

2019-02-28

Potencial antimicrobiano de *Allium sativum* em queijo frescal

Milo, Izabela da Silva

Universidade Estadual do Norte do Paraná

MILO, Izabela da Silva. Potencial antimicrobiano de *Allium sativum* em queijo frescal. Orientadora: Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto. 2019. 35 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Campus Luiz Meneghel, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, 2019.

<https://repositorio.uenp.edu.br/handle/123456789/519>

Baixado de Repositório Institucional UENP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ
CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

IZABELA DA SILVA MILO

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Allium sativum* EM
QUEIJO FRESCAL**

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2019

IZABELA DA SILVA MILO

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Allium sativum* EM
QUEIJO FRESCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Agronomia, da Universidade
Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz
Meneghel.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Erika Cosendey
Toledo de Mello Peixoto

Coorientador: Prof. Dr. Leopoldo Sussumo
Matsumoto

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2019

Ficha catalográfica elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UENP

MM661p
p Milo, Izabela da Silva
Potencial antimicrobiano de *Allium sativum* em
queijo frescal / Izabela da Silva Milo; orientador
Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto; co
orientador Leopoldo Sussumu Matsumoto -
Bandeirantes, 2019.
35 p.

Agronomia) - Universidade Estadual do Norte do
Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, 2019.

1. Alho. 2. Antimicrobianos naturais. 3.
Contaminação alimentar. 4. *Staphylococcus aureus*. I.
Mello Peixoto, Erika Cosendey Toledo de, orient.
II. Matsumoto, Leopoldo Sussumu, co-orient. III.
Título.

IZABELA DA SILVA MILO

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Allium sativum* EM
QUEIJO FRESCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Agronomia, da Universidade
Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz
Meneghel.

Aprovada em: 28/02/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Leopoldo Sussumo Matsumoto	UENP CLM
Dra. Anna Carolina Leonelli Pires de Campos	UEL
Prof. Dr. Eder Paulo Fagan	UENP CLM
Prof. Dr. Paulo Fernandes Marcusso	UFVJM
Profa. Dra. Francielle Gibson da Silva Zacarias	UENP CLM

Prof^ª. Dr^ª. Erika Cosendey Toledo de Mello
Peixoto

Orientadora
UENP CLM

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais
Fernando Milo e Izabel Cristina S. Milo,
pelo incentivo e apoio constantes.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela vida, saúde e determinação para conquistar tudo que conquistei até aqui. Por todas as oportunidades que me foram concedidas e ao Universo, por sempre ser tão cuidadoso com os encontros e acasos da vida. Agradeço à minha mãezinha Nossa Senhora Aparecida por sempre estar ao meu lado me dando forças pra continuar e por nunca ter me deixado desistir diante das dificuldades.

Aos meus pais, Fernando Milo e Izabel Cristina S. Milo, por todo esforço e dedicação em minha educação e formação não só acadêmica, mas como ser humano. Me ensinando sobre dignidade, verdade, trabalho, justiça, bondade, carisma, simplicidade e não menos importante, a levar a vida com alegria e bons pensamentos. Vocês são meus maiores e melhores exemplos.

As minhas avós, Nadir Milo e Francisca Singullani, por sempre acreditarem em mim.

Ao meu namorado, Pedro Henrique Garcia de Souza, por toda paciência, carinho, amor e atenção. Por tornar tudo mais fácil e leve. Tem sido lindo compartilhar a vida com você!

Aos meus melhores amigos de Santa Cruz: Lais Zaia, Estefânia Sanson, Laura Maitan, Giuglia Menegazzo, Victoria Raymundo, Vinny Pellegrino, Enzo Pellegrino, Gabriel Pegorer, João Paulo Pegorer, Giovanne Franciscon e Flávia Borges. A amizade de vocês é muito importante e especial para mim!

Aos meus melhores amigos do mestrado: Lais Maria Bonadio Precipito e Luiz Augusto Inojosa Ferreira. Não sei o que seria de mim sem vocês. Obrigada por entrarem na minha vida e de um jeito tão peculiar tornar as coisas mais fáceis por aqui.

Aos amigos do mestrado: obrigada pela amizade.

A minha orientadora professora Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto por todos os ensinamentos, e toda a equipe do Nepasp.

Ao professor Eder Paulo Fagan por toda a paciência desde a graduação, a toda equipe do laboratório de leite, em especial a Anna Carolina Leonelli Pires de Campos, que me ensinou tudo que eu sei e fez despertar em mim esse amor pelo leite e pela microbiologia.

A todos os professores, colaboradores e funcionários da UENP CLM, especialmente a Sônia Frontelli, Elaine Silveira e Geisi Freitas pela amizade, carinho e pelos cafézinhos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
pela concessão da bolsa do mestrado.

MILO, Izabela da Silva. **Potencial antimicrobiano de *Allium sativum* em queijo frescal**. 2019. 34 folhas. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2019.

RESUMO

No Brasil é comum o consumo de queijo frescal, e por ser um produto que sofre manipulação, está suscetível a contaminação por microrganismos patogênicos, destacando-se *Staphylococcus aureus*. Quando presente em quantidade acima de 10^6 UFC/g e sob condições adequadas de temperatura, esse microrganismo pode produzir enterotoxinas causadoras de intoxicação alimentar, representando importante problema para saúde pública. Além de tratar-se de planta condimentar, o alho tem sido utilizado para fins medicinais, principalmente pela presença de substâncias como alinase, alina e alicina. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano do *Allium sativum*, na forma de suspensão aquosa (SAa) e *in natura* (Ain), sobre *S. aureus* (ATCC 25923) em queijos frescos. A atividade antibacteriana foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (MIC), utilizando o método de microdiluição. Dessa forma, foram avaliados os seguintes tratamentos: SAa em diferentes concentrações (0,58%, 1,11% e 2%), além dos tratamentos controle negativo (queijo frescal) e testemunha (queijo frescal contaminado com *S. aureus*). Os queijos foram produzidos com leite pasteurizado, e posteriormente contaminados com 10^8 UFC/mL de cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 25923). Adicionou-se SAa à massa dos queijos por incorporação, e para avaliação do Ain os bulbilhos foram descascados, pesados, cortados e adicionados à massa do queijo na proporção de 50 gramas por litro de leite. Os resultados foram avaliados retirando-se 10 gramas de cada queijo, diluindo em 90mL de solução salina 0,9%, com subseqüentes diluições decimais seriadas até 10^{-4} . Após inoculação por superfície em placas com *Agar Baird Parker*, enriquecido com solução de gema de ovo e telurito de potássio, realizou-se incubação a 35°C por 48 horas, procedendo-se contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de queijo. As análises foram realizadas nos dias 1 (um dia após fabricação dos queijos), e 5, 10 e 15 após. A MIC correspondeu à 1,25%. Os resultados demonstram que as três concentrações avaliadas foram capazes de diminuir a contagem de bactérias, porém na concentração de 0,58% houve crescimento de *S. aureus* em uma das produções de queijo. A concentração de 1,11% foi a que apresentou melhor resultado, diminuindo em média 8,48% a contagem de bactérias e para Ain a diminuição média foi de 6,23%. Portanto, o alho possui propriedades antimicrobianas contra *S. aureus* em queijo frescal podendo ser utilizado não só como um diferencial de sabor do produto, mas como um aditivo natural.

Palavras-chave: Alho. Antimicrobianos naturais. Conservantes naturais. Contaminação alimentar. *Staphylococcus aureus*.

