



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**USO DA *Curcuma longa* L. NA REDUÇÃO DE
Escherichia coli (ATCC 25922) E *Enterobacter
aerogenes* (ATCC 13048) EM RICOTA**

SANDRA RIBEIRO MAIA

2003

55521

117.0047433

SANDRA RIBEIRO MAIA

USO DA *curcuma longa* L. NA REDUÇÃO DE *Escherichia coli* (ATCC 25922) E *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) EM RICOTA

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

Prof. Dr. Ronaldo de Abreu

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

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

Maia, Sandra Ribeiro

Uso da *Curcuma longa* L., na redução de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota / Sandra Ribeiro Maia. -- Lavras : UFLA, 2003.

63 p. : il.

— Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Curcuma longa*. 2. Redução. 3. *Escherichia coli*. 4. *Enterobacter aerogenes*. 5. Ricota. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 576.163

- 637.353

SANDRA RIBEIRO MAIA

USO DA *curcuma longa* L. NA REDUÇÃO DE *Escherichia coli* (ATCC 25922) E *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) EM RICOTA

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

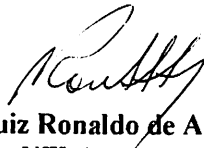
APROVADA em 27 de fevereiro de 2003

Prof. Dr. Celso José de Moura

UFG

Dra. Daise Aparecida Rossi

UFU



Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita.

Mahatma Gandhi

A Deus.

Ao meu filho, Vitor.

Ao meu marido, Synésio.

À minha mãe.

A toda a minha família.

Pelo estímulo, carinho e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pela oportunidade da realização do mestrado.

Aos professores da Coordenação de Tecnologia Ambiental do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET/ MG, pelo estímulo e apoio.

À Escola Agrotécnica Federal de Inconfidentes, MG, em particular, ao Professor Gabriel Vilas Boas, pela infra-estrutura cedida para a realização deste trabalho.

À Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade de Goiás, pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho dentro do projeto “Estabelecimento de tecnologia para o fortalecimento do agronegócio do açafrão (*Curcuma longa*)” no município de Mara Rosa, Goiás, financiado pelo CNPq.

Ao Professor Luiz Ronaldo de Abreu, pelo carinho e compreensão com que me orientou e durante o período em que, como professor, além dos sólidos conhecimentos transmitidos, aprendi a respeitar também por sua postura ética e profissional.

A todos os professores do curso de pós-graduação, pela contribuição à minha formação acadêmica.

À professora Henriqueta Merçon Vieira Rolim, da Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade de realização desse trabalho.

Ao Professor Celso José de Moura, da Universidade Federal de Goiás, pelo valioso apoio e cooperação, fundamentais em todas as etapas da execução deste trabalho.

À Dra. Daise Aparecida Rossi, da Universidade Federal de Uberlândia – MG, pelas sugestões apresentadas.

Ao Professor Cláudio Montenegro, do Departamento de Engenharia Agrícola, pela atenção e carinho na solução dos meus problemas.

Ao Chefe do Departamento de Ciência dos Alimentos, Professor Paulo Roberto Clemente, pelo apoio e amizade.

À companheira de todos os momentos, Ana Cristina Ferreira, pela amizade e apoio irrestritos.

À colega e também amiga Flávia, pela amizade e agradável convivência nesse período.

Aos amigos Maria das Graças, Carmozene, Fernando, Eliza e a todos que não tenha mencionado e que foram contemporâneos do curso de pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos, especialmente a Cleuza e a estagiária Alessandra, pela atenção e apoio.

Ao funcionário da Escola Agrotécnica Federal de Inconfidentes, Joel Felipe de Souza Oliva, pela valiosa contribuição na realização deste trabalho, com o apoio dos estagiários Thiago, Fernanda, Gicele e André, pelo envio de todas as mensagens por meio do seu e-mail.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Condimentos e especiarias com atividade antimicrobiana	3
2.2 Cúrcuma.....	6
2.2.1 A planta.....	6
2.2.2 Pré-processamento do rizoma	8
2.2.3 Composição da cúrcuma	9
2.2.3.1 Macrocomponentes	9
2.2.3.2 Pigmentos curcuminóides	9
2.2.3.3 Óleos voláteis	12
2.2.4 Extração	13
2.2.4.1 Obtenção da oleoresina	13
2.2.4.2 Obtenção da curcumina purificada	14
2.2.4.3 Obtenção do óleo volátil	15
2.2.5 Estabilidade	16
2.2.6 Toxicologia da cúrcuma	18
2.2.7 Legislação	20
2.2.8 Propriedades terapêuticas e antioxidantes	20
2.2.9 Produtos da cúrcuma e suas aplicações.....	22
2.3 Coliformes totais, coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i>	24
2.3.1 Coliformes totais	24
2.3.2 Coliformes fecais.....	24
2.3.3 <i>Escherichia coli</i>	25
2.3.3.1 Enterite causada por <i>Escherichia coli</i>	27
2.4 Queijo ricota.....	29
2.4.1 Presença de <i>Escherichia coli</i> em queijos	30
2.4.2 Método de avaliação de uma população de <i>Escherichia coli</i>	32
2.4.3 Legislação referente aos requisitos microbiológicos de queijos.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Matéria-prima.....	35
3.2 Caracterização do material	36
3.2.1 Determinação da curcumina no pó de cúrcuma.....	36

3.2.2	Preparação do extrato alcoólico de cúrcuma	36
3.2.3	Fabricação da ricota	36
3.3	Desenho experimental	38
3.4	Inoculação	39
3.4.1	Preparo do inóculo	39
3.4.2	Inoculação da ricota com <i>Enterobacter aerogenes</i> e <i>Escherichia coli</i>	40
3.5	Análises físico-químicas do soro e da ricota	40
3.6	Análises microbiológicas da ricota	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Análises de <i>Enterobacter aerogenes</i> na ricota tratada com extrato alcoólico de cúrcuma	45
4.2	Análises de <i>Escherichia coli</i> na ricota tratada com extrato alcoólico de cúrcuma	47
4.3	Análises físico-químicas do soro	49
4.4	Análises físico-químicas da ricota	49
4.5	Legislação referente aos requisitos microbiológicos de queijos	49
5	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

RESUMO

MAIA, Sandra Ribeiro. Uso da *Curcuma longa* L. na redução da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota. 2003. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.¹

Considerando o envolvimento de queijos como veículo de microrganismos patogênicos, foi avaliada a eficiência do extrato alcoólico de cúrcuma adicionado à ricota, no controle de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*. Foram fabricados três lotes de ricota cremosa e inoculados com 10^4 UFC/mL de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e 10^5 UFC/mL de *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048). Às ricotas foram adicionados 0,4% de NaCl e extrato alcoólico de *Curcuma longa* L., em concentrações que variaram de 0,0% a 2,0%. As ricotas foram avaliadas em D, D+1, D+7, D+14 e D+21, sendo D o dia da fabricação. Nesse dia foram feitas as análises físico-químicas. O percentual de umidade das ricotas foi, em média, de 73%. O pH médio observado foi de 5,4 e o percentual de gordura de 3%. De D a D+21 foram coletadas amostras para as análises microbiológicas. Os resultados evidenciaram, após 21 dias, uma redução do número de *Escherichia coli* de, aproximadamente, dois ciclos logarítmicos, nos tratamentos utilizados de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% de cúrcuma. Já para *Enterobacter aerogenes* a redução foi menor, de aproximadamente um ciclo logarítmico, de 10^5 UFC/mL para 10^4 UFC/mL, também nos tratamentos utilizados de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% de cúrcuma. Apesar dos resultados evidenciarem uma redução do número de células viáveis dos microrganismos avaliados, a cúrcuma não deverá ser o único meio preservativo, considerando uma contaminação inicial de 10^4 UFC/mL de *Escherichia coli* e 10^5 UFC/mL de *Enterobacter aerogenes*, pois não atenderia à legislação vigente quanto aos requisitos microbiológicos para queijos.

¹ Comitê Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA (Orientador). Celso José de Moura – UFG.

ABSTRACT

MAIA, Sandra Ribeiro. Utilization of *Curcuma longa* L. in reduction of *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) in ricotta cheese. 2003. 63p. Dissertation (Master in Food Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.¹

Considering cheese as vehicle for pathogenic microorganisms, this work aimed to evaluate the efficiency of the ethanolic turmeric extract added to ricotta cheese, in controlling both *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*. Three batches of creamy ricotta cheeses were manufactured and inoculated with 10^4 UFC/mL of *Escherichia coli* (ATCC 25922) and 10^5 UFC/mL of *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048). It was added 0,4% of NaCl and ethanolic turmeric extract with concentrations varying from 0.0% to 2.0% in the ricotta mass. The cheeses were evaluated in D, D+1, D+7, D+14 and D+21, being D the manufacturing day. In that day, the physical-chemical analysis were carried out. Moisture content was of 73% in average. The average pH observed was 5,4 and the fat content was 3%. Samples were collected from D to D+21 for microbiological analysis. Results showed a reduction in numbers of *Escherichia coli* after 21 days at about two logarithms cycles in those treatments in which 0,5%, 1,0%, 1,5% and 2,0% of ethanolic turmeric extract were used. As to *Enterobacter aerogenes* there was less reduction, at about one logarithm cycle, from 10^5 UFC/mL to 10^4 UFC/mL, also in treatments in which 0,5%, 1,0%, 1,5% and 2,0% of ethanolic turmeric extract were used. Although the results have shown a reduction in the number of the viable cells of the microorganisms evaluated, the ethanolic turmeric extract can not be a single preservative means, considering a initial contamination of 10^4 UFC/mL of *Escherichia coli* and 10^5 UFC/mL of *Enterobacter aerogenes*, once that would not be according to the current legislation referring to the microbiological cheese requirements.

¹ Guidance Committee: Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA (Advisor), Celso José de Moura – UFG.

1 INTRODUÇÃO

Os condimentos são utilizados com a finalidade de realçar ou repor características, como a cor e o sabor, que, com o processamento, podem ser perdidas.

Vários estudos conclusivos sobre os condimentos têm demonstrado que eles apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais e existem evidências de que o aumento do consumo dos condimentos pode levar a uma mudança na microbiota intestinal, reduzindo a incidência de câncer. Sabe-se do efeito inibidor de determinados condimentos no crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos veiculados por alimentos.

As propriedades antimicrobianas dos condimentos têm despertado muito interesse. Admite-se a perspectiva do uso de substâncias naturais presentes nos condimentos em substituição aos aditivos sintéticos utilizados no processamento dos alimentos com a finalidade de conservação. Conforme apontam alguns estudos, esses aditivos podem ser associados a doenças nos seres humanos. Cresce o interesse por corantes naturais para a utilização na indústria de alimentos em substituição aos artificiais, devido, principalmente, a estudos que apontam os efeitos tóxicos causados por corantes sintéticos (Safford & Goodwin, 1985).

A cúrcuma, também conhecida por açafrão da terra, de cultivo relativamente simples, vem despertando um interesse cada vez maior, pela possibilidade de sua utilização em substituição a corantes sintéticos, especificamente a tartrazina. Somado a isso, a cúrcuma apresenta também atividade antimicrobiana, fato de grande interesse na indústria de alimentos, em substituição aos conservantes sintéticos.

O interesse por queijos condimentados tem crescido. A ricota condimentada tem aparecido como uma boa opção de consumo, por se tratar de um alimento de fácil digestão e uma das formas mais simples e econômicas de aproveitamento do soro proveniente de vários tipos de queijos, obtendo-se um produto de fácil comercialização e baixo custo.

A ricota fresca é considerada um dos produtos que apresentam melhores condições para o desenvolvimento e crescimento de microrganismos, como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e fecais. Isto se deve, devido, principalmente, à disponibilidade de nutrientes, como sais minerais e lactose, dentre outros, o que compromete a qualidade do produto em sua vida de prateleira.

A ocorrência de coliformes em queijos normalmente indica que as práticas de elaboração dos mesmos foram inadequadas sob o ponto de vista sanitário. Em geral, a presença de coliformes em alimentos pode ser o indicio de contaminação fecal, existindo, portanto, a possibilidade da presença de bactérias enteropatogênicas. Seu crescimento inviabilizaria o consumo desses alimentos (Frazier, 1967).

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo geral verificar a viabilidade do uso da cúrcuma na redução de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* na produção do queijo ricota.

Especificamente, o objetivo deste trabalho é verificar a eficiência da cúrcuma na redução de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* na ricota.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Condimentos e especiarias com atividade antimicrobiana

Condimentos e especiarias são produtos aromáticos de origem vegetal, cuja finalidade principal é temperar alimentos. Possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais.

Existem cerca de 70 condimentos diferentes, cultivados e utilizados em todo o mundo. A concentração de condimento para inibição do crescimento bacteriano está na faixa de 1% a 5% (Shelef, 1983). As concentrações utilizadas com a finalidade de realçar o sabor e o aroma dos alimentos variam de 0,5% a 1,0%.

Estudos têm evidenciado que os princípios ativos dos condimentos localizam-se na fração de óleo essencial (Parry, 1962; Hitokoto et al., 1980; Pruthi, 1980; Farag et al., 1989). Estes óleos essenciais são misturas complexas de diferentes compostos, que contribuem com as propriedades antimicrobianas (Parry, 1962; Pruthi, 1980).

