling materials in infected root canals. **International Endodontic Journal** Oxford, n.4, v.30 pg.240-249, July 1997

CHUNG, K.T.; K.T.; THOMASSON, W.R.; WU-YUAN, C.D. Growth inhibition of selected food-borne bacteria, particularly *Listeria monocytogenes*, by plant extracts. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, n.4 v.69, p.498-503, Oct. 1990

CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal Food Science**, Chicago, n.2, v.49, p.429-434, Mar/Apr.1984

COX, S. D., MANN, C. M., MARKHAM, J. L., BELL, H. C., GUSTAFSON, J. E., WARMINTON, J. R., & WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Meleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, n.1, v.88, p.170–175 Jan. 2000

DAVIDSON, P. M.. Parabens and phenolic compounds. In: P. M. DAVIDSON, A. L. BRANEN (Eds.), **Antimicrobials in foods** p. 263–305. New York, Marcel Dekker, Inc. 1993.

DAESCHEL, M. Applications and interactions bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. In: DAESCHEL, M (ed) **Bactericins of lactic acid bacteria**. New York: Academic Press, 1992. p.17-43.

DEANS, S.G.; SVOBODA K.P. Antimicrobial activity of summer savory (*Satureja hortensis L.*) essential oil and its constituents. **Journal of Horticultural Science** Ashford, n.2 v.64, pg. 205-210, Mar 1989

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

DE WIT, J.C. ET AL.,. Effects of garlic and onion oil on toxin production by *C. botulinum* in meat slurry. **Journal Food Protection**, Ames v.42, p.222-224, 1979

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

DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology** Oxford, n.2, v.88, pg308-316, Feb. 2000.

DORMAN, H.J.D. Phytochemistry and bioactive properties of plant volatile oils: antibacterial, antifungal and antioxidant activities. PhD Thesis, University of Strathclyde, Glasgow. 1999

DZIEKAK, JD. Spices: Food Tecnology, v.43, p102-110, 1989

EMBRAPA GADO DE LEITE (on-line)
w.w.w.cnp.gl.embrapa.br/producao/dados2002/producao/tabela0230.php

FARG, R.S.; DAW, Z.Y.; ABO-RAYA, S.H. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. **Journal Food Science**, Chicago, n.1v.54, p.74-76, Jan/Feb. 1989.

FERREIRA, A. C. **Uso de açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução de *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 em ricota.** (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos) 2003.UFLA: Lavras. 76p.

FILHO, E. S. A . **Características microbiológicas do queijo minas “fresca”, produzido artesanalmente e comercializado no município de Poços de Caldas** - MG.Tese Mestrado Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP – Jaboticabal nov. 1999

FLEISHER, Z., FLEISHER, A., Volatiles of *Ocimum basilicum* traditionally grown in Israel. Aromatic plants of the Holy Land and Sinai Part VIII, J. **Essential. Oil Research**, Carol Stream, v.4 p.97–99, 1992.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FURTADO, M.M. **Tecnologia de queijos: Manual técnico para produção Industrial de queijos.** Campinas, 1994, 118p.

GOA, F.H., ABEE, T., KONINGS, W.N. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisim in liposomes and cytochrome c oxidase containing proteoliposomes. **Applied Environmental Microbiology** Washington, n.9 v. 57 pg. 2164-2170 Sept 1991.

GOULD, G.W., Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59 pg.82–86 1996.

GARG, S.C.; GARG, D.C. *In vitro* antibacterial activity of some essential oils. **Parfum Kosmet**, Berlin, v.61, p.212-220, 1980.

HAYES, T. J., CUNDY, K. R., FERNANDES, P. B. HOOBER, J. K. Purification and characterization of a bacteriocin from *Bacterioides fragilis*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, n.3 v. 155, pg. 1171-1177 Sept. 1983

HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, n.6, v.86, pg.985-990, June 1999.

HARPAZ, S., GLATMAN, L., DRABKIN, V., GELMAN, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**. Ames v66 (3), pg410–417, Mar. 2003.

HELANDER, I.M., WRIGHT, A . van., MATTILA-SANDHOLN, T. M. Potential of lactic acid bacteria and novel abtimicrobials against Gram-negativa bacteria. **Trends in Food Science & Techonology**, Oxford, n.5v. 8 pg. 146 – 150 May 1997.