MILO, Izabela da Silva. *Allium sativum* antimicrobial potential in fresh cheese. 2019. 34 pages. Master's Dissertation in Agronomy - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2019.

ABSTRACT

In Brazil the consumption of fresh cheese is common, and because it is a product that undergoes manipulation, it is susceptible to contamination by pathogenic microorganisms, especially *Staphylococcus aureus*. When present in amounts above 10^6 CFU/g and under appropriate temperature conditions, this microorganism can produce enterotoxins causing food poisoning, posing a major public health problem. In addition to being a seasoning plant, garlic has been used for medicinal purposes, mainly by the presence of substances such as alinase, alina and allicin. Thus, the present work aimed to evaluate the antimicrobial potential of *Allium sativum*, as aqueous suspension (SAa) and *in natura* (Ain), on *S. aureus* (ATCC 25923) in fresh cheeses. The antibacterial activity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using the microdilution method. Thus, the following treatments were evaluated: SAa at different concentrations (0.58%, 1.11% and 2%), besides the negative control treatments (fresh cheese) and control (fresh cheese contaminated with *S. aureus*). The cheeses were produced with pasteurized milk, and then contaminated with 10^8 CFU/mL of *S. aureus* standard strain (ATCC 25923). SAa was added to the cheese mass by incorporation, and for evaluation of the Ain the bulbs were peeled, weighed, cut and added to the cheese mass in the proportion of 50 grams per liter of milk. The results were evaluated by withdrawing 10 grams of each cheese, diluting in 90mL of 0.9% saline, with subsequent serial decimal dilutions up to 10^{-4} . After surface inoculation on plates with *Baird Parker* Agar, enriched with egg yolk solution and potassium tellurite, incubation was carried out at 35°C for 48 hours, counting the colony forming units (CFU) per gram of cheese. The analyzes were performed on days 1 (one day after of cheese manufacturing), and 5, 10 and 15 after. The MIC corresponded to 1,25%. The results showed that the three concentrations evaluated were able to decrease the bacterial count, but at the concentration of 0.58% there was growth of *S. aureus* in one of the cheese productions. The concentration of 1.11% showed the best result, decreasing the bacterial count by 8,48% and to Ain the average decrease was 6,23%. Therefore, garlic has antimicrobial properties against *S. aureus* in fresh cheese and can be used not only as a flavor differential of the product, but as a natural additive.

Key-words: Food contamination. Garlic. Natural antimicrobials. Natural preservatives. *Staphylococcus aureus*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	Queijo Minas Frescal.....	12
2.2	Bactérias Contaminantes em Queijos.....	13
2.3	<i>Allium sativum</i>	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1	Produção da Suspensão Aquosa de Alho.....	17
3.2	Preparo da Suspensão de <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.3	Concentração Inibitória Mínima.....	17
3.4	Preparação dos queijos.....	18
3.5	Análises microbiológicas.....	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5	CONCLUSÃO.....	27
6	REFERÊNCIAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

O queijo Minas Frescal, também conhecido como queijo fresco ou branco, é um dos mais populares no Brasil, isso se deve ao seu processamento simples, baixo custo e alto rendimento (SANTOS, 2017). É produzido com leite pasteurizado e adição de coalho, resultando em coagulação enzimática e formação da massa. Possui alto teor de umidade, não sofre maturação e não contém conservantes o que compromete seu tempo de validade por favorecer sua contaminação.

Produtos que passam por muitos processos e manipulação como os queijos, são susceptíveis à contaminação principalmente de origem microbiológica (APOLINARIO et al., 2014). Esse fato, se deve à falta de boas práticas, alto teor de umidade do produto, precárias formas de produção, e permanência do produto em temperaturas que favorecem o crescimento bacteriano (ZOCHE et al., 2012). Dessa forma, além das mudanças nas características sensoriais, o consumo desses alimentos contaminados pode levar a intoxicações e toxinfecções alimentares, dentre elas a intoxicação estafilocócica (OLIVEIRA et al., 2017; QUEIROZ et al., 2017). Diante disso, apesar de existirem tecnologias de conservação de queijos, nenhuma delas assegura completamente a qualidade microbiológica do produto. Dessa maneira, justifica-se a busca por alternativas eficientes de controle sanitário.

Adicionalmente, o mercado consumidor exige cada vez alimentos naturais, de qualidade e segurança para o consumo (SAMPAIO, 2017). Dessa forma, algumas plantas condimentares, por apresentarem também propriedades medicinais, podem representar importante alternativa natural ao uso de conservantes químicos. O aumento no uso de plantas condimentares nas últimas décadas, se deve principalmente a fatores como a valorização do uso de produtos naturais (GALO et al., 2018), dentre essas, destaca-se o *Allium sativum* (HORITA, 2016).

O alho, é amplamente utilizado na culinária, sendo consumido cru, em forma de óleos, extratos e até em pó (FABIANO, 2017). Entretanto, seu uso vem sendo difundido devido suas propriedades antifúngicas e principalmente antimicrobianas (LANZOTTI; SCALA; BONANOMI, 2014; EL-SAYED et al., 2017). Assim, além de ser um alimento funcional e utilizado como condimento, o alho apresenta importante potencial antimicrobiano, associado a substâncias biológicas ativas como a enzima alinase, compostos sulfurados, como a alina, e componentes resultantes de interação enzimática, como a alicina

(MAJEWSKI, 2014). Na forma de extrato, pode representar alternativa natural para conservação do queijo, favorecendo menores perdas e melhor comercialização (OLIVEIRA; SIQUEIRA JUNIOR; SILVA, 2012).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano de *Allium sativum*, na forma de suspensão aquosa (SAa) e *in natura* (As), sobre *S. aureus* (ATCC 25923) em queijos frescais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queijo Minas Frescal

O queijo frescal é considerado popular no Brasil, sendo um dos mais consumidos por diferentes níveis socioeconômicos da população, o que é atraente devido ao seu alto rendimento (LOLLO et al., 2015). Assim, a indústria lática tem grande importância socioeconômica, pela expressiva comercialização do leite e seus derivados (PERIN, 2017). O alto consumo ocorre em virtude da associação entre a saúde do consumidor e o hábito de consumir queijo. Esta associação, ocorre principalmente devido aos seus benefícios nutricionais, relacionados aos teores de lipídeos, minerais, vitaminas, proteínas e gordura (TERPOU et al., 2017).

É comercializado normalmente em forma cilíndrica com peso variando entre 0,5 a 3 kg. Apresenta massa crua, cor branca, textura fechada e consistência mole. Conforme Instrução Normativa Nº 4 de 1º de março de 2004 (BRASIL, 2004), o Queijo Minas Frescal é um queijo semi-gordo, de muito alta umidade (46-55%), contendo de 17% a 19% de gordura; teor de sal variando entre 1,4% e 1,6%; pH entre 5,0 e 6,0 e prazo de validade baixo, variando de 7 a 10 dias (NUNES; CALDAS, 2017).

A legislação brasileira preconiza que a fabricação desse tipo de queijo seja realizada com leite pasteurizado, entretanto ele é fabricado na maioria das vezes a partir de leite cru e comercializado informalmente, sem supervisão sanitária ou regulamentação (AMORIM, 2014). Devido a este fato, frequentemente o queijo frescal está associado a transmissão de patógenos e a intoxicação alimentar, principalmente estafilocócica (FERREIRA et al., 2016).