As propriedades antimicrobianas dos condimentos e de seus óleos essenciais têm sido estudadas, principalmente, com relação ao efeito inibidor de microrganismos patogênicos presentes nos alimentos. Diversos autores têm pesquisado as atividades antifúngicas e antitoxigênicas dos condimentos. Pesquisas comprovaram acentuada diminuição na produção de aflatoxinas, quando canela foi adicionada a pães, embora o crescimento de *Aspergillus parasiticus* não tenha sido afetado de forma pronunciada (Bullerman, 1974).

Estudos com cravo, anis e pimenta-da-jamaica realizados por Hitokoto et al. (1980), evidenciaram a inibição completa do crescimento de três espécies

toxigênicas de *Aspergillus*, enquanto outros condimentos inibiam apenas a produção da toxina.

Ao avaliar o efeito do timol, principal componente dos óleos de orégano e de tomilho, Buchanan & Shepherd (1981) constataram uma atividade antiaflatoxigênica significativa, decorrente da inibição do crescimento fúngico.

O efeito antifúngico de seis óleos essenciais de plantas cultivadas em Marrocos foi demonstrado por Benjilali et al. (1984), que verificaram a sensibilidade de 39 fungos aos antimicrobianos presentes na artemísia, tomilho, alecrim e eucalipto.

Thompson (1990) demonstrou a influência do pH na atividade antifúngica de substâncias naturais presentes nos óleos essenciais de condimentos. Ele verificou que o timol foi tóxico para espécies de *Aspergillus* em diversas condições de pH, enquanto o carvacrol inibiu a atividade fúngica de forma menos acentuada, quando as espécies foram cultivadas no pH ótimo de crescimento. O autor sugeriu que o pH do meio de cultura pode afetar a sensibilidade microbiana aos óleos essenciais.

A inibição de leveduras deterioradoras de alimentos pelos condimentos foi estudada por Conner & Beuchat (1984). Eles verificaram que, dentre 32 óleos essenciais extraídos de condimentos, os óleos de pimenta-da-jamaica, canela, cravo, cebola, alho, orégano e tomilho, foram, em ordem decrescente, os maiores inibidores. A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Artemisia caerulescens* no crescimento de *Candida albicans* e de *Saccharomyces cerevisiae* foi demonstrada por Moran et al. (1989).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados para avaliar a atividade antibacteriana dos condimentos e de seus óleos essenciais em relação à inibição do crescimento e da produção de toxinas por bactérias patogênicas veiculadas por alimentos. Estudos realizados por Barel & Yashphe (1989), em

células de *Escherichia coli* tratadas com óleo essencial de *Achillea fragrantissima*, 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 polipeptídios 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 *Staphylococcus aureus* cultivado na presença de compostos fenólicos extraídos de plantas.

A susceptibilidade de diversas bactérias ao alecrim, à sálvia e à pimentada-jamaica foi demonstrada por Shelef et al. (1980). Os autores concluíram que em concentrações menores que 0,5%, a sálvia e alecrim apresentaram efeito bacteriostático e que a combinação dos condimentos aumentou o efeito antibacteriano.

Deans & Ritchie (1987) verificaram as propriedades antimicrobianas de 50 óleos de plantas em 25 gêneros de bactérias, pela difusão em ágar. Constataram serem os óleos de tomilho, canela, louro, cravo, amêndoa, manjerona e de noz -moscada os maiores inibidores.

Moran et al. (1989) demonstraram as propriedades antimicrobianas do óleo essencial de uma espécie de artemísia sobre o crescimento de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

A susceptibilidade da *Listeria monocytogenes* a extratos de seis plantas chinesas foi confirmada por Chung et al. (1990). Deans & Svoboda (1990) demonstraram a atividade antimicrobiana do óleo volátil de manjerona em 25 espécies de bactérias e 5 espécies de fungos.

A combinação do uso de aditivos naturais associado a outras técnicas de conservação de alimentos, como o tratamento térmico, a refrigeração e a

diminuição da atividade de água (a_w) dos alimentos, é recomendada por Shibasaki (1982).

Embora muitos estudos “in vitro” da atividade antimicrobiana dos condimentos tenham sido realizados, são necessárias maiores investigações para que a aplicação prática dessas substâncias seja consolidada.

2.2 Cúrcuma

2.2.1 A planta

Pela sua cor amarela, a cúrcuma tem atraído a atenção há muito tempo. É mencionada em registros de livros assírios desde 600 a.c. como uma planta indiana de cor amarela e sabor amargo quando mastigada. Nas memórias de Marco Polo, de 1280, a cúrcuma é citada como uma cultura vegetal das regiões da China, com cheiro e cor de açafrão, mas que não é o açafrão (Parry, 1969).

O gênero *Curcuma*, pertencente à família *Zingiberaceae*, é constituído por cerca de 70 espécies rizomatosas de plantas herbáceas distribuídas pela Índia, China, Formosa, Malásia, Indonésia, Java, Filipinas, Caribe, Norte da Austrália e América do Sul (Mathai, 1979).

A espécie *Curcuma longa* L. é a que possui maior importância comercial e utilização em alimentos (Govindarajan, 1980). A cúrcuma apresenta a vantagem de não exigir tratamentos culturais especiais, apresentar boa produtividade, em média 20t/hectare e conter em média 6% de pigmentos curcuminóides (Nunes, 1989). O rendimento em rizomas frescos é de 10 t/ha (Donalizio, 1980) e apresenta um rendimento, em rizomas secos, em diversas variedades indianas, entre 0,46 e 3,64 t/ha (Sholto & Dougla, 1973).

Os rizomas maduros dessa planta, quando secos e triturados, fornecem um pó amarelo e aromático, empregado como ingrediente corante, na medicina popular e como repelente de insetos (Hallagan et al., 1995). Propriedades antioxidantes da cúrcuma também foram investigadas (Srinivas et al., 1992; Osawa et al., 1995; Semwal et al., 1997). A presença do óleo volátil, rico em substâncias aromáticas, proporciona à cúrcuma *flavor* de interesse na indústria de alimentos (Govindarajan, 1980; Jasim & Ali, 1992).

A cúrcuma é uma planta rizomatosa, de ciclo perene e que atinge até 1,50 metro de altura. As folhas têm o pecíolo longo, são grandes, de formato oblongo-lanceoladas e de origem basal. As flores são de coloração amarela e agrupadas em inflorescências do tipo espigas. O rizoma tem coloração externa branca e amarela por dentro. Os caules são anuais, emergem das gemas dos rizomas depois do florescimento e, completando o ciclo vegetativo, amarelecem e morrem (Correa, 1975).

O rizoma subterrâneo consiste de duas partes distintas: o rizoma primário ou a raiz-mãe, uma extensão de talo e muitos rizomas secundários longos e cilíndricos descendo do rizoma principal e conhecidos como dedos. As duas partes são diferenciadas no comércio, sendo a forma de dedos a preferida no mercado (Melchior & Kastner, citados por Govindarajan, 1980).

A propagação da cúrcuma ocorre por via assexuada, por meio dos rizomas. No plantio, a propagação é feita por gomos: pedaços de rizomas destacados do rizoma principal. De 15 a 30 dias, as gemas desenvolvem-se e as mudas mais vigorosas e uniformes são destinadas ao plantio (Donalisio, 1980).

No Brasil, a época de plantio vai de agosto a setembro e os rizomas podem ser colhidos de 6 a 10 meses após, quando a parte aérea começa a amarelecer e secar. Quando os rizomas destinam-se à extração de oleoresina, devem ser colhidos no segundo ano, com dois ciclos de idade (Donalisio, 1980).

A colheita é feita manualmente, revolvendo-se o solo e expondo os rizomas que serão colhidos. Os rizomas são lavados, o rizoma-mãe e os dedos são separados em lotes e preparados para serem processados.

O principal produtor mundial de cúrcuma é a Índia e 90% da produção são para o mercado interno, sendo o restante exportado para Irã, Líbia, Estados Unidos e Japão (Govindarajan, 1980).

No Brasil, a cúrcuma é mais cultivada em Goiás, Mato Grosso e São Paulo. O município de Mara Rosa, GO, é o que apresenta maior plantio comercial, com cerca de 150 hectares e produtividade média de 12 t/ha de rizomas. Essa produção destina-se, em quase que na sua totalidade, às indústrias nacionais de corantes e alimentos (Cecílio Filho, 1996).

2.2.2 Pré-processamento do rizoma

O processamento dos rizomas consiste de secagem solar ou artificial e posterior moagem. A secagem é lenta, levando de 10 a 15 dias para se completar. Quando seco, o rizoma endurece e apresenta-se de cor amarela uniforme e umidade em torno de 5% (Donalísio, 1980).

Anteriormente ao processo de secagem os rizomas podem ser submetidos ao processo de cura, que é essencialmente um cozimento do rizoma em água, a fim de gelatinizar o amido. Com esse procedimento diminui-se o tempo de secagem, as enzimas oxidativas são destruídas e reduz-se a carga microbiana (Govindarajan, 1980).

Comercialmente, a cúrcuma encontra-se disponível inteira (rizomas secos), moída (pó de cúrcuma) e como olcoresina. No varejo, o pó de cúrcuma é encontrado em embalagens de vidro ou plásticas. A olcoresina é estocada em

recipientes ao abrigo da luz e do calor, após homogeneização para garantir a uniformidade do produto (Souza, 1993).

2.2.3 Composição da cúrcuma

2.2.3.1 Macrocomponentes

Óleo voláteis:	1,3 a 5,5% (Guenther, 1952)
	2,8 a 6,0% (Mathai, 1976)
Umidade:	9,0 a 19,0%
Amido:	30,0 a 50,0%
Pentosanas:	4,7%
Proteína bruta:	6,0 a 11,0%
Fibra:	2,0 a 6,0%

Os rizomas contêm amido, óleo essencial e uma matéria corante, a curcumina, amarelo-alaranjada, empregada em alimentos (Parry, 1969).

O óleo é responsável pelo aroma da cúrcuma e não tem valor na indústria de temperos, exceto quando utilizado em formulações de “curry” ou molho de mostarda (Krishnamurthy et al., 1976).

2.2.3.2 Pigmentos curcuminóides

A cúrcuma contém pigmentos curcuminóides, dentre os quais a curcumina é o principal. Encontra-se presente no rizoma na proporção de 2,5% a 8,1% (Leach, 1904; Mathai, 1979; Govindarajan, 1980).

A curcumina é um pó cristalino, amarelo, inodoro, pertencente à classe diferuluilmetano e de fórmula empírica $C_{21}H_{20}O_6$.

A reação mais característica da cúrcuma (e curcumina) é a formação de cor vermelha, quando misturada com ácido bórico, e é usada como teste de identidade da cúrcuma (Takahashi, 1987). Segundo Janben & Gole (1984), a cor vermelha deve-se à formação de compostos chamados rubrocurcumina e rosocianina. Extratos de cúrcuma apresentam fluorescência laranja quando misturados com ácido bórico, o que não acontece com a curcumina purificada.

A cúrcuma contém ainda outros pigmentos, tais como a demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina, que são separados, como a curcumina, durante cromatografia em coluna com sílica gel, empregando-se benzeno como eluente (Srinivasan, 1953).

Estruturalmente, esses pigmentos são semelhantes. A curcumina possui dois grupos metoxila (OCH_3); a demetoxicurcumina tem somente um e a bis-demetoxicurcumina, nenhum (Figura 1).

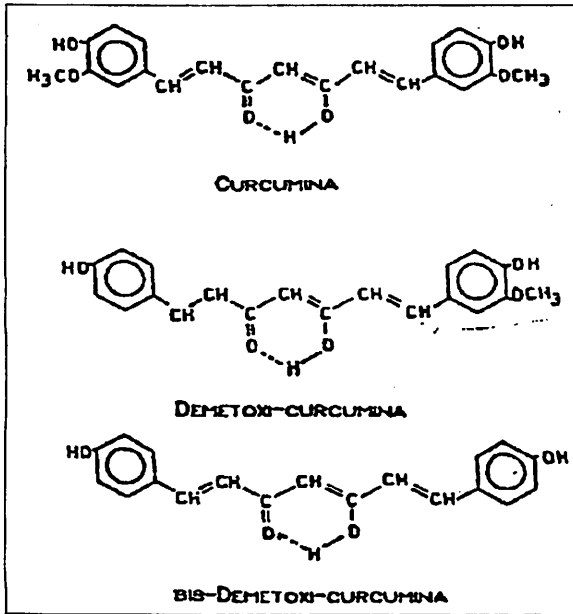


FIGURA 1. Estrutura dos pigmentos curcuminóides (Martins et al., 1992).

Os pigmentos apresentam fluorescência amarela sob luz ultravioleta. O espectro de fluorescência apresenta excitação a 434nm e emissão a 520nm. Os comprimentos de onda de máxima absorvância desses pigmentos são 429nm (curcumina), 424nm (demetoxicurcumina) e 419nm (bis-demetoxicurcumina). É usual expressar-se o teor total de pigmentos curcuminóides como curcumina na região de 425nm e isso é aplicável por razões práticas (American Spice Trade Association (ASTA), 1968; Krishnamurthy et al., 1976; Govindarajan, 1980).

O potencial de utilização da cúrcuma produzida no Brasil, como corante e flavorizante naturais para a indústria de alimentos, foi avaliado por Souza (1993). Amostras de cúrcuma provenientes de Minas Gerais foram comparadas quanto ao teor médio dos pigmentos e óleos voláteis.