HENNING, S.; METZ, R.;HAMMES, W.P. Studies of the mode of actions nisin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.3, n.3, p.121-134, July 1986

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, OHA.; STALEY, JT.; WILLIANSMS, S.T. *Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wikins, 1994. 787p.

HUHTANEN, C.N. Inhibition of Clostridium botulinum by Spice extracts and aliphatic alcohols. **Journal Food Protect**, Ames, n.3, v.43, p195-196, Mar. 1980.

HURST, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: BRANEN, A.L & DAVIDSON, P. M. **Antimicrobial in Fodd**, New York, Marcer Dekker, 1983.

INTERNATIONAL COMMISSION MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS – ICMSF. *Microorganismos de los alimentos: caracterisitcas de los patógenos microbianos*. ed. Acriba S.A., Zaragoza-Espanha, 606p., 1998.
INTERNATIONA COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Técnicas de las analyses de los alimentos**. Zaragoza-Espanha: Acriba, 1983. 430p

JACK, R.W., TAGG, J.R., RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Review**, Washingtonv.59, n.2, p171-200, June 1995.

JANSSEN, A. M., SCHEFFER, J. J. C., SVENDSEN, A B. Antimicrobial activity of essentials oils. **Planta Medica**, Stuttgart, n.5 v.53 pg 395-398, Oct. 1987.

JUVEN, B.J., KANNER, J., SCHVED, F., WEISSLOWICZ, H. Factors Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituent **Journal of Applied Bacteriology** Oxford, v.76 pg626–631 1994.

KAPLAN, A.E., PICCA, M., GONZALEZ, M.I., MACCHI, R.L. ;
MOLGATINI, S.L. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an *in vitro* evaluation. **Endodontics and Dental Traumatology**, Copenhagen, n.1 v.15,p42-45 Feb. 1999.

KOKETSU, M., GONÇALVES, S.L. Óleos essenciais e sua extração por arraste de vapor. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1991. 24p. (EMBRAPA-CTAA. Documento, 8)

LAEKEMAN, G.M. Eugenol a valuable compound for *in vitro* experimental reseach and worthwili for further in vivo investigation. **Phytoth Research**, Susset, n.3 v.4. p.90-96, June. 1990.

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

LEITE, R. L. **Avaliação da qualidade microbiológica de queijos”Minas frescal” e “Minas padrão” elaborados com leite provenientes de vacas com mastite sub-clínica.** Lavras: UFLA, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A; ALENCAR, J. W.; CRAVERO, A A;
CLARK, A.M. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, Sussex, v.4, n.2, p.82-84, Apr.1990.

LIU, W., HANSEN, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Applied. Environmental Microbiology**, Washington, n.9 v.56, p.2551–2558, Sept. 1992.

MAHMOUND, A. L. Antifungal action and antifatogenic properties of some essential oil constituents. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 110-113, Aug. 1994.

MARCHISIO, E., SONCINI, G., CANTONI, C. Alterazioni di Ricotte. **Industrie Alimentari**.Milan, v.38, n.379, p. 265-270, mar. 1999.

MATOS, F.J.A. **Farmacologia** vivas. 2. ed. Fortaleza: EUFC, 1994. 179p

MAYR-HARTING, A., HEDGES, A. J., BERKELEY, C.W. Methods for studying bactericins. In: NORRIS, J.R., RIBBONS, D.W. Ed **Methods in microbiology**. V.7a New York, USA, Academic Press. Inc., 115p 1972.

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

MING, X.; DAESCHEL, M.A Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, n.4, p.416-420, Apr.1995

MOHALLEM, M.L. **Utilização da nisina na destruição térmica de *Bacillus stearothermophilus* em homogêneo de cogumelos pH 6,2**. 1994. 113p. Dissertação (mestre em ciências dos Alimentos – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

MORENO, I, LERAYER, A. L.S., LEITÃO, M. F de F. Caracterização antimicrobiana Bac 383 produzida por *Lactococcus lactis subs lactis* ITAL383 sensibilidade de *Listeria monocytogenes*, *Listeria sp.* e *Staphylococcus aureus*. In: Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos Rio de Janeiro julho 1998a (CD).