Tradicionalmente o queijo frescal é produzido com adição de coalho ao leite cru, podendo haver adição de fermento láctico no início da produção para aumentar a acidez e diminuir a multiplicação de microrganismos, sendo importante no controle da microbiota contaminante (HOFFMAN, 1999). Doenças que podem ser transmitidas por queijos, estão

associadas geralmente com queijos moles ou produzidos com leite cru, dificilmente estão relacionadas à queijos duros (CHOI et al., 2016). Entende-se por queijo mole aqueles que apresentam umidade maior que 55%, ou seja, queijos de muito alta umidade. Já os queijos duros são aqueles que apresentam umidade até 35,9%, também conhecidos como queijo de baixa umidade, segundo a Portaria nº 146 de 07 de março de 1996 do MAPA (BRASIL, 1996). Nesse sentido, as principais bactérias patogênicas relacionadas ao consumo de queijos contaminados são *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (OLIVEIRA et al., 2017).

2.2 Bactérias Contaminantes em Queijos

Listeria monocytogenes é uma bactéria psicrotrófica e tolerante ao calor presente principalmente no leite cru. Pode estar presente no queijo caso não sejam mantidas condições higiênicas adequadas. É mais comum em queijos maturados, onde o pH elevado, alto teor de umidade e temperatura das salas de maturação favorecem o seu crescimento (MELO et al., 2015).

Salmonella enterica também é encontrada em leite cru, entretanto não sobrevivem ao processo de pasteurização (VILLARRUEL-LOPEZ et al., 2016). Porém, elas podem contaminar os queijos após a pasteurização se o processo de fabricação não for correto podendo ficar viável no produto por mais de 60 dias (FERNANDES, 2009).

Escherichia coli, principalmente as cepas enterohemorrágicas com destaque para *E. coli* O157:H7 causam sérias infecções podendo levar até à morte. Este patógeno é de alto risco nos queijos pois tolera baixos índices de pH durante um longo tempo e também está associado ao leite cru (REITSMA; HENNING, 1996).

Staphylococcus aureus, quando presentes em populações maiores que 10^6 UFC/g e sob condições adequadas de temperatura entre 10°C e 45°C podem produzir enterotoxinas, as quais causam intoxicação alimentar no consumidor, representando um importante problema em saúde pública (QUEIROZ et al., 2017). Considerando a ocorrência de surtos *S. aureus* foi o segundo patógeno mais comum causador de doenças transmitidas por alimentos entre os anos de 2000 e 2014, e dessas doenças, o leite e seus derivados foram os mais envolvidos (ANVISA, 2015).

Staphylococcus são bactérias esféricas pertencentes a família *Micrococcaceae*, que podem ser definidos como cocos gram positivos, de diâmetro variando entre 0,5 a 1,5 micrômetros, imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase positivos e fermentam a glicose com produção

de ácido, tanto em aerobiose, como em anaerobiose. Podem se apresentar isolados, aos pares ou agrupados irregularmente com aspecto de cachos de uva, crescendo em temperaturas entre 18 a 40°C, sendo caracterizados como mesófilos (TRABULSI, 2005).

S. aureus produz uma série de fatores de virulência como enzimas (coagulase, catase, hialuronidase, nuclease, lipase) e toxinas (hemolisinas, leucocidinas e enterotoxinas). As enterotoxinas produzidas por *S. aureus* são preteínas com baixo peso molecular, resistentes às enzimas proteolíticas do trato digestório e hidrossolúveis, o que faz com que permaneçam ativas após ingestão. Também possuem termoestabilidade, ou seja, são capazes de sobreviver aos tratamentos térmicos como a pasteurização. Mais de 18 tipos já foram descritos, sendo as clássicas EEA, EEB, EEC, EED, EEE, EEG, EEH, e EEI as de maior ocorrência (BORGES et al., 2008).

Intoxicação alimentar estafilocócica apresenta grande prevalência entre as doenças transmitidas por alimentos (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014). Ela resulta da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas nos alimentos (HANNEKINNE et al., 2012). O diagnóstico dessa intoxicação é confirmado pela identificação de contagens da bactéria acima de 10^5 UFC/g a partir de restos de alimentos ou pela própria pesquisa pelas enterotoxinas presentes nos alimentos (SANTANA, 2006).

Outro aspecto relevante para a epidemiologia das infecções, diz respeito à capacidade de *S. aureus* formar biofilme em superfícies das indústrias de laticínios. Assim, a bactéria consegue sobreviver mesmo após procedimentos eficazes de desinfecção e limpeza (GUTIERREZ et al., 2012).

A presença dessa bactéria no queijo é encarada como indicador de deficiências higiênicas sanitárias no processo de fabricação e principalmente nas operações de manipulação, podendo representar risco à saúde pública se os cuidados na fabricação não forem seguidos (MEDEIROS, 2013).

2.3 *Allium sativum*

Desde o início da civilização existe o uso de compostos a base de plantas, quando os povos usavam as substâncias da natureza para restaurar a saúde física, mental e espiritual dos indivíduos. Os primeiros registros, do uso dessas substâncias para fins terapêuticos, datam de aproximadamente 2800 a.C. Entretanto, somente no século XIX teve início a purificação de extratos vegetais (FRANÇA, 2008).

O alho (*Allium sativum*) é uma planta herbácea que pertence à família *Alliaceae*. Possui pseudocaule formado pelas bainhas das folhas e apresenta folhas

lanceoladas. Quando está em condições adequadas e favoráveis as gemas do caule se desenvolvem formando cada uma um bulbilho, que em conjunto forma o bulbo. Este, é arredondado e pode conter de cinco a 56 bulbilhos, apresenta forma ovóide arqueada e contém duas folhas protetoras de cor branca arroxeada ao seu redor (TRANI, 2009).

Considerando seu aroma e sabor característico, o alho é amplamente utilizado na culinária (OLIVA, 2017), podendo ser consumido cru, em forma de óleos, extratos e até em pó (LANZOTTI; SCALA; BONANOMI, 2014). O sabor do alho é uma de suas principais características e é resultante de complexas reações bioquímicas. Alguns dos responsáveis pelo marcante sabor são compostos de enxofre e aminoácidos não voláteis como alilina ou sulfóxido de S-alil-cisteína (HORNICKOVÁ, 2010). Importante destacar que devido suas características de armazenamento e durabilidade no transporte, adicional vantagem é observada para o alho, o fato de que geralmente não se observa prejuízos sobre seu poder aromatizante e nem sobre suas propriedades medicamentosas (MARTINS; PETROPULOS; FERREIRA, 2016).

Seu uso, como planta medicinal, vem sendo difundido no tratamento de diversas afecções (BAYAN; KOULIVAND; GORJI, 2014) devido sua ação imunomoduladora (LOZANO; BAGNE; HORA, 2015), anti-diabética (SHEELA et al., 1995), cardioprotetora (CHAN et al., 2013), anti-inflamatória (OTA et al., 2010) e principalmente por sua atividade anti-infecciosa contra fungos (ANKRI; MIRELMAN, 1999; FONSECA, 2014), parasitas (SOFFAR; MOKHTAR, 1991; ANKRI; MIRELMAN, 1999), e bactérias (CAVALLITO; BAILEY, 1944; ADLER; BEUCHAT, 2002).

Leuchner e Zamparini (2002), ao estudar maionese adicionada de alho, gengibre, mostarda e cravo, verificaram o crescimento de *E. coli* O157 e *Salmonella enterica* sorovar *enteridis*, patógenos alimentares com elevada importância na indústria alimentar. O alho e o cravo apresentaram efeito bactericida para ambas as bactérias. Já Sakagami et al. (2000) avaliaram potencial efeito antibacteriano do óleo essencial de alho a 0,5%, e verificaram inibição da produção de shigatoxina por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7. Benkeblia (2004) verificou efeito antimicrobiano de *Allium sativum* sobre *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* e *Fusarium oxysporum*.