Os resultados, um teor médio dos pigmentos de 4,41%, óleos voláteis em torno de 3,07 mL/100g de matéria seca e análise dos teores médios de lípides (8,51%), proteínas (7,01%), fibras (7,22%) e amido (39,87%), indicam que a cúrcuma produzida no Brasil apresenta resultados semelhantes à cúrcuma indiana, representando uma boa perspectiva de mercado de pigmentos e óleos voláteis.

Não há relação entre o conteúdo de óleo essencial e curcumina. As diferenças no teor de curcumina devem-se ao local de plantio, às práticas agrícolas, à fertilização e à maturidade dos rizomas. O teor de amido possivelmente se relaciona com a maturação (Govindarajan, 1980; Mathai, 1976).

2.2.3.3 Óleos voláteis

A proporção dos números de compostos voláteis presentes, bem como suas interações, determina o *flavor* característico do alimento. Dentre as classes de voláteis mais encontradas nos alimentos estão os ésteres, álcoois, ácidos, aldeídos, cetonas e terpenos (Wong, 1995; Oga, 1996), sendo estes últimos os responsáveis pelo *flavor* da cúrcuma, presentes no óleo volátil e na oleoresina .

Segundo Rupe et al. (1934) e Rupe & Gassmann (1936), o *flavor* da cúrcuma se deve a cetonas sesquiterpênicas, formadas por, aproximadamente, 59% de ar-turmerona e turmerona, numa proporção de 40% a 60%. Observaram também, estes autores, a presença de 6% de álcool sesquiterpênico.

Segundo Richmond & Pombo-Villar (1997), além das cetonas sesquiterpênicas, o extrato do óleo volátil de rizomas de cúrcuma contém uma série de ácidos graxos saturados e insaturados.

A oleoresina, produto viscoso, laranja-amarronzado, aroma fresco e pungente e sabor amargo, é composta de óleo volátil e pigmentos, materiais resinosos e graxos não voláteis, além de outros componentes ativos (Milán, 1992; Wong, 1995).

2.2.4 Extração

2.2.4.1 Obtenção da oleoresina

A oleoresina da cúrcuma é obtida por extração com solventes do pó de cúrcuma. A escolha destes solventes está condicionada à sua pureza e à permissão de uso por legislação vigente nacional e internacional, para fins alimentícios (WHO, 1971). A eficiência da extração, a facilidade e a economia na recuperação do solvente, de modo a deixar níveis residuais mínimos no produto final, também são levadas em conta (EOA, 1967).

Álcool etílico e acetona têm sido indicados como bons solventes. A acetona apresenta alguns problemas com relação à inflamabilidade e alto custo de recuperação. Entretanto, tem sido o solvente mais utilizado. O uso de dicloro etileno tem a vantagem de ser mais seletivo, imiscível em água, não inflamável e apresentar ponto de ebulição relativamente baixo. Porém, suas impurezas podem causar problemas de *off-flavor* (Govindarajan, 1980).

Processos de extração dos curcuminóides da cúrcuma com acetona, álcool etílico e dicloro etileno foram estudados. Os resultados demonstraram que extração em extrator Soxhlet do pó de cúrcuma com acetona, por 4 a 5 horas, forneceu um produto contendo 42% de curcuminóides. A acetona foi um pouco mais eficiente que o etanol e dicloro etileno (Krishnamurthy et al., 1976).

Os pigmentos compõem cerca de 1/3 de uma boa oleoresina. Para o uso comercial, a oleoresina é misturada a um veículo ou solubilizada com propileno

glicol, polisorbato ou óleo vegetal para tornar o manuseio mais fácil (Milán, 1992).

2.2.4.2 Obtenção da curcumina purificada

Em alguns alimentos, o aroma e sabor amargo da cúrcuma, devido à presença dos óleos volátil e não volátil, são indesejáveis. Assim, o hexano tem sido sugerido para remover o princípio amargo da cúrcuma, sem afetar o conteúdo de curcuminóides (Govindarajan, 1980).

Ao avaliar amostras de cúrcuma procedentes de Minas Gerais, Souza (1993) concluiu que o hexano mostrou ser mais eficiente do que o vapor d'água na extração do óleo volátil e que a acetona foi mais eficiente do que o etanol na extração dos pigmentos, após extração do óleo volátil com vapor d'água ou hexano.

De acordo com Govindarajan (1980), como a curcumina é insolúvel em água e éter, e solúvel em etanol e ácido acético glacial, uma maneira eficiente de isolar os curcuminóides seria extrai-los da cúrcuma em pó com etanol a quente, lavar com éter de petróleo e cristalizar.

Um processo para isolar curcumina da cúrcuma pela extração com solventes como hexano, heptano ou éter de petróleo foi patentado por Sair & Klee (1967). Após esta etapa, a amostra é submetida a uma nova extração com solventes como metanol, isopropanol, acetona e dicloro etileno, que retiram a oleoresina com pigmentos. A oleoresina deve, em seguida, passar por processo de remoção dos solventes utilizados.

A espectrofotometria é o método mais utilizado na quantificação dos pigmentos da cúrcuma (curcuminóides expressos em curcumina). Os pigmentos são extraídos com etanol absoluto; o extrato é filtrado em placa porosa n.º 2,

transferido quantitativamente para um balão de 100 ml e diluído para leitura em espectrofotômetro, no visível, a 425nm (Takahashi, 1987).

A quantificação isolada dos pigmentos presentes na cúrcuma pode ser feita em cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada – TLC e cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC (Govindarajan, 1980). Tonnesen & Karlsen (1983) descrevem um método mais rápido para separação dos pigmentos da cúrcuma, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com um detector de fluorescência.

2.2.4.3 Obtenção do óleo volátil

Os componentes do óleo volátil da cúrcuma resultantes de uma destilação por arraste de vapor encontrados por Kelkar & Sanjeeva (1934) foram predominantemente cetonas e álcoois sesquiterpênicos. Dentre esses, identificaram α -D-felandreno (1%), D-sabineno (0,6%), cineol (1%), borneol (0,5%), zingibereno (25%) e turmeronas (58%).

O óleo volátil obtido pela destilação de cúrcuma em pó varia de amarelo pálido a amarelo-alaranjado, com odor residual dos rizomas da cúrcuma.

A determinação quantitativa do óleo volátil é feita pelo método de Clevenger (AOAC, 1980) e a identificação, bem como a quantificação de seus componentes, por cromatografia gasosa. O método de Clevenger baseia-se na destilação do óleo volátil com vapor d'água e leitura direta do volume de óleo recolhido durante a destilação no tubo graduado do aparelho Clevenger. O resultado é expresso em mL/100g de amostra seca.

2.2.5 Estabilidade

A curcumina é pouco estável à luz e às condições alcalinas (Coulson, 1980). A influência da luz, oxigênio e diferentes condições de pH na estabilidade dos três maiores constituintes do pigmento da cúrcuma foi avaliada por Price & Buescher (1992). Observaram que, na presença de luz e oxigênio a estabilidade foi maior para curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina, respectivamente. Constataram que, com relação à influência do pH, a bis-demetoxicurcumina foi mais estável em meio alcalino, seguida da demetoxicurcumina e curcumina. Uma maior instabilidade foi verificada na faixa de pH de 9 a 11.

Rusig & Martins (1992) utilizaram soluções aquosas de oleoresina de cúrcuma contendo 1,20 a 1,46mg/mL de curcumina para determinar os efeitos da temperatura, 50°C a 125°C, pH, 2,4 a 7,7 e luz (1220 lux) sobre sua estabilidade. A luz foi o agente mais destrutivo, seguida do pH acima de 7 e temperatura (125°C).

De acordo com Martins (1993), para a oleoresina de cúrcuma e cristais de curcumina estocados a 7°C, a maior estabilidade do pigmento encontra-se entre pH 5 e 7. A uma temperatura de 37°C, a faixa mais estável encontra-se em pH 4 a 6. Ainda de acordo com esse pesquisador, a curcumina purificada mostrou-se mais estável à variação do pH que a oleoresina de cúrcuma.

Nas amostras de cúrcuma procedentes de Minas Gerais, avaliadas por Souza (1993), a curcumina e os pigmentos da oleoresina apresentaram estabilidade na ausência de luz e presença ou ausência de oxigênio. A presença simultânea de luz e oxigênio é a condição mais adversa à estabilidade dos pigmentos curcuminóides. Não houve influência da atividade de água sobre a estabilidade dos pigmentos. Nesse estudo, a curcumina foi o pigmento mais

estável em todas as condições, quando comparada com os outros pigmentos curcuminóides.

Tonnksen & Karlsen (1985) estudaram a degradação hidrolítica da curcumina em solução aquosa, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. O estudo foi realizado com soluções de curcumina em metanol, com valores de pH que variaram de 1 a 11. Um mecanismo de reação envolvendo equilíbrio ácido-base foi proposto. Quando o pH é inferior a um, a curcumina está protonada e apresenta coloração vermelha. A curcumina em pH 1 a 7 apresenta coloração amarela e está predominantemente na forma neutra. Entretanto, nessa faixa de pH, a solubilidade da curcumina é baixa e, após 3 dias de estocagem, observa-se precipitação. Quando o pH é superior a 7,5, a curcumina apresenta coloração vermelho-alaranjada. Com o aumento do pH, a curcumina sofre dissociação do grupamento enol e, posteriormente, dos grupamentos fenol. A curcumina pura não é adequada como agente corante em soluções aquosas de pH superior a 7, a menos que se utilize um agente estabilizante.

De acordo com Wang (1994), observa-se uma boa dissolução do pigmento em solução aquosa de pH 5,0. Entretanto, em pH 4,5 ocorre precipitação do pigmento. Em valores de pH superiores a 7,0 a curcumina é extremamente instável. Uma redução do teor de pigmento da cúrcuma de aproximadamente 33%, após exposição à luz do sol durante 2,5 horas, independentemente do pH, foi verificada por Wang (1994).

Buescher & Yang (1990) avaliaram a estabilidade da oleoresina de cúrcuma em soluções de pickles submetidas ao aquecimento ou expostas à luz, na presença ou ausência de Al^{3+} . Observou-se que o Al^{3+} reduziu a taxa de cúrcuma decomposta pela luz. Após duas horas de exposição à luz, o nível de redução da taxa de decomposição da cúrcuma apresentou uma relação com a concentração

do íon alumínio. Na ausência de Al^{3+} 50% da absorbância inicial (420 nm) foi destruída em 7,5 horas. Entretanto, nenhuma concentração de Al^{3+} inibiu completamente a fotodecomposição.

Buescher & Yang (1990) avaliaram os efeitos do aquecimento sobre a cúrcuma. Observaram que a decomposição do pigmento aumentou em decorrência do aumento da temperatura e tempo de aquecimento. Todavia, a destruição térmica da cúrcuma foi totalmente evitada pela adição de Al^{3+} nas soluções de pickles aquecidas entre 40° a 90°C. A catálise da decomposição da cúrcuma pela peroxidase, juntamente com o peróxido de hidrogênio, foi observada. O íon Al^{3+} reduziu a taxa de decomposição da cúrcuma causada pela peroxidase e essa inibição dependia da concentração do íon. Isoladamente, nem o peróxido de hidrogênio, nem a peroxidase, presentes no meio de reação (solução de pickles), foram capazes de provocar a decomposição da cúrcuma. Foi observado também que a decomposição ou inibição da cúrcuma não foi afetada pelo aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio.

Wang (1994) investigou a influência da adição de solutos como sacarose, amido, NaCl e ZnCl_2 sobre a estabilidade de soluções do pigmento da cúrcuma. Foi observada uma precipitação do pigmento após a adição de íons Al^{3+} e Fe^{3+} . A sacarose, o amido e os íons Na^+ , Cl^- e Zn^{2+} não apresentaram efeitos significativos.

2.2.6 Toxicologia da cúrcuma

A avaliação da segurança dos flavorizantes deve ser semelhante à de outros aditivos. Mas, como a maioria deles ocorre naturalmente nos alimentos e é utilizada em níveis baixos, a sua avaliação deve ser flexível, podendo ou não requerer testes toxicológicos. Estão nessa situação as ervas e temperos, seus derivados e flavorizantes equivalentes, de natureza idêntica, e as substâncias

naturais, obtidas de produtos vegetais e animais normalmente consumidos como alimentos, quer processados ou não, e seus equivalentes sintéticos (Oga, 1996).

Estudos toxicológicos utilizando porcos alimentados com oleoresina da cúrcuma em doses de 296 e 1551mg/kg de peso corpóreo/dia durante 15 semanas foram realizados por Bille et al. (1985). Estes autores observaram que o grupo de animais que recebeu a dose mais alta da oleoresina apresentou redução no ganho de peso e na eficiência de conversão alimentar. Macacos alimentados com 500mg de cúrcuma por quilograma de peso corpóreo por dia, durante 9 meses, não apresentaram efeitos adversos (Bhavanishankar et al., 1986).

Nenhuma toxicidade significativa foi notada em ratos alimentados com 500 mg de cúrcuma por quilograma de peso corpóreo por dia, ou com 60mg de extrato alcoólico de cúrcuma por quilograma de peso corpóreo por dia, durante um ano (Bhavanishankar et al., 1986). Ratos tratados com 250mg de cúrcuma por quilograma de peso corpóreo por dia, durante 60 semanas, também não apresentaram nenhuma toxicidade.

A cúrcuma e a oleoresina de cúrcuma não são genotóxicas e têm sido relatadas como antimutagências (Polasa et al., 1991) e anticarcinogências (Huang et al., 1988). No entanto, Aruna & Sivaramakrishnan (1992) observaram, em experimentos com camundongos alimentados com doses de 160mg/g de cúrcuma, que esta dose não inibe significativamente neoplasias induzidas.