MORENO, I; LERAYER, A L.S; Van-Dender, A G.F; LEITÃO, M.F de F. Inibição de *Listeria sp* em queijo Minas frescal, processados com *Lactococcus* produtores de bacteriocinas. Anais do XV Congresso Nacional de Laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.52, pg. 238-244 1998b

MORENO, I ; LERAYER, A.L.S; LEITÃO, M.F.F; VIALTO, A ; SOUZA, G. Ocorrência e principais características de bacteriocinas de lactococos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.35 n1/2 pg87-108 jan-dez 2001.

MOSSEL, D.AA.; Garcia, B.M. **Microbiologia de los alimentos**: fundamentos ecológicos para garantir y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. Zaragoza-Espanha: Acriba, 1983. 375p.

NISKANEN, A.; KOIRANEN, L. Correlation of enterotoxin and termonoclease of Staphylococcal strains isolated from different souces. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.40, n.8, p. 543-548, Aug. 1977.

NOTERMANS, S.; WERNARS, K. Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. **International Journal of Food Microbiology, Amesterdam**, v. 12, n.1, p. 91-102, Jan. 1991

NUNEZ, M; RODRIGUEZ, E.G; MEDINA, G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripenig of Manchego cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, n.6 v87, pg 671-677 Dec. 1997

NYCHAS, G.J.E.; TASSOU, S.C.; BOARD, R.G. Phenolic extract from olives: inhibition of *Staphylococcus aureus*. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, n.5, v.10 p 217-220, 1990.

OPALCHENOVA, G., OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil an essential oil from *Ocimum basilicum L.* against multidrug resistant clinical isolates of the genera Staphylococcus, Enterococcus and Pseudomonas by using different test methods. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, n.1, v54 pg105– 110, July 2003

PARENTE, E.; RICCIARD, A.; ADDARIO, G. Influence of pH on growth and bacteriocin production by Lactococcus lactis subsp. Lactis 140NWC during batch fermentation. **Applied Microbiological and Biotechnology**, Washington, v.41, n.4, pg.388-394, June 1994.

PARRY. J.W.**Spices: morfology, histology, chemeitry**. New York: Chemical, 1962. v2, 183p.

PERIAGO, P.M. AND MOEZELAAR R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of Bacillus cereus. **International Journal of Food Microbiology** Amsterdam, n.1-2, v.68 pg.141–148, Aug. 2001.

PERIAGO, P.M., PALOP, A. FERNANDEZ, P.S. Combined Effect of Nisin, Carvacrol and Thymol on the Viability of Bacillus cereus Heat-Treated Vegetative Cells. **Food Science Technology International**, London,v.7, n.6 pg.487–492, Dec. 2001

PEREIRA, A. J. G. , PÓVOA, M. E. B., CRUZ, R. C. Influência da velocidade de aquecimento sobre a qualidade da ricota. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** – Juiz de Fora, nº 257, vol. 43, pg. 11 – 14 mai/junho 1998

PEREIRA, M.L; PEREIRA,J.L.; SERRANO, ^aM.; BERGDOLL,M.S.
Enterotoxinas estafilocócicas: Inportância e métodos analíticos de detecção.
Higiene Alimentar,São Paulo v.13, n.61, p.24-34, Set.1999.

PEREIRA, M..L; PEREIRA, J.L.; SERRANO, AM.; BERGDOLL, M.S.
Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.44,n.68/69, p.32-41,jan./fev. 2000

PARK, C.E.; AKHTAR, M. A; RAYMAN, M.K. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of Staphylococcal enterotoxins in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n7, p.2509-2512, July 1993.

PONCE, A.G.; FRITZ, R.; VALLE del. C.; ROURA, S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie Food Scienc*, San Diego, n.7. V.36, pg.679-684. march, 2003

POL, I.E.; SMID,E.J. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, n.6, v.29, pg.166–170 june,1999

PHUTHI, J.S. **Spices and condiments**: chemistry, microbiology, technology. New York: Academic, 1980. 449p.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Oxford, v.39, n.5, p. 603-613, May 2001

RAY, B. Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* as a food biopreservatives, p-207-264. In: RAY, B., DAESCHEL, M (Eds) **Food biopreservatives of microbial origin**. New York: CRC Press, 1992. p.89-101.

RIBEIRO, A.C. Influencia da temperatura, pH e nisina no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa. Dissertação mestrado- UFLA 69p 2002

RILEY, M. A.,WERTZ, J.E. Bacteriocins: Evolution, E cology and Application. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto v56 pg. 117-137 april 2002.