Já Sallam (2004) avaliou o efeito antimicrobiano do alho nas formas em pó, cru e óleo sobre o armazenamento de salsichas de frango. Relatou que entre as formas analisadas o alho fresco na concentração de 50g/kg de salsicha apresentou maior efeito, porém resultou em forte sabor. Por outro lado, o alho *in natura* na quantidade de 30g/kg, ou o

alho em pó, na quantidade de 9g/kg, produziram efeitos antimicrobianos e antioxidantes e menor sabor, além de prolongar a validade da salsicha para 21 dias.

Gündoğdu, Çakmakçi, Dağdemir (2009) estudaram as propriedades microbiológicas, químicas, físicas e sensoriais de iogurtes preparados com 0,5% e 1% de *Allium sativum* no período de armazenamento de 28 dias. Coliformes não foram encontrados nas amostras estudadas, porém levedura e mofo foram encontrados em todas as amostras exceto naquelas tratadas com alho. A adição de alho não apresentou nenhum efeito sobre os teores de acidez, gordura e proteína dos iogurtes, e os iogurtes poderiam ser consumidos até o dia 28, enquanto que os sem alho poderiam ser consumidos até 7 dias.

Shori, Baba (2015) também avaliaram o extrato aquoso de alho, na concentração de 0.1g/mL, em iogurte de leite de vaca e camelo, sobre *Bifidobacterium bifidum* durante 21 dias de armazenamento. Verificaram que não houve prejuízos sobre atividade probiótica do *B. bifidum*, assim como sobre a contagem desses microrganismos viáveis. Assim, evidenciaram a eficácia do extrato pelo aumento dos compostos bioativos, além da atividade antioxidante dos iogurtes e leites fermentados. Adicionalmente, também observaram aumento da aceitação desses produtos.

Os ingredientes mais ativos presentes no bulbo do alho são: alinina (aminoácido protéico) e alinase (uma enzima) e quando o produto fresco é esmagado estes compostos formam a alicina, que é o principal componente ativo e responsável pelas ações terapêuticas e tóxicas (RAHMAN, 2012).

Alicina corresponde ao produto bioativo mais importante e isso se deve a sua atividade funcional e altas concentrações (LAWSON; HUGHES, 1992). Entretanto, a alinase e a alicina são termolábeis e decompõem-se em poucas horas formando compostos de enxofre mais estáveis, porém, com reduzida atividade (RYBAK; CALVEY; HARNLY, 2004).

A alicina e os compostos sulfurados são as principais substâncias antimicrobianas presentes no alho (CAVALLITO, 1944). Ele é eficaz contra bactérias gram positivas e gram negativas incluindo *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Mycobacteria*, *Proteus* e *Helicobacter pylori* (GUPTA, 2015), por prejudicar a síntese proteica e formação das paredes celulares desses microrganismos (LI, 2015).

O uso do alho fresco se mostra mais eficaz devido a maior presença de tiossulfinais, os mais abundantes compostos organossulfurados encontrados no alho fresco esmagado ou recém picado (LAWSON, 2001). A alicina é o tiossulfinais existente em maior quantidade, representando cerca de 70% dos tiossulfinais presentes no alho fresco

(LAWSON, 1998). A meia vida da alicina é dependente da concentração, temperatura e solvente utilizado para armazenagem e é de aproximadamente 16 horas em temperatura ambiente, porém, no alho esmagado, pode chegar até 5 dias. Ela é mais estável em baixas temperaturas e em solventes que apresentam alto grau de ligação de hidrogênio (LAWSON, 1998).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produção da suspensão aquosa de alho

Para a produção da suspensão aquosa de *Allium sativum* (SAa) a 10% (m/v), foram adicionados 87,5g de bulbilhos de alho descascados e macerados, à 875mL de água ultrapura Milli-Q. Posteriormente, a suspensão foi triturada em liquidificador durante aproximadamente três minutos, filtrada em papel filtro caseiro, e imediatamente utilizada para avaliação dos diferentes tratamentos. O pH médio da suspensão foi de 5,6.

3.2 Preparo da suspensão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Para a produção da suspensão de *S. aureus* utilizada no teste de concentração inibitória mínima, as bactérias foram cultivadas em Agar *Baird Parker*. Posteriormente, as colônias foram diluídas em salina peptonada 0,85% até a concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL (escala 1 de McFarland). Na seguência 10 μ L dessa solução foram adicionados a 990 μ L de caldo *Mueller Hinton* até a concentração de 10^5 UFC/mL.

3.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC), frente ao *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foi avaliada em triplicada, utilizando método de microdiluição conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2015). Para tanto, foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços de fundo chato. Foram adicionados 50 μ L de caldo *Mueller Hinton*, e 50 μ L da SAa. Esta solução foi então sucessivamente diluída e subsequentemente, adicionou-se 50 μ L da solução de *S. aureus*.

Após incubação em estufa bacteriológica por 24 horas a 35°C, avaliou-se a presença de turvação do meio e formação de precipitado, correspondente ao crescimento bacteriano.

3.4 Preparação dos queijos

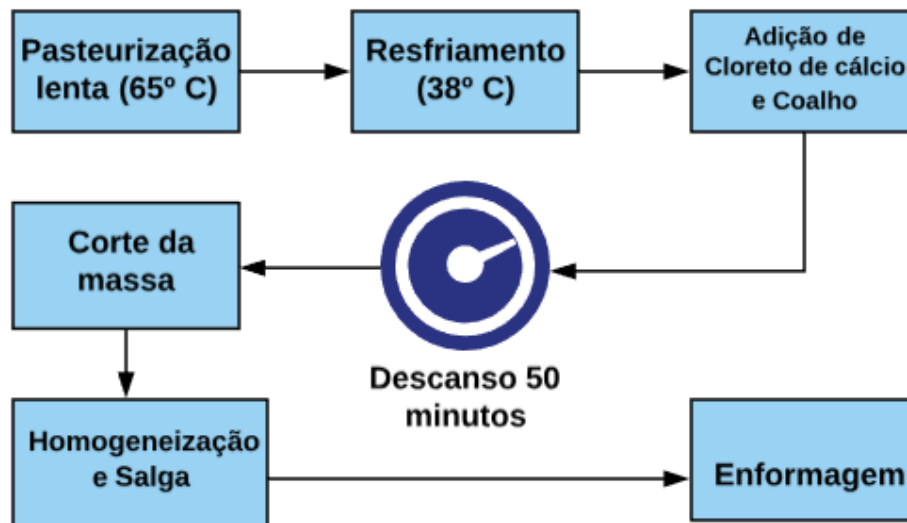
O leite foi pasteurizado em banho-maria até aquecimento a 65°C e mantido por 30 minutos, então foi resfriado até 38°C e adicionado de 0,5mL de cloreto de cálcio por litro juntamente com um mL de coalho por litro. Após descanso de 50 minutos, realizou-se o corte da massa em cubos com um cm³, movimentos para homogeneizar a massa foram realizados por cinco minutos e repouso por cinco minutos. Então a massa foi colocada nas formas para posterior refrigeração a 4°C (figura 1).