A WHO (1961, 1974 e 1986) publicou especificações para a curcumina como corante para alimentos e recomendações para a IDA (Ingestão diária aceitável) de 0,01 a 0,1mg/kg de peso corpóreo.

Para a cúrcuma em pó, com teor de 3% de curcumina, a IDA é de 2,5mg/kg de peso corpóreo.

2.2.7 Legislação

Em 1939, o Decreto n.º 10.295 do estado de São Paulo regulamentou o uso de substância corante, classificando a cúrcuma como “vegetal inócuo” (Estado de São Paulo, 1939).

A NTA 70 (Norma Técnica de Alimentos) do decreto n.º 12.486 do Estado de São Paulo, de 20/10/78, especifica a cúrcuma como condimento (Estado de São Paulo, 1978).

O Decreto 55.871 – Resolução n.º 04 de 24/11/88 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (Brasil, 1988), regulamenta o uso de aditivos intencionais em alimentos, assim como seus limites máximos. A cúrcuma, além de condimento, é um aditivo intencional pertencente à classe dos corantes naturais, não tem limite máximo de uso como corante natural e seu código de rotulagem é C.I.

As essências naturais e artificiais, os extratos vegetais aromáticos e flavorizantes quimicamente definidos são permitidos por este Decreto.

Considera-se essência natural, óleo volátil ou simplesmente essência, o produto aromático, sávido, volátil, sob a forma oleosa e extraído de vegetais (ABIA, 1996).

2.2.8 Propriedades terapêuticas e antioxidantes

Alguns efeitos benéficos da cúrcuma, como antiinflamatório (Ghatak & Bosu, 1972) e bactericida (Ramprasad & Sirsi, 1957), foram descritos. Segundo Perotti (1975), a curcumina tem influência benéfica em certas afecções hepáticas, estimula a secreção biliar, favorecendo sua emissão no trato intestinal e ajuda a controlar o colesterol no sangue.

Ramaswamy & Boncrjee (citados por Govindarajan, 1980) relatam a ação antioxidante da cúrcuma, considerando-a compatível com a ação antioxidante do BHT, BHA e ácido cítrico.

Unnikrishnan & Rao (1995) estudaram as propriedades antioxidativas da curcumina e de seus três derivados (demetoxicurcumina, bis-demetoxicurcumina e diacetil-curcumina), e demonstraram que essas substâncias promovem a proteção da oxidação da hemoglobina.

Segundo Rimpler et al. (1970), a cúrcuma em níveis de 0,5% a 1,0% reduz consideravelmente a formação de peróxidos em óleo de amendoim, em testes de estabilidade. Estudos mostram que a curcumina é um agente bactericida e protege contra o câncer, inibindo a peroxidação lipídica (Pulla & Lokesh, 1994).

Os efeitos dos extratos aquoso e alcoólico do óleo volátil e dos curcuminóides, isolados da *Curcuma longa* L. na secreção biliar em cães, foram avaliados por Ramprasad & Sirsi (1956). Enquanto o extrato aquoso não demonstrou efeito, o alcoólico aumentou a secreção biliar em 20% a 25%. Os curcuminóides, na forma de sais de sódio, produziram um aumento significativo na secreção biliar em 100% dos cães. Os óleos voláteis também tiveram alguma ação na secreção de bile.

Atividades antimicrobiana e antiprotozoária têm sido demonstradas pelos extratos de cúrcuma e seus componentes. O extrato etanólico de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) inibiu o crescimento da maioria dos organismos em colicistites (Lutomski et al., 1974), enquanto os curcuminóides foram bacteriostáticos contra *Staphylococcus* (Ramprasad & Sirsi, 1956), os óleos essenciais apresentaram atividades bactericida (Lutomski et al., 1974) e fungistática (Sawada et al., 1971).

[REDACTED]

Segundo Dhar et al. (1968), o extrato alcoólico também exibiu atividade antiprotozoária. Em outras publicações, a cúrcuma, em suas várias apresentações, aparece associada à atividade antiparasítica (Araújo et al., 1998; 1999), antibacteriana (Chopra et al., 1941), anti-HIV (Mazumber et al., 1995) e antitumoral (Huang et al., 1998).

2.2.9 Produtos da cúrcuma e suas aplicações

Três produtos básicos de cúrcuma são comercialmente disponíveis:

- **cúrcuma em pó:** raízes secas e moídas de cúrcuma contendo cor e aroma;
- **oleoresina de cúrcuma:** obtida a partir da cúrcuma em pó por extração com solventes, com rendimento de cerca de 12%. É um produto altamente viscoso, marrom-alaranjado, contendo 30% a 40% de curcumina, 15% a 20% de óleo volátil, apresenta aroma fresco de cúrcuma, fresco e pungente com sabor residual amargo. Diluída em níveis de uso, obtém-se uma cor amarelo brilhante;
- **extrato de curcumina purificado:** corante sem aroma e sabor residual, concentrado após extração com diferentes solventes a partir da cúrcuma em pó (Freund et al., 1988; Govindarajan, 1980).

Segundo Viasan et al. (1989), a cúrcuma é muito valorizada pela sua cor amarela, devido aos pigmentos curcuminóides presentes e por seu óleo volátil, rico em turmeronas. A cúrcuma em pó é um constituinte indispensável do *curry* indiano, também utilizado em pasta de mostarda e em condimentos. Nestas aplicações, o aroma é desejável (Govindarajan, 1980).

A oleoresina de cúrcuma é largamente utilizada em pickles, maionese, mostarda, revestimentos de filés de peixe congelado, produtos cárneos, massas

alimentícias, bebidas não alcoólicas, manteiga e queijos. A função é predominantemente colorir o produto (ABEA, 1984; FPCNAS, 1965). Em alguns casos como bebidas, gelatina, queijo, manteiga, sorvetes e produtos de confeitaria, o aroma da cúrcuma é indesejável, sendo preferível utilizar a curcumina purificada (Perotti, 1975).

Andres (1981) apresenta a aplicação da cúrcuma como possível substituto da tartrazina, em níveis de 0,002% a 0,1%. A cúrcuma também é usada em combinação com a páprica em muitos queijos processados, e em produtos à base de gordura. Uma composição contendo mistura de oleoresina de cúrcuma (0,006% a 3% em peso) em oleoresina de páprica (10% a 100% em peso) para colorir margarina, é apresentada em patente americana de 1976 (EUA Pat. 3.940.504), citada por Francis (1986).

As propriedades funcionais desejáveis nas preparações com curcumina são: retenção de cor sem desenvolvimento de sabor residual durante estocagem e uso, tamanho de partículas finas na preparação do *curry* e pasta de mostarda, dispersibilidade e emulsificação da oleoresina e curcumina na preparação de picles, maionese, queijos, etc. (Govindarajan, 1980).

A curcumina é insolúvel em água e, como muitos sistemas de alimentos contém significativa quantidade de água; o pigmento não os colore sem algum tipo de emulsificante. Para uso comercial, a oleoresina de cúrcuma é misturada com um solubilizante como propileno glicol, polisorbato ou óleo vegetal, para se obter um produto homogêneo e fluido (Govindarajan, 1980).

2.3 Coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*

2.3.1 Coliformes totais

Na definição do grupo de coliformes totais estão caracterizados os bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. O grupo inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e de outros animais de sangue quente, como também diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, como *Serratia* e *Aeromonas*, por exemplo. Por isso, sua identificação e enumeração em alimentos e água são consideradas pouco representativas de contaminação fecal, quando comparadas com a enumeração de coliformes fecais ou *Escherichia coli* (Silva et al., 1995).

2.3.2 Coliformes fecais

Apresentam a mesma caracterização de coliformes totais, restringindo-se, porém, às bactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24h, de 44,5° a 45,5°C. Essa definição objetivou, em princípio, selecionar apenas os coliformes originários do trato gastrointestinal. Sabe-se, entretanto, que atualmente o grupo de coliformes fecais inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo que os dois últimos incluem cepas de origem não fecal. Sendo assim, a presença de coliformes fecais em alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração direta de *Escherichia coli*. Porém, é muito mais significativa do que a presença de coliformes totais, dada a alta incidência de *E. coli* dentro do grupo fecal (Silva et al., 1995).

2.3.3 *Escherichia coli*

As bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia* são organismos largamente distribuídos na natureza. Foi isolada pela primeira vez em 1885 e denominada *Bacillus coli* e *Bacterium coli* (Buchanan & Gibbons, 1974) e caracterizada em 1886 (Merchant, 1950).

Os membros da família *Enterobacteriaceae* apresentam-se como bastonetes gram-negativos (0,5 por 1 a 3 μ m), que podem ser móveis, dotados de flagelos peritríquicos ou imóveis. As bactérias crescem bem em meios de cultura artificiais e todas as espécies formam ácido ou ácido e gás, a partir da glicose. Muitas enterobactérias são parasitas de animais e algumas são fitopatogênicas. São encontradas frequentemente como saprófitas em matéria orgânica de plantas em decomposição. A *Escherichia* é um gênero com grande número de linhagens, das quais várias estão associadas à gastroenterite humana, em consequência da sua presença em grande número em alimentos contaminados (Pelczar et al., 1981).

Dentre as bactérias entéricas e de habitat reconhecidamente fecal, dentro da família *Enterobacteriaceae*, a *Escherichia coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais. Todos os demais membros do grupo têm uma associação duvidosa com a contaminação fecal e *E. coli*, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais, é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento (Silva et al., 1995).

Ainda que normalmente seja uma bactéria não patogênica, a *Escherichia coli* é uma das enterobactérias mais frequentemente encontradas nas septicemias, além de ser responsável por 80% de todas as infecções das vias urinárias (Rey, 1999).

Além da deterioração do alimento pela presença de grande número de bactérias *E. coli*, há também o perigo de algumas linhagens dessa bactéria serem enteropatogênicas, estando envolvidas em casos de gastroenterite humana (Mackey et al., 1980).

A *Escherichia coli*, uma bactéria entérica e de habitat reconhecidamente fecal, tem sido apontada, desde 1968, como uma das causas de diarreia no homem, atingindo qualquer faixa etária (Sack, 1975).

Escherichia é atualmente encarado como um gênero possuidor de uma única espécie, na qual existem várias centenas de diferentes tipos antigênicos. Os tipos são caracterizados por diversas combinações de antígenos O (antígenos lipopolissacarídicos somáticos), K (antígenos polissacarídicos capsulares) e H (antígenos protéicos flagelares), dando origem a vários milhares de sorotipos. Sua composição antigênica, extremamente complexa, compreende mais de **170 antígenos O**, **56 antígenos H** e vários **antígenos K**.

A classificação sorológica das *E. coli* isoladas é útil em epidemiologia. Determinados sorotipos estão relacionados com a virulência, mas essa depende da presença de plasmídeos com genes para a produção de exotoxinas ou outros fatores de patogenicidade.

Os isolamentos bacteriológicos de *E. coli* podem ser convenientemente agrupados em três categorias: amostras oportunistas, enteropatogênicas e enteroxigênicas. Os colibacilos *patogênicos* oportunistas são, em geral, inócuos em seu habitat natural, até que alcancem outros locais ou tecidos, podendo causar doenças como, além das já citadas, enterites, meningites, infecções pulmonares, abscessos e infecções da pele e de ferimentos.

2.3.3.1 Enterite causada por *Escherichia coli*

Enterite é um termo geral utilizado para designar qualquer inflamação do intestino delgado (Rey, 1999).

A enterite causada por *Escherichia coli* é qualquer um dos quadros de diarreia aguda, apresentando-se em quatro modalidades:

- a) *Escherichia coli* enterotoxigênica: produz uma exotoxina termolábil (LT), sob controle de um plasmídeo transmissível e é formada de duas subunidades, A e B. A subunidade B liga-se a um gangliosídeo da membrana das células epiteliais do intestino delgado e permite que a subunidade A penetre nas células, ativando a adenilato-ciclase. Isto causa aumento considerável de AMPc, ou adenosina-monofosfato cíclico, que determina hipersecreção do epitélio, com grande eliminação de água e cloretos, e reduz a reabsorção de Na. O intestino distendido pelo líquido apresenta hipermotilidade e diarreia. A exotoxina é antigênica e desenvolve imunidade que confere certa proteção aos pacientes das áreas endêmicas. Outras duas toxinas termoestáveis (ST) são produzidas pelas mesmas cepas de *E. coli* ou por outras (também codificadas por plasmídios) e ativam a guanilato-ciclase do epitélio entérico, com estimulação conseqüente da produção de líquidos para a luz intestinal. O período de incubação é de 1 a 2 dias e o quadro clínico dura de 3 a 4 dias, com diarreia aquosa, cólicas, náuseas, vômitos e febre baixa. A *Escherichia coli* enterotoxigênica apresenta distribuição universal e é, provavelmente, o agente mais comum das diarreias infantis do mundo em desenvolvimento, bem como o microrganismo mais freqüentemente associado à diarreia dos viajantes (Tonelli, 1987). Crianças de até dois anos de idade parecem mais susceptíveis à infecção, sendo envolvidos os sorotipos O 6, 15 e 78. Além dos sorotipos enterotoxigênicos da *Escherichia coli*, o *Vibrio cholerae*

produz as mesmas manifestações clínicas, o que provoca transtornos no diagnóstico correto entre desintéria bacilar ou cólera;

- b) *Escherichia coli* enteroinvasiva é a que invade e destrói a mucosa do intestino grosso, contando, para isso, com um fator de colonização que é codificado pelos mesmos plasmídios que transportam os genes de toxicidade. O quadro é desintérico, com fezes sanguinolentas.