SHARMA, N.K., REES, C.E.D; DOOD, C.E.R. Developmente of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washingtonv66, n4, p.1347-1353, abr./2000.

SHAPIRO, S., MEIER, A;GUGGENHEIM, B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. **Oral Microbiology Immunology** Copenhagen, n.4, v.9 pg.202-208. Aug 1994

SHELEF, L.A. Antimicrobial affects of spices. **Journal Food Safety**, Trumbull, n.1, v.6, p.29-44, 1983.

SHELEF, L.A.; JYOTHI, E.K.; BULGARELLI, M.A. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and food. **Journal Food Safety**, Trumbull, n.1, v.4, p.35-58, 1982.

SILLIKER, J.H. New bacteria in the news: A special symposium. *Listeria monocytogenes* **Food Technology**.Chicago,n.1, v.40 pg. 24 Jan. 1986.

SILVA, F. T. , GOMES, C. A. O. Segurança Alimentar de Leite e Derivados Aplicações de BPF e APPCC. In: O agronegócio do leite e os Alimentos lácticos funcionais. Juiz De Fora – MG. Instituto de Laticínios Cândido Tostes – Juiz de Fora/EMBRAPA pg. 133 julho 2001.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.^a; SILVEIRA, N.F.A **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela., 1997. 295p.

SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Food Microbiology** Oxford, n.2, v26, pg.118–122, Feb 1998.

SPEECK, M.L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2. ed. Washington: American Public health Association, 1984. p. 411-427.

SPELHAWG, S. R., HARLANDER, S.K. Inhibition of foodborne Bacterial pathogens by Bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *pediococcus pentosaceus*. **Journal of Food Protection** Ames, n.12, v.52 pg. 856 –862 Dec. 1989.

STEVENS, K.A.; SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A. Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other Gram-positive bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.12, p. 3613-3615 Dec.1991.

STILES, M.E.; NG, K. Use of Baird-Parker's medium to enumerate Staphylococcus aureus in meats. **Journal of Food Protection**, Ames v. 44, n 8, p.583-587, Aug. 1981.

TODOROV, S., ONNO, B., SOROKINE, O., CHOBERT, J. M., IVANOVA, I., DOUSSET, X. Detection and characterization of a novel antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST31 isolated from sourdough. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, n.3 v. 48 pg. 167-177 June 1999.

TOLEDO, M.M **Crescimento de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCK 400 e produção de nisina em meio à base de extratos vegetais.**2000.66p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

TASSOU, C., DROSINOS, E.H., NYCHAS, G.-J.E.,. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 4°C and 10°C. **Journal of Applied Bacteriology** Oxford, n.6 v.78, pg.593– 600 June 1995

THARIB, SM.; GNAN, S.O.; VEITCH, B.A. Antimicrobial Activity of compounds from *Artemisia campestris*. **Journal Food Protection**, Ames, n.2. V.46, p.185-187, Feb 1983.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, °F.; CANDEIAS, J.A N **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586 p.

TRAVASSOS, A E. R., MEDEIROS, R. S. de., MANGUEIRA, T. F. B. .Análise de Microrganismos indicadores, *Salmonela*, *Staphylococcus aureus* em ricota de leite de cabra In: Anais XVIII Congresso Nacional de Laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** – Juiz de Fora n° 321 vol. 56 jul/ago pg. 116 –121 2001.

TYRREL, M.H. Evolution of natural development with the assistance of modern technologies. **Food Technology**, Chicago, v.44 p. 68-72, 1990.

ULTEE, A., GORRIS, L.G., SMIT, E.J. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, n.2 v.85, pg 211 –218, Aug 1998.

VERNOZY-ROSAND, J.; MAZUY, C.; PREVOSTO, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUM, Y.; FLEURETTE, J. 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.

VIGNOLO, G. M., SURIANI, F., RUIZ-HOLGADO, A . P. Antibacterial activity of lactobacillus strains isolated from dry fermented sausages. **Journal Applied Bacteriology** Oxford, n.4 v.75 pg. 344 – 349 Oct 1993.

ZAIKA, L. L.. Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. **Journal of Food Safety**, Trumbull, n.1, v.9, p.97–118, 1988.

ZAIKA, L.L.; KISSINGER, J.C. Effects of some spices on acid production by stressed cultures. **Journal Food protection**, v.42, p.572-576, 1979.