Depois de 24 horas em refrigeração retirou-se as peças de queijo das formas e a contaminação superficial por imersão foi realizada. Para isso, as bactérias foram cultivadas em 25mL de meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI), incubados a 37°C por 24 horas. A cultura foi semeada em *Ágar Baird Parker* e novamente incubadas a temperatura de 37°C por 24 horas. Em seguida, colônias eram retiradas da placa e diluídas em água peptonada e, posteriormente, comparada a escala de McFarland equivalente a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Então essa solução foi utilizada para a contaminação dos queijos, que eram imersos nela por aproximadamente dois minutos cada peça, com exceção do controle negativo.

Os queijos frescos, foram confeccionados individualmente pela adição de 2 litros de leite pasteurizado a 125mL (SAa125), 250mL (SAa250) e 500mL (SAa500) da SAa, totalizando três peças de queijo fresco sendo as concentrações de SAa de 0,58%, 1,11% e 2% respectivamente. Foram avaliados os seguintes tratamentos: SAa125, SAa250, SAa500, queijo sem SAa que correspondeu ao controle negativo (CN), e queijo adicionado ao *S. aureus* ATCC 25923, que correspondeu ao controle testemunha (CT). Foram efetuados três processamentos, de modo a obter três unidades experimentais de cada tratamento.

Para os tratamentos com o alho *in natura* (Ain), foram adicionados 50 gramas de alho descascados e picados para cada litro de leite utilizado, totalizando três tratamentos: queijo com alho *in natura*, queijo sem alho correspondente ao controle negativo (CN) e queijo contaminado com *S. aureus* que correspondeu ao controle testemunha (CT).

Figura 1. Fluxograma de produção do Queijo Minas Frescal.



3.5 Análises microbiológicas

Foram utilizadas alíquotas de 10g de cada amostra contendo 90mL de solução de NaCl 0,9% como diluente. A seguir, a amostra foi transferida para bolsas plásticas estéreis fabricadas de polietileno de baixa densidade Nasco WHIRL-PAK® e homogeneizadas em *Stomacher* 400 por 60 segundos. Partindo-se da diluição inicial a 10^{-1} , foi preparada uma série de diluições decimais até a diluição de 10^{-4} , empregando-se tubos de ensaio com 9,0mL de solução salina 0,9%.

De cada uma das diluições das amostras de queijo examinado foi transferido 0,1mL para superfície de Agar *Baird Parker* enriquecido com gema de ovo e telurito de potássio em placas de Petri. Em seguida, o inócuo foi espalhado por toda a superfície do meio com o auxílio de alça de *Drigalsky* e as placas incubadas a 36°C por 48 horas em estufa bacteriológica.

Após a incubação, procedeu-se a contagem do número de colônias que apresentaram características típicas como cor negra brilhante, com zona de precipitação branca ao seu redor e circundada por um halo transparente. Os números de colônias contados foram multiplicados pelo fator 10 e, em seguida, pela recíproca da diluição correspondente a placa de contagem, obtendo-se assim o valor da contagem de *S. aureus* por grama de queijo examinado e o resultado transformado em $\log \text{UFC g}^{-1}$.

As análises microbiológicas acima descritas foram realizadas um dia após fabricação dos queijos (D1) e após aos dias D5, D10 e D15 a fim de avaliar o efeito da SAa visto que a data de validade de um queijo frescal normalmente corresponde de 7 a 10 dias

após a data de fabricação. Nesses mesmos momentos também foram avaliadas características de coloração, odor, maciez e textura por método descritivo (TEIXEIRA, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a o teste de MIC, a concentração mínima de SAa *in vitro* capaz de inibir qualquer crescimento bacteriano foi 1,25%. A SAa demonstrou capacidade antimicrobiana frente a *S. aureus*. Saha et al. (2016) avaliaram a MIC de extrato aquoso de *Allium sativum* contra *S. aureus* e *E. coli* observando as concentrações de 400µg/mL e 700µg/mL como MIC, respectivamente. Yadav, Trivedi e Bhatt (2015) observaram que o suco de alho fresco a 50% apresenta propriedades antibacterianas contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a MIC para cada um deles de 4-8% com exceção de *P. aeruginosa* que é de 4-16% (v/v).

Entretanto, Dantas et al. (2018) avaliando extrato hidroalcoólico e glicólico de *A. sativum*, tanto à 30% como à 70%, nas formas *in natura* e seca, não registraram ação antimicrobiana contra *S. aureus*. Diferentemente, ALLI et al. (2011) e DAKA (2011) verificaram ação antibacteriana do extrato de alho a 12,5% em isolados clínicos de *S. aureus*.

Deresse (2010) avaliou atividade antimicrobiana do extrato aquoso do alho sobre 30 isolados clínicos de *S. aureus* verificando como MIC a concentração de 7,5mg/mL. O mesmo trabalho revelou que a atividade do extrato é sensível ao calor devido aos resultados apresentados após autoclavagem do extrato em temperatura de 121°C por 15 minutos onde a capacidade antimicrobiana se perdeu, já para o material em temperatura ambiente ou refrigerado, a capacidade antimicrobiana se manteve. Entretanto, quando utilizado o alho fresco essa capacidade é maior. Isso pode ser decorrente da maior presença da alicina, que atua inibindo totalmente a síntese de RNA e parcialmente a síntese de DNA e proteínas bacterianas (FELDBERG et al., 1988).

Para o primeiro processamento de queijos, os tratamentos SAa250 e SAa500 demonstraram uma diminuição na contagem de bactérias de 0,26% e 2,40% respectivamente (Tabela 1 e Figura 2). Porém o tratamento de SAa125 apresentou um aumento de 0,7%. Esse aumento pode ser resultado de uma provável contaminação da solução aquosa SAa125 com *S. aureus* antes da adição ao queijo ou de ineficiência da suspensão aquosa nessa concentração.

Tabela 1. Contagem das Unidades Formadoras de Colônia em log por grama de queijo analisado durante os dias de armazenamento.

	CT	SAA125	SAA250	SAA500
Dia 1	5,613	5,924	5,477	5,204
Dia 5	5,826	5,892	5,580	5,447
Dia 10	5,613	5,914	5,505	5,342
Dia 15	5,380	5,968	5,462	5,079

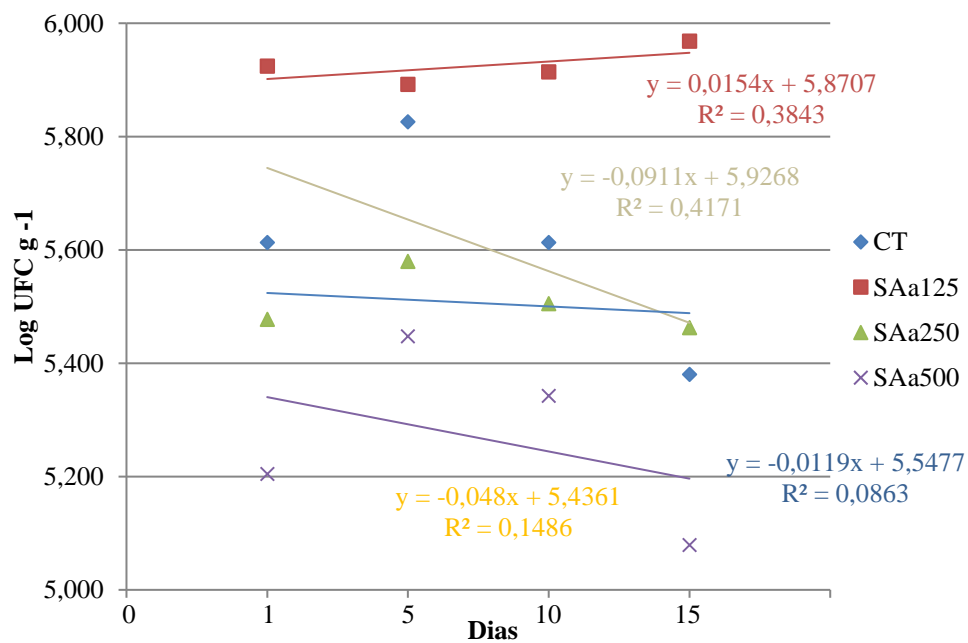
CT: controle testemunha

SAA125: queijo adicionado de 125mL de suspensão aquosa de alho

SAA250: queijo adicionado de 250mL de suspensão aquosa de alho

SAA500: queijo adicionado de 500mL de suspensão aquosa de alho

Figura 2. Contagem de *Staphylococcus aureus* (log UFC g⁻¹) em queijo fresco durante 15 dias de armazenamento.