A *Escherichia coli* enteroinvasora tem sido associada a surtos epidêmicos e a episódios esporádicos de diarreia. Acomete crianças e adultos, mas raramente lactentes (Tonelli, 1987);

- c) *Escherichia coli* enteropatogênica atua sobre o intestino delgado, sendo responsável por diarreias da infância nas regiões mais pobres. Bactérias com sorotipos desse grupo aderem por suas fimbrias (pili) às células epiteliais e destroem as microvilosidades adjacentes. Esse caráter é também dependente de plasmídios encontrados em certas enterobactérias. A diarreia é acompanhada de febre, náuseas, vômitos, mas sem apresentar sangue nas fezes.

Os colibacilos enteropatogênicos clássicos são mais comumente isolados de crianças diarreicas, com idade inferior a dois anos, especialmente na faixa de 0 a seis meses. São raros os relatos de surtos em populações adultas. Quando ocorrem, estão associados à contaminação de água e alimentos (Tonelli, 1987).

O maior número de surtos diarreicos no homem, devido a *E. coli* enteropatogênica, é causado por 12 a 15 sorotipos diferentes. Esses são distintamente diferentes dos sorotipos oportunistas e são naturalmente virulentos para o homem.

d) *Escherichia coli* entero-hemorrágica produz uma toxina denominada verotoxina e é responsável por uma colite hemorrágica, com fortes dores abdominais e febre baixa ou ausente.

2.4 Queijo ricota

Originário da região Mediterrânea e Sul da Itália, ricota é o nome usado para o produto obtido pela precipitação de proteínas por aquecimento e acidificação. A matéria-prima para a sua fabricação são o soro de queijo, leite fresco ou acidificado, ou a mistura desses (CETEC, 1985; Modler, 1989). É também conhecida por queijo de albumina, por se constituir basicamente desta e de lactoglobulina, que são os principais componentes protéicos do soro e não são coaguláveis por coalho. São proteínas facilmente desnaturadas e precipitadas pelo calor, sob influência de acidificação. Às vezes é comercializada somente após o processo de defumação (ricota defumada) ou de condimentação (ricota condimentada) (Furtado & J. Neto, 1994). Pode ser prensada ou cremosa, comercializada em potes, podendo também, nesses casos, ser condimentada.

A ricota, pelo seu baixo teor de gordura e alta digestibilidade, é considerada um produto leve, recomendado para regimes especiais, constituindo-se uma base importante para a arte culinária. No mercado pode ser encontrada ainda uma ricota *culinária*, em cujo processo de fabricação emprega-se creme de leite para torná-la mais cremosa (Furtado & J. Neto, 1994).

De acordo com a Portaria n.º 526 do Ministério da Agricultura (Brasil, 1997), define-se ricota como um produto obtido da albumina do soro de leite, adicionado de leite até 20% do seu volume, e que pode ser consumido fresco ou defumado por 10 a 15 dias. Segundo a Portaria n.º 146 do Ministério da Agricultura (Brasil, 1996), a ricota pode ser classificada como um produto magro (10% a 25% de gordura) e de alta umidade (não inferior a 55%).

O rendimento médio de fabricação da ricota é de cerca de 4% a 5% do volume de soro trabalhado, sendo um produto de pouca durabilidade, devido ao seu alto valor nutritivo (Vieira et al., 1985), e suas condições de umidade (Madrid, 1979).

Segundo Furtado & J. Neto (1994) alguns pontos críticos são observados na fabricação de ricota:

- a quantidade de ácido a adicionar pode variar em função de acidez e pH do soro, temperatura e intensidade de agitação;
- o emprego de vapor direto no aquecimento do soro. A oclusão de ar nos flocos formados pela desnaturação protéica facilita a formação da camada de ricota à superfície do soro. Esta oclusão é influenciada pelo borbulhar do vapor no fundo do tanque;
- o pH final é crítico, por afetar a propriedade da ricota de flocular à superfície ou precipitar para o fundo do tanque. Este pH pode variar de um processo para outro e deve ser determinado, na prática. Está diretamente relacionado ao tipo e quantidade de ácido empregado.

2.4.1 Presença de *Escherichia coli* em queijos

O leite é um dos alimentos mais susceptíveis ao desenvolvimento de microrganismos, principalmente bactérias, dada a disponibilidade de nutrientes e atividade de água.

Todos os tipos de queijo estão sujeitos à atividade de microrganismos deterioradores que causam alterações nas características químicas, físicas e organolépticas. Além disso, microrganismos patogênicos podem estar presentes nos queijos como consequência do emprego de leite, de equipamentos, utensílios

ou manipuladores contaminados, em razão da não observância de práticas efetivas de higiene (Olson & Mocquot (1980) citados por Salvio, 1993).

Johnson et al. (1990), citados por Salvio (1993), consideraram a *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogências como patógenos de alto risco, por serem capazes de sobreviver e crescer em determinados tipos de queijos. Segundo os mesmos autores a causa mais freqüente de surtos de toxinfecção envolvendo queijos, ocorridos nos Estados Unidos e Canadá, foi o emprego de leite contaminado após a pasteurização.

A presença de *S. aureus* e de coliformes fecais em 20,3% e 63,9%, respectivamente, das amostras de queijo Minas frescal adquiridos na cidade de Lavras, MG, foi detectada por Carvalho et al. (1981), que concluíram que o nível de contaminação encontrava-se acima dos padrões permitidos pela legislação vigente. Estes mesmos autores, citados por Salvio (1993), constataram que 97,5% das amostras de queijo Minas de fabricação artesanal comercializados na cidade de Viçosa, MG, estavam fora dos limites legais para a presença de *S. aureus* e de coliformes fecais.

Em vários países do mundo, a presença de *Escherichia coli* e de estirpes enteropatogências de *E. coli* têm sido pesquisadas em diferentes tipos de queijos. A presença desse patógeno em queijos pode indicar uma pasteurização inadequada ou uma contaminação pós-pasteurização por equipamentos, ingredientes ou por manipuladores (Salvio, 1993).

De 106 amostras de queijos moles e semi-duros analisadas, foram encontrados mais de 10^4 coliformes fecais/g, embora sorogrupos de *E. coli* enteropatogênica não tenham sido detectados. A dose infectiva de *E. coli* enteropatogênica varia de 10^6 UFC a 10^{10} UFC (Frank & Marth, 1978; D'Aoust, 1989; citados por Salvio, 1993).

2.4.2 Método de avaliação de uma população de *Escherichia coli*

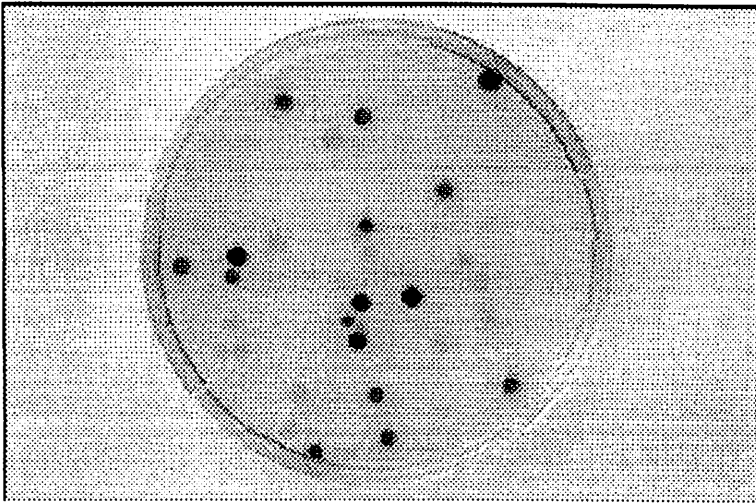
Alguns substratos fluorescentes têm sido empregados em meios de cultura de uso em microbiologia de alimentos, com a finalidade de isolar determinados microrganismos que possuem enzimas capazes de reagir com esses substratos, gerando compostos que podem ser detectados por luz ultravioleta. São empregados de várias formas nos meios de cultura em placa, nos caldos para determinação do NMP e nos métodos de filtração de membranas. O substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronido (MUG) é o substrato fluorogênico mais utilizado e é hidrolisado pela enzima β -D-glucoronidase (GUD), que libera a metade fluorescente 4-metil-umbeliferil, que é detectada com luz ultravioleta de comprimento de onda longo. A *Escherichia coli* é a bactéria que mais produz a enzima β -D-glucoronidase (GUD), sendo a incorporação do substrato em meios de cultura diferenciais para tal bactéria de grande valor para sua detecção. São necessárias aproximadamente 10^7 células para se ter uma quantidade suficiente da enzima para detecção de resultados. Por isso, o tempo necessário para a obtenção de resultados depende do número inicial de células. Em geral, as reações positivas se dão em torno de 4 horas, mas algumas cepas debilmente GUD positivas podem levar até 16 horas para serem detectadas. O substrato MUG pode ser utilizado em métodos de cultivo em placa e de filtração em membrana, para detecção e contagem de *Escherichia coli* (Colen, 1997).

Um método para se obter rapidamente os resultados, com detecção simultânea de *Escherichia coli* e coliformes totais, é a utilização do meio de cultura cromogênico (MERCK, 2000). Após a incubação a 37°C, os resultados são lidos em 24 horas e a combinação de dois substratos cromogênicos (Salmon-GAL e X-glucoronideo) possibilita a detecção de coliformes totais, e *E. coli*, em uma mesma placa. As colônias são diferenciadas pela cor (Figura 2). Para

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade dos Queijos – Portaria n.º 146, do Ministério da Agricultura, os queijos são classificados de acordo com o conteúdo de umidade em percentagem (Lerayer et al., 1998). Conforme essa classificação, a ricota é considerada “queijo de mais alta umidade sem bactérias láicas em forma viável e abundantes (Umidade > 55%)”.

2.4.3 Legislação referente aos requisitos microbiológicos de queijos

FIGURA 2. Meio de cultura hromocult ágar para identificação simultânea de coliformes totais e *E. coli* – 2000 Merck, Germany.



coliformes totais a coloração observada é vermelho-salmão e para *Escherichia coli*, colônias azuis-escuras ou violetas (MERCCK, 2000). O meio de cultura Chromocult Coliform Agar é aprovado e certificado pelo USEPA (United States Environmental Protection Agency).

Na Tabela 1 encontram-se os requisitos microbiológicos para a ricota, considerando o seu percentual de umidade.

TABELA 1. Requisitos microbiológicos para queijos de mais alta umidade sem bactérias lácticas em forma viável e abundante (Umidade > 55%)

Microrganismos	CrITÉRIOS de AceitaÇÃO	Categoria ICMSF
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=2 m=100 M=1.000	5
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2 m=50 M=500	5
Estafilococos coag. pos./g	n=5 c=1 m=100 M=500	8
Fungos e Leveduras/g	n=5 c=2 m=500 M=5.000	2
<i>Salmonella sp</i> /25g	n=5 c=0 m=0	10
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g	n=5 c=0 m=0	10

Fonte: Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais, *diet, light* e *enriquecidos*, Lerayer et al. (1998), SP.

Os requisitos microbiológicos definidos nessa norma foram estabelecidos de acordo com critérios e planos de amostragem para aceitação de lotes da Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas dos Alimentos (ICMSF).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Usina Piloto de Laticínios da Escola Agrotécnica Federal de Inconfidentes (EAFI), MG e no laboratório de Laticínios do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG.

3.1 Matéria-prima

O soro para fabricação da ricota foi proveniente da fabricação de queijo Minas frescal, produzido na usina piloto da EAFI, Inconfidentes, MG.

O pó de cúrcuma, com teor de curcumina na ordem de 4,16%, foi doado pela Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás.

O solvente utilizado no preparo do extrato alcoólico foi o etanol, de uso comercial, a 92,8° GL.

Os microrganismos usados para inoculação na ricota, padrão ATCC, na forma reativada, foram adquiridos na Fundação Tropical André Tozello, em Campinas, São Paulo. As linhagens adquiridas foram a *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048).

Os meios de cultura utilizados foram o Chromocult Coliform ágar e Caldo Nutritivo, marca MERCK, representada no Brasil pela empresa MERSE, com sede em Campinas, São Paulo.

3.2 Caracterização do material

3.2.1 Determinação da curcumina no pó de cúrcuma

A determinação do teor de curcumina da cúrcuma foi realizado segundo método de ensaio da NBR 13624 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 1996.

3.2.2 Preparação do extrato alcoólico de cúrcuma

O extrato alcoólico de cúrcuma foi preparado utilizando-se 100g de pó de cúrcuma para 600 mL de etanol. O pó foi misturado ao etanol e deixado em repouso por 24 horas, quando foi, então, filtrado em papel de filtro. O pó foi descartado e utilizou-se o filtrado.

O extrato alcoólico de cúrcuma foi submetido a teste de esterilidade e demonstrou ausência de microrganismos capazes de formar colônias em ágar, durante 48 horas de incubação a temperaturas de 37° a 50°C.

3.2.3 Fabricação da ricota

Todos os queijos foram fabricados segundo técnica desenvolvida na usina da Escola Agrotécnica Federal de Inconfidentes, MG, apresentada no fluxograma da Figura 3.

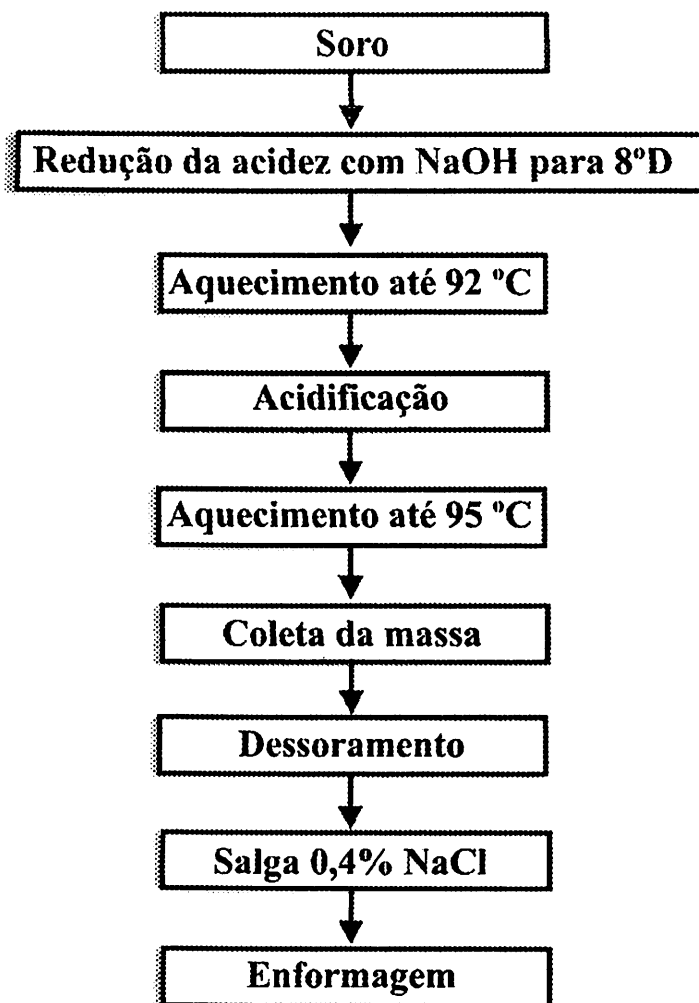


FIGURA 3. Fluxograma de fabricação da ricota.

O soro fresco proveniente da fabricação de queijo Minas frescal foi quantificado e colocado em um tanque, que permitia o aquecimento com vapor direto, onde, então, foi reduzida a acidez original (situada em torno de 14°D) para 8°D, utilizando-se NaOH.

O aquecimento com vapor direto foi feito até atingir a temperatura de 92°C, sendo aí iniciada a acidificação, utilizando-se uma solução contendo 100mL de ácido láctico a 85% para cada 100 litros de soro, diluído em volume de água 10 vezes superior.

O aquecimento foi interrompido próximo de 95°C, aguardando-se o tempo necessário até que a massa estivesse formada na superfície do soro, procedendo-se a seguir à coleta com dessoradores.

A massa foi depositada em um recipiente esterilizado e levada para resfriar em câmara de fluxo laminar sendo, em seguida, armazenada a 5°C para posterior utilização.

3.3 Desenho experimental

O experimento foi realizado em esquema fatorial 5 x 5 x 3, sendo cinco concentrações do extrato alcoólico de cúrcuma, incluindo o controle, cinco períodos de estocagem e três repetições.

As embalagens das amostras foram esterilizadas e, em cada uma, adicionaram-se 25g da ricota resfriada a 5°C, 0,4% de NaCl e o extrato alcoólico de cúrcuma, nas concentrações de 0,0%, 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%, procedendo-se a agitação para que os componentes se misturassem. Após a inoculação, os potes foram fechados e encaminhados à câmara fria e mantidos a 5°C durante 21 dias.

Amostras foram coletadas para análises nos dias D, D+1, D+7, D+14 e D+21, considerando D o dia da fabricação, conforme a Figura 4.

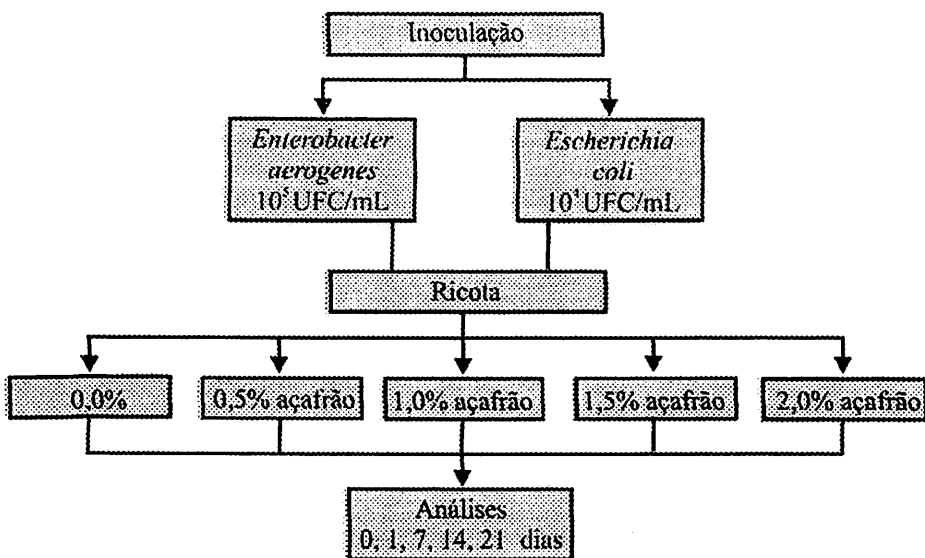


FIGURA 4. Tratamentos aplicados e análises realizadas

3.4 Inoculação

3.4.1 Preparo do inóculo

Foi retirado do tubo *slant* uma alçada de cada cultura ativa de *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli* e colocada em um tubo de ensaio de 5 mL, contendo caldo infusão de cérebro e coração.

As culturas foram incubadas e, a partir de 30 minutos até 2 horas, foi realizado o plaqueamento em 4 diluições a cada intervalo de 30 minutos para determinação da concentração das células. A determinação da concentração das células de *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli* em BHI foi realizada de forma simultânea por contagem em placas (pour-plate), utilizando-se o meio de cultura Chromocult Coliform agar (Merck) com incubação a 37°C, por 24 horas.

Para a inoculação, a cultura era preparada da seguinte forma: retirava-se o inóculo de seu recipiente com uma alça de platina esterilizada que, em seguida, era mergulhada em um tubo de ensaio contendo 10 mL de BHI. O tubo contendo o inóculo era colocado em banho-maria por meia hora a 37°C, para que ocorresse a ativação da bactéria. Decorrido esse período, o inóculo era distribuído nas embalagens contendo a ricota e demais ingredientes.

A inoculação foi feita imediatamente após a condimentação e mistura da ricota com o extrato alcoólico de cúrcuma, nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%, sempre com 0,4% de NaCl. Também foi inoculada uma das amostras sem o extrato alcoólico de cúrcuma, que foi denominado controle.

3.4.2 Inoculação da ricota com *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*

A inoculação de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* na ricota foi na ordem de 10^4 UFC/mL e 10^5 UFC/mL, respectivamente. Esta concentração foi obtida a partir da incubação das duas culturas por 30 minutos a 37°C.

3.5 Análises físico-químicas do soro e da ricota

No soro utilizado em cada fabricação foram realizadas as seguintes análises:

a) pH

O pH foi determinado a 25°C utilizando-se pHmetro previamente calibrado, marca DIGIMED.

b) Acidez titulável

A acidez titulável (°D) foi determinada utilizando-se acidímetro Dornic, com solução de NaOH N/9 e solução alcoólica de fenolftalcína como indicador, como descrito por Brasil (1996).

c) Gordura

A determinação do teor de gordura foi realizada pelo método butirométrico de Gerber, utilizando butirômetro e centrífuga de Gerger, segundo Brasil (1996).

A ricota foi analisada no dia da fabricação em todas as repetições.

a) Teor de umidade

Para determinação do teor de umidade, foi feita secagem em estufa a 65°C, segundo técnica da A.O.A.C. (1980).

b) pH

O pH foi determinado a 25°C, utilizando-se pHmetro previamente calibrado, marca DIGIMED.

c) Gordura

A determinação do teor de gordura foi realizada pelo método butirométrico de Gerber, segundo metodologia da A.O.A.C. (1995), utilizando-se centrífuga e butirômetro de Gerber.

3.6 Análises microbiológicas da ricota

Todas as análises microbiológicas foram realizadas em duplicatas.

A contagem em placas (pour-plate), com identificação simultânea de *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*, foram feitas utilizando-se o meio de cultura Chromocult Coliform ágar com incubação a 37°C, por 24 horas (MERCK, 2000). Neste método, as colônias são diferenciadas pela cor. Para *Enterobacter aerogenes*, a coloração observada é vermelho-salmão e para *Escherichia coli*, colônias azuis-escuras ou violetas.

O preparo do meio foi feito de acordo com a orientação do fabricante, MERCK, e consistiu da adição de 7,95g de Chromocult Coliform agar a cada 300 mL de água peptonada, agitando bem para que ele se dissolvesse por completo. A embalagem foi fechada e levada ao auto-clave por 40 minutos, a uma temperatura de 90°C em vapor fluente, sendo então resfriada a 45°C e colocada em banho-maria nessa mesma temperatura até posterior utilização.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação das populações de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, apresentada nas Tabelas 2 e 3, demonstram que foram inoculados, em média, nos três lotes de ricota, $8,2.10^4$ UFC/mL de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e $9,6.10^5$ UFC/mL de *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), respectivamente, no dia da fabricação, ou D.

TABELA 2. Contagem média de *Escherichia coli* na ricota tratada com extrato alcoólico de cúrcuma nas concentrações de 0,0 a 2,0%

Tratamento (% Cúrcuma)	Armazenamento (dias)				
	D	D+1	D+7	D+14	D+21
0,0 %	$8,2.10^4$	$5,8.10^5$	$1,4.10^4$	$9,9.10^3$	$2,4.10^3$
0,5 %	$8,2.10^4$	$6,4.10^4$	$1,6.10^4$	$3,6.10^3$	$4,6.10^2$
1,0 %	$8,2.10^4$	$3,8.10^4$	$1,6.10^4$	$4,5.10^3$	$8,8.10^2$
1,5 %	$8,2.10^4$	$1,6.10^4$	$3,8.10^4$	$2,0.10^2$	$4,7.10^2$
2,0 %	$8,2.10^4$	$1,1.10^4$	$4,4.10^4$	$6,3.10^2$	$1,8.10^2$

U.F.C. – Contagem de unidades formadoras de colônias

TABELA 3. Contagem média de *Enterobacter aerogenes* na ricota tratada com extrato alcoólico de cúrcuma nas concentrações de 0,0 a 2,0%

Tratamento (% Cúrcuma)	Armazenamento (dias)				
	D	D+1	D+7	D+14	D+21
0,0 %	$9,6.10^5$	$1,2.10^6$	$5,3.10^6$	$1,2.10^5$	$3,2.10^5$
0,5 %	$9,6.10^5$	$6,0.10^5$	$4,6.10^5$	$8,2.10^4$	$8,0.10^{3*}$
1,0 %	$9,6.10^5$	$4,6.10^5$	$1,0.10^5$	$6,4.10^4$	$2,5.10^4$
1,5 %	$9,6.10^5$	$5,4.10^5$	$1,5.10^5$	$7,2.10^4$	$3,9.10^4$
2,0 %	$9,6.10^5$	$3,9.10^5$	$6,3.10^4$	$5,0.10^4$	$4,7.10^4$

U.F.C. – Contagem de unidades formadoras de colônias

População estimada

Os resultados mostraram, após 21 dias, uma redução do número de células de *Escherichia coli* de, aproximadamente, dois ciclos logarítmicos, nos tratamentos utilizados de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% de cúrcuma.

Já para *Enterobacter aerogenes* a redução foi menor, de um ciclo logarítmico, de 10^5 UFC/mL para 10^4 UFC/mL, também nos tratamentos utilizados de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% de cúrcuma.

Parece não ter havido diferença entre os tratamentos aplicados aos microrganismos, de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% do extrato alcoólico de cúrcuma, apesar dos valores mais altos apresentarem, em alguns períodos avaliados, um melhor resultado.

Apesar dos resultados evidenciarem uma redução do número de células viáveis dos microrganismos avaliados, a cúrcuma não deverá ser o único meio preservativo, considerando uma contaminação inicial de 10^4 UFC/mL de *Escherichia coli* e 10^5 UFC/mL de *Enterobacter aerogenes*, pois não atenderia à

legislação vigente quanto aos requisitos microbiológicos para queijos (Lerayer et al., 1998).

4.1 Análises de *Enterobacter aerogenes* na ricota tratada com extrato alcoólico de cúrcuma

Após 21 dias de tratamento, ocorreu uma redução do número de células de *Enterobacter aerogenes* de um ciclo logaritmico, se comparado ao controle do dia da fabricação, quando o número de células viáveis era de, aproximadamente, $9,6 \cdot 10^5$ U.F.C./mL. Nesse período, o número de células viáveis foi reduzido a valores aproximados de 10^4 , nos tratamentos aplicados de 0,5%, 1,0%, 1,5%, e 2,0% do extrato alcoólico de cúrcuma.

De acordo com Shelef (1983), as concentrações de condimento utilizadas com a finalidade de inibir o crescimento bacteriano variam de 1,0% a 5,0%.