Para o alho *in natura* houve uma diminuição de 4,98% na contagem de bactérias, que pode ser verificada na tabela 2.

Tabela 2. Contagem das Unidades Formadoras de Colônia em log por grama de queijo analisado durante os dias de armazenamento.

	CT	Ain
Dia 1	4,929	5,389
Dia 5	5,008	5,217
Dia 10	4,770	5,120

CT: controle testemunha

Ain: queijo com alho *in natura* (50g/litro de leite utilizado)

No segundo processamento de queijos, todos os tratamentos foram eficientes para a diminuição da contagem bacteriana, diminuindo em 9,44%, 7,62% e 6,67% respectivamente (Tabela 3 e Figura 3) corroborando com Nejad et al. (2014). Eles avaliaram o efeito antimicrobiano de extrato aquoso de alho (500g para 200mL de solução fisiológica) em hambúrguer com três diferentes quantidades do extrato: 1mL, 2mL e 3mL, observando que em todas as quantidades durante o período de armazenamento que o extrato foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*.

Tabela 3. Contagem das Unidades Formadoras de Colônia em log por grama de queijo analisado durante os dias de armazenamento.

	CT	SAa125	SAa250	SAa500
Dia 1	5,279	5,716	5,633	5,820
Dia 5	5,176	5,415	5,279	5,415
Dia 10	5,255	5,114	4,954	5,146
Dia 15	5,301	5,176	5,204	5,431

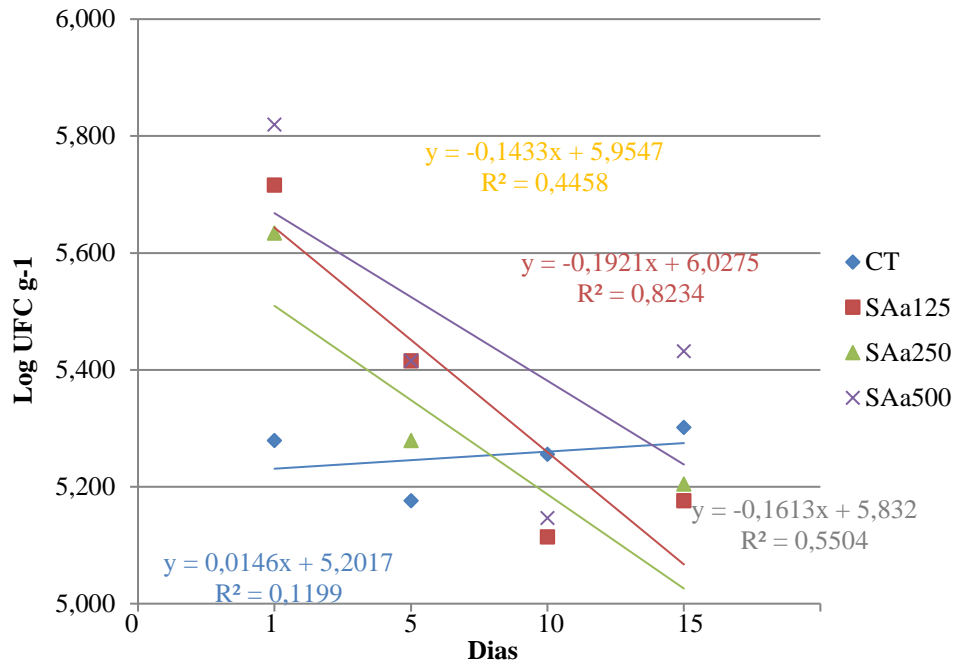
CT: controle testemunha

SAa125: queijo adicionado de 125mL de suspensão aquosa de alho

SAa250: queijo adicionado de 250mL de suspensão aquosa de alho

SAa500: queijo adicionado de 500mL de suspensão aquosa de alho

Figura 3. Contagem de *Staphylococcus aureus* (log UFC g⁻¹) em queijo fresco durante 15 dias de armazenamento.



Para o alho *in natura*, houve uma diminuição de 10,01% dos microrganismos, representada na tabela 4.

Tabela 4. Contagem das Unidades Formadoras de Colônia em log UFC por grama de queijo analisado durante os dias de armazenamento.

	CT	Ain
Dia 1	4,995	5,181
Dia 5	4,491	4,826
Dia 10	4,414	4,662

CT: controle testemunha

Ain: queijo com alho *in natura* (50g/litro de leite utilizado)

No terceiro processamento de queijos, a diminuição da contagem de bactérias foi de 16,78%, 17,64% e 13,01% para os tratamentos SAa125, SAa250 e SAa500 respectivamente (Tabela 5 e Figura 4). Porém, verifica-se que o queijo controle também teve uma redução na contagem microbiana. Por não conter solução aquosa de alho, pode-se relatar que a temperatura de armazenamento (menor que 5°C) possa ser um fator contribuinte para a redução da carga microbiana.

Tabela 5. Contagem das Unidades Formadoras de Colônia em log por grama de queijo analisado durante os 15 dias de armazenamento.

Terceira fabricação de queijos	CT	SAA125	SAA250	SAA500
Dia 1	6,013	6,286	6,167	6,262
Dia 5	5,279	5,892	6,029	5,949
Dia 10	5,447	5,633	5,544	5,839
Dia 15	5,279	5,230	5,079	5,447

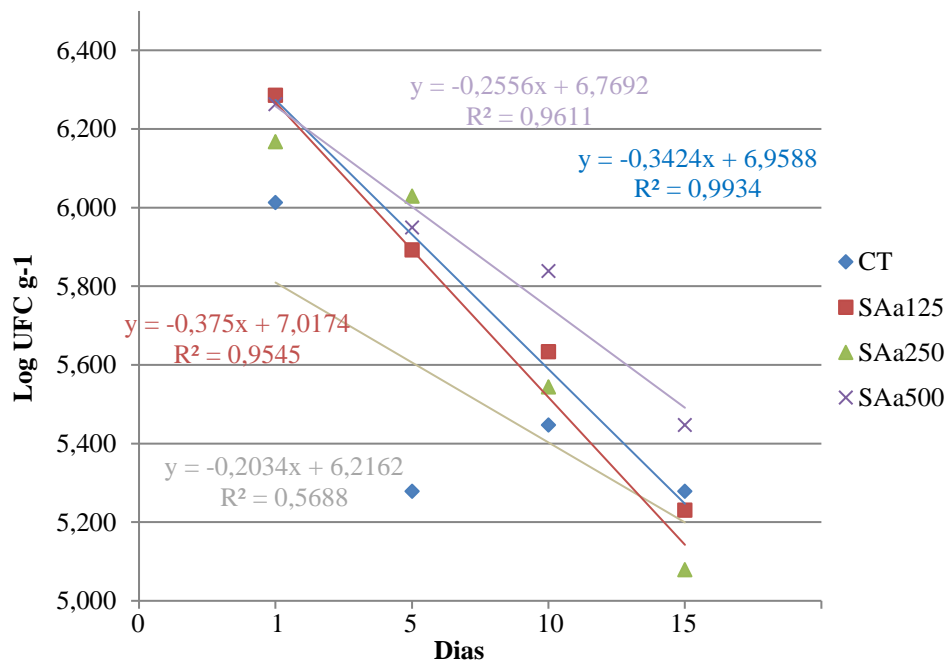
CT: controle testemunha

SAA125: queijo adicionado de 125mL de suspensão aquosa de alho

SAA250: queijo adicionado de 250mL de suspensão aquosa de alho

SAA500: queijo adicionado de 500mL de suspensão aquosa de alho

Figura 4. Contagem de *Staphylococcus aureus* (log UFC g⁻¹) em queijo fresco durante 15 dias de armazenamento.