Conforme resultados apresentados na Figura 5, em nenhum dos dias avaliados o número *Enterobacter aerogenes* na ricota tratada com extrato alcoólico de cúrcuma, em nenhuma concentração, foi superior ao controle do dia da fabricação ou ao controle de cada dia avaliado.

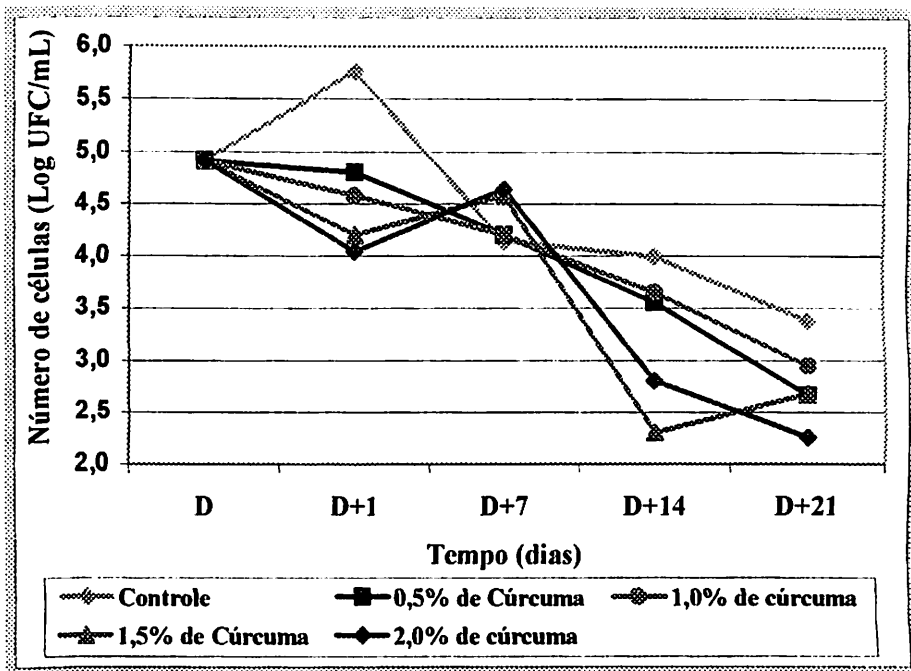


FIGURA 6. Contagens médias (Log UFC/mL) de *Escherichia coli* em ricota tratada com extrato alcoólico de cúrcuma nas concentrações de 0,0% a 2,0%.

Visualmente, parece que as bactérias ainda não estavam na fase exponencial de multiplicação quando foram inoculadas, e sim na fase de adaptação. Nas amostras tratadas, foram mais rapidamente inibidas, quando comparadas ao controle.

Conforme ainda resultados apresentados na Figura 6, a exceção de D+7, em nenhum outro dia avaliado a contagem de *Escherichia coli*, em ricota tratada com extrato alcoólico de cúrcuma, superou o controle do dia da fabricação, ou ao controle de cada dia avaliado.

metabólitos decorrentes do próprio metabolismo dos coliformes concorreriam para essa redução. Os coliformes fermentam a lactose com produção de ácidos.

4.2 Análises de *Escherichia coli* na ricota tratada com extrato alcoólico de cúrcuma

Após 21 dias de tratamento, ocorreu uma redução do número de *Escherichia coli* de, aproximadamente, dois ciclos logarítmicos, se comparado ao controle do dia da fabricação, quando o número de células viáveis foi de, em média, $8,2 \cdot 10^4$ U.F.C./mL. Nesse período, o número de células viáveis foi reduzido a valores de 10^2 , nos tratamentos aplicados de 0,5%, 1,0%, 1,5%, e 2,0% do extrato alcoólico de cúrcuma, sendo que no controle o decréscimo foi de um ciclo logarítmico.

Conforme resultados apresentados na Figura 6, um ligeiro incremento do número de células viáveis de *Escherichia coli*, quando comparado ao controle, de D+1 para D+7, principalmente considerando os tratamentos mais altos aplicados de 1,5% e 2,0% do extrato alcoólico de cúrcuma, poderia ser atribuído a uma maior disponibilidade de nutrientes inicialmente. Isso porque a cúrcuma também contém nutrientes que poderiam servir de substrato para a bactéria. Com os tratamentos aplicados de 0,5% e 1,0% de cúrcuma de D+1 para D+7, o controle do número de *Escherichia coli* foi mantido, seguindo essa tendência de queda até D+21.

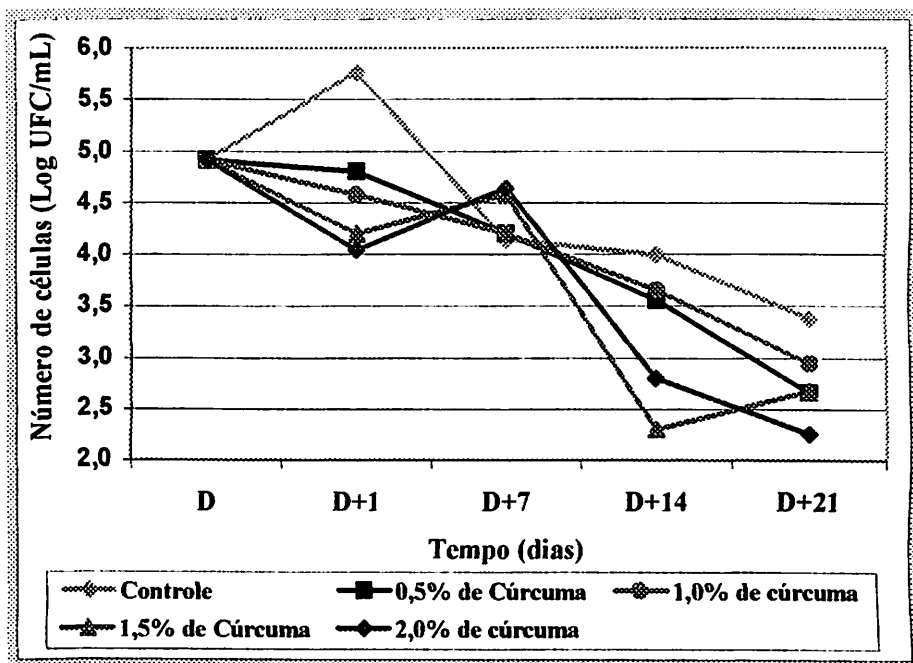


FIGURA 6. Contagens médias (Log UFC/mL) de *Escherichia coli* em ricota tratada com extrato alcoólico de cúrcuma nas concentrações de 0,0% a 2,0%.

Visualmente, parece que as bactérias ainda não estavam na fase exponencial de multiplicação quando foram inoculadas, e sim na fase de adaptação. Nas amostras tratadas, foram mais rapidamente inibidas, quando comparadas ao controle.

Conforme ainda resultados apresentados na Figura 6, a exceção de D+7, em nenhum outro dia avaliado a contagem de *Escherichia coli*, em ricota tratada com extrato alcoólico de cúrcuma, superou o controle do dia da fabricação, ou ao controle de cada dia avaliado.

4.3 Análises físico-químicas do soro

As análises do soro foram realizadas no dia da fabricação da ricota.

A acidez titulável (% de ácido láctico) foi de 12°D, o pH foi de 6,4 e o percentual de gordura foi, em média, de 1,2%.

O pH mais baixo, de 5,4, observado nas ricotas, pode ser atribuído ao acréscimo da NaOH no processamento, com a finalidade de reduzir esse, já que o princípio de fabricação das ricotas é o de acidificação seguida de precipitação.

4.4 Análises físico-químicas da ricota

As análises da ricota foram realizadas no dia da fabricação dos queijos. Foram realizadas análises de pH, umidade e gordura.

O percentual de umidade das ricotas foi, em média, de 73%, o pH médio observado foi de 5,4 e o percentual de gordura esteve na faixa de 3,0%.

Segundo Furtado & J. Neto (1994), a composição média esperada de umidade da ricota é de 70% a 73%, o percentual de gordura de 4% a 6% e o pH médio observado está entre 4,9 e 5,3.

A composição média de sólidos esperada da ricota de leite de vaca é de 4,32% de gordura, 3,93% de lactose, 14,99% de proteína e 2,02% de minerais (Marchisio et al., 1999).

4.5 Legislação referente aos requisitos microbiológicos de queijos

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade dos Queijos – Portaria n.º146, do Ministério da Agricultura, os queijos são classificados de acordo com o conteúdo de umidade em percentagem (Lerayer et al., 1998).

Conforme essa classificação, a ricota é considerada “queijo de mais alta umidade sem bactérias lácticas em forma viável e abundantes (Umidade > 55%)”.

Nenhuma das amostras de ricota, independente do tipo de tratamento e dia de análise estavam dentro dos padrões preconizados pelo Ministério da Agricultura, para contagem de coliformes totais (*Enterobacter aerogenes*) e para *Escherichia coli*.

De acordo com o regulamento, os critérios de aceitação para coliformes totais são duas amostras com valores entre 100 e 1000 coliformes/g e os valores mínimos encontrados foram da ordem de 10^4 . Para *Escherichia coli*, em duas amostras, os valores devem estar entre 50 e 500 coliformes/g e os valores mínimos encontrados foram da ordem de 10^2 .

5 CONCLUSÕES

O extrato alcoólico de cúrcuma nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%, possui a propriedade de reduzir o número de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* inoculadas na ricota.

A combinação do uso da cúrcuma como aditivo natural na redução de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* em ricota, associada a outras técnicas com a finalidade de conservação de alimentos, é recomendada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHEIROS DE ALIMENTOS REGIONAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Aplicação tecnológica de aditivos e nutrientes em alimentos.** São Paulo, 1984. 111 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS. **Compêndio da legislação de alimentos;** consolidação das normas e padrões da alimentos. Rio de Janeiro, 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13624 – Cúrcuma – Determinação do teor de curcumina – Método de ensaio.** Maio, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** Cap. 30. Spices and others condiments, p. 497-505. Washington, 1980. 1018p.

ANDRES, C. Natural food colors/blends in expanded range of hues. **Food Proc.** v.42, n.12, p.52, 1981.

ARAÚJO, C. A. C. et al. *Leishmania amazonensis*: in vivo experiments with diarylheptanoids from Leguminosac and Zingiberaceac plants. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, 306, 1998. Suppl II

ARAÚJO, C. A. C. et al. Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivates against *Leishmania amazonensis*. **Mem. Institut. Oswaldo Cruz**, 94, p.791-794, 1999.

ARUNA, K.; SIVARAMAKRISHNAN, V. M. Anticarcinogenic effects of some indian plant products. **Food Chemistry Toxicology**, v. 30, n.11, p. 953-956, 1992.

AMERICAN SPICE TRADE ASSOCIATION. **Official analytical methods.** New York, 1968. 53p. (Color Power of Turmeric, method 18).

- BAREL, S.; YASHPHE, J. Effect of the essential Oil from *Achillea fragrantissima* on *Escherichia coli* Cells . **Current Microbiol.**, v. 19, p. 337-341, 1989.
- BENJILALI, B. et al. Method to study antimicrobial effects of essential oils : application to the antifungal activity of six moroccan essences . **Journal Food Protect**, v.47, p. 748-752, 1984.
- BHAVANISHANKAR, T. N. et al. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa* L.) – long term toxicity studies in albinos rats and monkeys. **Journal Food Science Technol.**, Mysore, v.23, p.287-290, 1986.
- BILLE, N. et al. Subchronic oral toxicity of turmeric oleoresin in pigs. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.23, n.11, p.967-973, 1985.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Decreto nº 55.871 de 1965. Resolução nº 4 de 24 de novembro de 1988**, do Conselho Nacional de Saúde. Regulamenta o uso de aditivos intencionais em alimentos.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo.** Brasília, DF, 15 ago. 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 526, de 19 de setembro de 1997. Estabelece normas para a fabricação, emprego e registro de queijos e outros alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo.** Brasília, DF, 20 out. 1997. Seção I.
- BUCHANAN, R. E.; R. E. GIBBONS, (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8th.ed. Balimore: Willians e Wilkins, 1974. 1268 p.
- BUCHANAN, R. L.; SHEPHERD, A . J . Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by thimol . **Journal Food Science**, v.46, p.976-977, 1981.
- BUESCHER, R.; YANG, L. Aluminum stabilizes turmeric in pickle brine against decomposition by light, heat and peroxidase. **Journal Food Biochem.** v.14, p.263- 271, 1990.

BULLERMAN , L. B. Inhibition of aflatoxin production by Cinnamon .
Journal Food Science, v.39, p.1163-1165, 1974.

CHOPRA, R. N.; GUPTA, J. C.; CHOPRA, G. S. Pharmacological action of the essential oil of *Curcuma longa*. **Indian Journal Med. Res.** v.29: 769-772, 1941.

CHUNG, 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**, v. 69, p.498-503, 1990.

COLEN, G. Coletânea sobre a qualidade microbiológica de alimentos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Belo Horizonte/Faculdade de Farmácia. 1997. 82p.

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

CORREA , M. P. Açafroeira. In: _____. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1975. v.1, p.21-22.

COULSON, J. Miscellaneous naturally occurring colouring materials for foodstuffs. In: WAFORD, J. **Developments in food colours-1** . London: Applied Science, 1980.

DEANS , S.G.; RITCHIE , G . Antibacterial properties of plant essential oils . **Int. Journal Food Microbiology**, v.5, p.165-180, 1987.