Para o alho *in natura*, ocorreu diminuição de 3,72% na contagem de bactérias, podendo ser observado na tabela 6.

Tabela 6. Contagem das Unidades Formadoras de Colônia em log por grama de queijo analisado durante os dias de armazenamento.

	CT	Ain
Dia 1	4,770	5,045
Dia 5	4,568	4,869
Dia 10	4,447	4,857

CT: controle testemunha

Ain: queijo com alho *in natura* (50g/litro de leite utilizado)

Observa-se que o melhor tratamento é SAa250 em que houve uma média de diminuição na contagem de *S. aureus* de 8,48%, seguido do tratamento de SAa500 em que a média de diminuição de contagem foi de 7,36%.

Shan et al. (2011) avaliaram os efeitos antimicrobianos de cinco extratos hidroalcoólico (canela, orégano, cravo, casca de romã e semente de uva) contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* em queijo. O extrato de cravo foi o que apresentou maior atividade antibacteriana e antioxidante, demonstrado o potencial do uso de especiarias para o favorecimento da estabilidade e conservação do queijo durante o período de armazenagem.

Os níveis de concentração dos extratos podem variar conforme a espécie do *Allium* sp., seus metabólicos secundários produzidos nos diferentes países, diferentes formas de processar a matéria prima, assim como as concentrações do inócuo para a realização do teste (DERESSE, 2010).

O conteúdo de lipídios e proteínas dos alimentos é um fator que afeta a eficiência dos agentes antimicrobianos naturais, pela possibilidade de formação de barreira física de proteção, impedindo o contato do composto com o micro-organismo, diminuindo assim a efetividade do extrato ou óleo essencial (GUTIERREZ et al., 2008). A atividade antimicrobiana de óleos essenciais de cravo e canela foi prejudicada pela presença de gordura no leite em comparação ao leite desnatado, evidenciando que se faz necessário o estudo da interação dos óleos e extratos com a composição dos alimentos (CAVA et al., 2007).

Hassanien et al. (2014) demonstraram que, em meio de cultura, o óleo de cominho na concentração de 0,1% foi capaz de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enteritidis* e *E. coli*, já nos queijos essa concentração não foi eficiente na inibição de *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Enfatizando assim que as concentrações dos extratos e óleos essenciais variam de acordo com o micro-organismo e sua determinada sensibilidade.

O queijo é um alimento rico nutricionalmente, pois possui altos teores de proteínas e lipídeos. Devido a esta característica, para alcançar um grau de inibição microbiológica eficiente, as concentrações de compostos naturais a serem adicionadas devem ser superiores as concentrações encontradas nos testes *in vitro* (MORO et al., 2015).

Mahajan, Bhat, Kumar (2016) estudaram a utilização de extrato de agulha de pinheiro (*Cedrus deodara* (Roxb.) Loud.) em queijo kalari (uma variedade de queijo duro e seco típico da Índia) obtendo uma diminuição na degradação de proteínas e gorduras, melhorando a conservação durante o período de armazenagem sob refrigeração evidenciando que o extrato pode ser comercialmente explorado também em outros queijos.

Gouvea, Rosenthal, Ferreira (2017) em estudo sobre a adição de extratos vegetais e óleos essenciais como antimicrobianos em queijos evidenciam que extratos e óleos de plantas medicinais como orégano, cominho, pimenta, alecrim e tomilho apresentam uma satisfatória atividade antimicrobiana *in vitro* contra patógenos contaminantes de queijos (CALEJA et al., 2015), representando importante alternativa para a conservação desses produtos. Entretanto, resultados *in vitro* não devem ser considerados como estritamente verdadeiros para alimentos, pois há grande complexidade da matriz alimentar e também fatores de interferência externos e internos do próprio alimento (CALO et al., 2015).

Em relação às características dos queijos, a coloração a partir do quinto dia após aplicação dos tratamentos, deixou de ser branca, tornando-se gradativamente amarelada, sendo que com o passar do tempo a coloração amarela foi predominando em todos os tratamentos, o que pode ter sido favorecido pela contaminação com *S. aureus*. A coloração amarelada acaba prejudicando a aceitação de consumo do queijo, mesmo quando o produto ainda está no prazo de validade (DIAS et al., 2012).

Inicialmente, os queijos apresentaram odor característico do alho de modo fraco e sutil. Esse aspecto é de extrema relevância, uma vez que não compromete fortemente o sabor do alimento. De uma forma geral, sabores e odores predominantes em alimentos, não são desejados na gastronomia, pois comprometem o equilíbrio da iguaria. Ao se utilizar plantas aromáticas e condimentares, objetiva-se associar aromas de modo a realçar o sabor do alimento produzido de forma harmoniosa. Aromas e sabores excessivamente preponderantes, de certa forma, são indesejados por sobressair e assim comprometer a aceitação do consumidor (NASCIMENTO; PRATO, 2016). Com relação a textura e maciez, todos os tratamentos com o passar do tempo foram gradativamente tornando-se ressequidos e endurecidos, apresentando rachaduras em sua superfície.

5 CONCLUSÃO

O *Allium sativum* apresentou atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, tanto na forma de suspensão aquosa como *in natura*. Portanto, foi possível verificar atividade antimicrobiana do alho em queijo frescal contribuindo não só para seu armazenamento como também para seu sabor, representando um diferencial para o produto e assim favorecendo sua comercialização.

6 REFERÊNCIAS

ADLER, B. B.; BEUCHAT, L. R. Death of *Salmonella*, *Escherichia coli* 0157:H7, and *Listeria monocytogenes* in garlic butter as affected by storage temperature. **Journal of Food Protection**, v.65, p.1976-1980, 2002.

ALLI, J. A. et al. In vitro assessments of the effects of garlic (*Allium sativum*) extract on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Advances In Applied Science Research**, Nigeria, v.4, n.2, p.25-36, 2011.

ALORAINY, M. S. Evaluation of antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*) against *E. coli* O 157:H7. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v.4, p.149-157, 2011.

AMORIM, A. L. B. C.; COUTO, E. P.; SANTANA, A. P.; RIBEIRO, J. L.; FERREIRA, M. A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.73, n.4, p.364-367, 2014.

ANKRI, S.; MIRELMAN, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. **Microbes and Infection**, v.2, p.125-129, 1999.

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). 2015. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. Acesso em Maio 2017.

APOLINÁRIO, T. C. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.69, n.6, p.433-442, 2014.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS J. C.; TURCK, M. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p. 493-496, 1966.