DEANS , S.G.; SVOBODA , K.P. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum marjorana* L .) Volatile oil . **Flavor and Fragrance J.** , 5:187 – 190. 1990.

DHAR, M. L. et al. C. Screening of indian plants for biological activity I. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Dehli, v.6, p. 232-240, 1968.

DONALISIO, M.G. Instruções para o cultivo de cúrcuma. **O Agrônomo**, Campinas, v.32, p.171-175, 1980.

ESSENTIAL OIL ASSOCIATION OF AMERICA. **Specification for oleoresin turmeric**. New York, 1967. n.271.

ESTADO DE SÃO PAULO. **Decreto nº 10.295 de 1939**. Regulamenta o uso de substâncias corantes.

ESTADO DE SÃO PAULO. Norma Técnica de Alimentos nº 70. **Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978**. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.

FARAG, 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**. v.54, p.74-76, 1989.

FILHO, A. B. C. **Época e densidade de plantio sobre a fenologia e o rendimento da cúrcuma (*Curcuma longa* L.)**. 1996. P.01. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FOOD PROTECTION COMMITTEE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES **Chemicals used in food processing**. Washington, D. C., 1965. 294p. (Publication 1274).

FRANCIS, F. J. **Handbook of food colorants patents**. New York: Food & Nutrition, 1986. 181p.

FRAZIER, W. C.. **Food microbiology**. 2.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1967, 537 p.

FREUND, R. P.; WASHAW, J. C.; MAGGION, M. Natural color for use in foods. **Cereal Foods World**, St. Paul, v.33, n. 7, p. 553-556, 1988.

FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS/CETEC. **Manual para a fabricação de laticínios**. Belo Horizonte, 1985. v. 1. (Série de Publicações Técnicas, 014).

FURTADO M. M.; NETO J.. **Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo, 1994.

GHATAK, G. ; BOSU, N. Sodium curcumin as an effective anti-inflammatory agent. **Indian Journal Exper. Biol.** 10, p. 235-239, 1972.

GOVINDARAJAN, V. S. Turmeric – chemistry, technology and quality. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nut.**, 12, n.3, p.199-301,1980.

GUENTER, E. **The essential oils**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1952. v.5, 507p.

HALLAGAN, J. B.; ALLEN, D. C.; BORZELLECA, J. F. The safety and regulatory status of food, drug and cosmetics colour additives exempt from certification. **Food Chem. Toxicol** , Washington, v.33, n.6, p.515-528, 1995.

HITOKOTO , H. et al. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi . **Appl. and Environm. Microbiol**, v.39, p. 818-822, 1980.

HUANG, M. T. et al. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. **Cancer Research**, v. 48, p. 5941-5946, 1998.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms for foods**. 2.ed. Toronto: University of Toronto, 1983. 436p.

JANBEN, A.; GOLE, T. Thin-layer chromatographic determination of curcumin (turmeric) in spices. **Chromatographia**, v.18, n.10, p. 546-549, 1984.

JASIM, F.; ALI, F. A novel and rapid method for the spectrofluorometric determination of curcumin in curcumin spices and flavors. **Microchem. J.**, Baghdad, v.46, p.209-241, 1992.

KELKAR, N. C., SANJEEVA RAO, B. Essential oil from the rhizomes of *Curcuma longa* L. **Indian Institute of Science Journal**, Bangalore, v.17, p. 7-24, 1934.

KRISHNAMURTHY, N. et al. Oil and oleoresin of turmeric. **Trop. Science**, v,18, n.1, p. 37-45, 1976.

LEACH, A. E. Composition of turmeric. *J. Ameri. Chem. Soc.* v.26, p. 1210-1211, 1904.

LERAYER, A. L. S. et al. **Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais, diet, light e enriquecidos.** São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1998. p. 63-66.

LUTOMSKI, J.; KEDZIA, B.; DEBSKA, W. Effect of na alcohol extract and active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria and fungi. *Planta Medica*, v.26, n.1, p.9, 1974.

MACKEY, B. M. et al. The recovery of sublethally injured *Escherichia coli* from frozen meat. *Journal Appl. Bacteriology*. London, v.48, p.315-324, 1980.

MADRID, A. Treatment of whey before processing. *Industrias Lacteas*, v.28, n.6, p.23-24, 1979.

MARCHISIO, E.; SONCINI, G.; CANTONI, C. Alterazioni di ricotte. *Industrie Alimentari*, Milano, v.38, p. 265-270, Mar. 1999.

MARTINS, M.C. et al. *Bol. SBCTA*, Campinas, v.26, n.1, p.53-65, jan./jun. 1992.

MARTINS, M.C. **Obtenção e avaliação da curcumina a partir de rizomas secos de cúrcuma (*Curcuma longa* L.).** C1993. 1993 Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

MATHAI, C. K. The pattern of rhizome yield and their accumulation of commercially important chemical constituents in turmeric (*Curcuma spices*) during growth and development. *Qualitas. Plantarum Foods for Human Nutrition*, v. 28, n.3, p.219-225, 1979.

MATHAI, C. K. Variability in turmeric *Curcuma spices* germplasm for essential oil and curcumin. *Qual. Plant – Plant Foods Hum. Nutr.*, Netherlands, v. 28, n. 3, p.227-230, 1976.

MAZUMBER, A. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. **Biochem Pharmacol**, v.49, p.1165-1170, 1995.

MERCK. Meio de cultura chromocult coliform agar. In: _____ Merse. Campinas, São Paulo, 2000.

MERCHANT, I. A. **Veterinary bacteriology and virology**. 4th.ed. Ames: The Iowa College, 1950.

MILÁN, D. R. Cúrcuma, produção e utilização como ingrediente e aditivo na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 248-249, 1992.

MODLER, H. W.; EMMONS, D. B. Production and yield of whole-milk ricotta manufactured by a continuous process. I. Material and Methods. **Milchwissenschaft**, v.44, n.11, p. 673-676, 1989.

MORÁN, A. et al. Pharmacological screening and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia caerulascens subsp. gallica*. **J. ethnopharmacology**, v.26, p.197-203, 1989.

NUNES, F. V. Cultivo da cúrcuma é fácil e lucrativo. **Manchete Rural**, Rio de Janeiro, v.29, p.60, 1989.

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

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia: uso racional de medicamentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 407-439.

OSAWA, T. et al. Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.59, p.1609-1612, 1995.

PARRY, J.W. **Spices : morphology, histology, chemistry**. New York: Chemical, 1962. v.2, 183p.

PARRY, J.W. **Spices: morphology, histology, chemistry**. New York: Chemical, 1969. v.2, p. 74-78, p. 211-212.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Infecções humanas transmitidas pelos alimentos e pela água. In: _____. **Microbiologia**. São Paulo: McRraw-Hill, 1981. Cap. 29, v.2, pt. 5, p.696-697.

PEROTTI, A. G. Curcumin – na useful vegetable colour not much well-known. **Industr. Alim.**, v.14, n.6, p.66-68, 1975.

POLASA, K. et al. Turmeric (*Curcuma longa*) – induced reduction in urinary mutagens. **Food Chemistry and Toxicology**, v.29, n.10, p.699-706, 1991.

PULLA R. A.; LOKESH B. R. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. **Fd Chem. Toxi.**, 32, p.279-283, 1994.

PRICE, L. C.; BUESCHER, R. W. Turmeric pigments: stability characteristics and reaction mechanism of photoxidation and alkaline degradation. In: _____. **IFT 92 Annual Meeting Food Expo**, New Orleans, 1992, p. 376.

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

RAMPRASAD, C.; SIRSI, M. Observations on the pharmacology of *C. longa* L. – Pharmacodynamic and toxicological studies of sodium curcumin. **Indian J. Physiol. Pharmacol.** 1v. n.1, p.136-140, 1957.

RAMPRASAD, C.; SIRSI, M. Observations on the pharmacology of *Curcuma longa*. Studies in indian plants *Curcuma longa* Linn. – Effects of curcumin and essential oil of *C. longa* on bile secretion. **Journal Science Res. Inst.**, v.5, p.212-216, 1956.

RIMPLER, H.; HAENSEL, R.; KOCHENDOERFER, L. Xanthorrhizol, ein neues sesquiterpen aus *Curcuma xanthorrhiza*. **Z. Naturforsch.** v.25, n.9, p.995-998, 1970.

REY, Luis. **Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.265-266.

RICHMOND, R.; POMBO-VILLAR, E. Gas chromatography-mass spectrometry coupled with pseudo-sadtler retention indices, for the identification of components in the essential oil of *Curcuma longa* L. **Journal of Chromatography A**, v. 760, p.303-308, 1997.

RUPE, H.; C.. et al. Volatile plant constituents II. Turmerone, the aromatic principle of turmeric oil. **Helvetica Chimica Acta**. Basel, v.17. p. 372-389, 1934.

RUPE, H., GASSMANN, A . Ar-turmerone from curcuma oil. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v.19, p.569-571, 1936.

RUSIG, O . , MARTINS, M. C. Efeito da temperatura, do pH e da luz sobre os extratos de oleoresina de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e curcumina. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**. Vitória da Conquista, v.1, n.1, p. 158-164, 1992.

SACK, R. B. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *E. coli*. **Ann: Rev. Microbiology**. Palo Alto, v.28, p.333-353, 1975.

SAWADA, T. et al. Evaluation of crude drugs by bioassay, III. Comparison with local variation of the contents and the fungistatic action of the essential oil from the roots of *Curcuma longa*. **Shoyakugaku Zasshi**, Tokyo, v. 25, n. 1, p.11, 1971.

SAFFORD, R. J.; GOODWIN, B. F. J. Immunological studies on tartrazinc. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, Basel, v.77, n. 3, 331-336, 1985.

SAIR, L., KLEE, L. Debittering of turmeric. **Chemical Abstract**, Columbus (U. S. Patente, 3 340 250), v.67, 1967. (Resumo).

SALVIO, J. L. M. *Sobrevivência de Escherichia coli enteropatogênica clássica durante a maturação do queijo minas*. 1993 Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SEMWAL, A. D.; SHARMA, G. K.; ARYA, S. S. Antioxygenic activity of turmeric (*Curcuma longa*) in sunflower oil and *Ghec*. **Journal Food Science Technology**, Mysore, v.34, n.1, p.67-69, 1997.

SHELEF, L. A. Antimicrobial affects of spices. **Journal Food Safety**, 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 foods . **Journal Food Science**, v.49, p. 737-740, 809, 1980.

SHIBASAKI, I. Food preservation with nontraditional antimicrobial Agents . **Journal Food Safety**, v.4, p.35-58, 1982.

SHOLTO; DOUGLA J. Commercial Scitamineae- III Profitable turmeric cultivation. **Flavour Ind.** 4, 387-390, 1973.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, São Paulo: Rede de Núcleos de Informação - ITAL, 1995.

SOUZA, C.R.A. **Cúrcuma: caracterização, extração e estabilidade**. 1993 Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SRINAVASAN, K. R. – Chromatographic study of the curcuminoids *in Curcuma longa* L.. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.5, p. 448-457, 1953.

SRINIVAS, L.; SHALINI, V. K.; SHYLAJA, M. Turmerin: a water soluble antioxidant peptide from turmeric (*Curcuma longa*). **Arch. Bioch. Bioph.**, Mysore, v.292, n.2, p.617-627, 1992.

TAKAHASHI, M. Y. **Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões e identidade**. 2.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1987. 118p.

THOMPSON, D.P. Influence of pH on the fungitoxic activity of naturally occurring compounds . **J. Food Protect.**, v.53, p. 428-429, 1990.

TONELLI, E. Doença diarreica causada por *E. coli*. In: _____. **Doenças infecciosas na infância**. Rio de Janeiro: Medsi, 1987. Cap.36, v.1, p. 419-424.

TONNESEN, H. H.; KARLSEN, J. High performance liquid chromatography of curcumin and related compounds. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.259, p. 367-371, 1983.

TONNESEN, H.H.; KARLSEN, J.V. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v.180, n.5, p.402-405, 1985.

UNNIKRISHNAN M. K.; RAO M. N. Inhibition of nitrite induced oxidation of hemoglobin by curcuminoids. **Pharmazie**, v.50, p.490-492, 1995.

VIASAN, A. C. et al. Chemical analysis of some cultivars of *Curcuma longa* Linn. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 26, n. 5, p. 293-295, 1989.

VIEIRA, M. C.; BRANDÃO, S. C. C.; PINHEIRO, A. J. R. et al. Conservação do soro de queijo Minas com peróxido de hidrogênio. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 40, n.240, p. 17-28, 1985.

WANG, X. C. Stability of turmeric pigment. **Food-Ferment. Ind.**, v.1, p.63-66, 1994. (Resumo).

WHO. **Specifications for the identity and purity of some extraction solvents and certain other substances**. Geneva, 1961. 37p. (WHO Food Addit. Ser. V. 7 n. 40).

WHO. **Specifications for the identity and purity of some extraction solvents and certain other substances**. **Who Food Additive Service**, n.70, p. 40, 1971.

WHO/FAO **Turmeric and Curcumin in Evaluation of certain food additives**. **FAO Nutrition Meeting Reports**, número 54. Rome 1974. 40 p.

WHO/FAO **Turmeric and Curcumin in Specifications for identity and purity of certain food additives**. **FAO Food and Nutrition Paper 37**, Rome. 1986. 152p.

WONG, D. W. S. **Química de los alimentos: mecanismos y teoría.** Zaragoza: Acribia, 1995. p.259-294.