BAYAN, L.; KOULIVAND, P. H.; GORJI, A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v.4, n.1, p.1-14, 2014.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v.37, p.263-268, 2004.

BORGES, M. F. et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.26, n.1, p.70-86, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária Instrução Normativa N° 04 DE 01 de março de 2004, Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal (2004).

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria N° 146 de 7 de Março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos.

CALEJA, C. et al. *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. **Journal of Functional Foods**, v.12, p.428-438, 2015.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v.54, p.111-119, 2015.

CAVA, R. et al. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v.70, p.2708-2934, 2007.

CAVALLITO, C. J.; BAILEY, J. H. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial action. **Journal of the American Chemical Society**, v.66, p.1950-1951, 1944.

CHAN, J. Y.; YUEN, A. C.; CHAN, R. Y.; CHAN S. W. A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin. **Phytotherapy Research**, v.27, p.637-646, 2013.

CHOI, K. H.; LEE, H.; LEE, S.; KIM, S.; YOON, Y. Cheese microbial risk assessments – a review. Asian Australas. **Journal of Animal Science**, v.29, p.307–314, 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CORZO-MARTÍNEZ, M. et al. Biological properties of onions and garlic. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, n.12, p.609-625, 2007.

DANTAS, T. L.; NOGUEIRA, P. L.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; MORAIS, M. R. Estudo etnofarmacológico de plantas medicinais: atividade antimicrobiana de extratos de *Allium sativum* L. (alho) e *Bixa orellana* L. (urucum). **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v.14., n.1, p.36-42, 2018.

DAKA, D. Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: An in vitro study. **African Journal Of Biotechnology**, Etiópia, v.4, n.10, p.666-669, 2011.

DERESSE, D. Antibacterial Effect of Garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: An *in vitro* Study. **Asian Journal of Medical Sciences**, v.2, n.2, p.62-65, 2010.

DIAS, N. A. A.; LARA, S. B.; MIRANDA, L. S.; PIRES, I. S. C.; PIRES, C. V.; HALBOTH, N. V. Influence of color on acceptance and identification of flavor of foods by adults. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n.2, p.296-301, 2012.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.2, n.2, p.26-34, 2012.

EL-SAYED, H. S.; CHIZZOLA, R.; RAMADAN, A. A.; EDRIS, A. E. Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated inorganic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery. **Food Chemistry**, v.221, p.196-204, 2017.

FAO, 2013. Production and trade statistics. FAO, Rome, Italy.

FABIANO, G. G.; CAVALCANTI, D. S. P. As principais plantas medicinais utilizadas no Hospital de medicina Alternativa de Goiânia-Goiás. **Saúde & Ciência em Ação**, v.3, n.1, p.1-14, 2017.

FELDBERG, R. S., et al. *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial growth by allicin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.32, p.1763-1768, 1988.

FERNANDES, R. Microbiology handbook: Dairy products, Leatherhead Food International Ltd, UK, 2009.

FERREIRA, M. A.; BERNARDO, L. G.; NEVES, L. S.; CAMPOS, M. R. H.; LAMARO-CARDOSO, J.; ANDRÉ, M. C. P. Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.1, p.1-9, 2016.

FONSECA, G. M.; PASSOS, T. C.; NINAHUAMAN, M. F. M. L.; CAROCI, A. S.; COSTA, L. S. Avaliação da atividade antimicrobiana do alho (*Allium sativum* Liliaceae) e de seu extrato aquoso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.3, p.679-684, 2014.

FRANÇA, I. S. X. Medicina Popular: Benefícios e Malefícios das Plantas Mediciniais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61, n.2, p.201-208, 2008.

GALO, G. T. et al. Estudo da extração da quercetina a partir da cebola roxa (*Allium cepa* L.) e seu uso como conservante alimentar natural. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v.4, n.1, p.0153-0162, 2018.

GOUVEA, F. S.; ROSENTHAL, A.; FERREIRA, E. H. R. Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses: a review. **Ciência Rural**, v.47, n.8, p.2-9, 2017.

GÜNDOĞDU, E.; ÇAKMAKÇI, S.; DAĞDEMİR, E. The Effect of Garlic (*Allium sativum* L.) on Some Quality Properties and Shelf-Life of Set and Stirred Yoghurt. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Sciences**, v.33, n.1, p.27-35, 2009.

GUPTA, S.; KAPUR, S.; VERMA, A. Garlic: An Effective Functional Food to Combat the Growing Antimicrobial Resistance. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v.38, n.2, p.271-278, 2015.

GUTIERREZ, J. et al. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, p.91-97, 2008.

GUTIERREZ, D.; DELGADO, S.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; MARTINEZ, B.; CABO M. L.; RODRÍGUEZ, A. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.8547-8554, 2012.

HACISEFERIGULLARI, H.; OSCAN, M.; DEMIR, F.; CALISIR, S. Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum* L.). **Journal of Food Engineering**, v.68, p.463-469, 2005.

HASSANIEN, M. F. R. et al. Soft cheese supplemented with black cumin oil: impact on foodborne pathogens and quality during storage. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.21, p.280-288, 2014.

HENNEKINNE, J. A.; BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, n.4, p.815-836, 2012.

HOFFMAN, F. L. Microbiologia do leite tipo C comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. **Higiene Alimentar**, v.23, n.65, p.51-54, 1999.

HORITA, C. N.; FARIAS-CAMPOMANE, A. M.; BARBOSA, T. S.; ESMERINO, E. A.; GOMES DA CRUZ, A.; BOLINI, H. M. A.; MEIRELES, M. A. A.; POLLONIO, M. A. R. The antimicrobial, antioxidant and sensory properties of garlic and its derivatives in Brazilian low-sodium frankfurters along shelf-life. **Food Research International**, v.84, p.1-8, 2016.

HORNÍCKOVÁ, J.; KUBEC, R.; CEJPEK, K.; VELÍŠEK, J.; OVESNÁ, J.; STAVELÍKOVÁ, H. Profiles of S-alk(en)ylcysteinesulfoxides in various garlic genotypes. **Czech Journal of Food Sciences**, v.28, n.4, p.298-308, 2010.

IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M. P.; CAMPOS, M. L. C. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais. **Revista de Saúde Pública**, v.14, p.93-100, 1980.

KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. **BioMed Research International**, 2014.

LANZOTTI, V.; SCALA, F.; BONANOMI, G. Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, v.13, p.769-791, 2014.

LAWSON, L. D.; HUGHES, B. G. Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. **Planta Medica**, v.58, p.345-350, 1992.

LAWSON, L. D.; WANG, Z. J. Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2592-2599, 2001.

LAWSON, L. D. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*; Lawson, L. D., Bauer, R., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC; v.691, p.176-209, 1998.

LEUCHNER, R. G. K. AND ZAMPARINI, J. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar *enteridis* in broth model systems and mayonnaise. **Food Control**, v.13, p.399-404, 2002.

LI, G.; MA, X.; DENG, L.; ZHAO, X.; WEI, Y.; GAO, Z. Fresh garlic extract enhances the antimicrobial activities of antibiotics on resistant strains in vitro. **Jundishapur Journal Microbiololy**, v.8, n.5, p.14814, 2015.

LOLLO, P. C. B. P. N.; MORATO, C. S.; MOURA, C. N.; ALMADA, T. L.; FELICIO, E. A.; ESMERINO, M. E.; BARROS, J.; AMAYA-FARFAN, A. S.; SANT'ANA, R. S.; RAICES, M. C.; SILVA, A. G. Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. **Food Research International**, v.76, p.611-617, 2015.

LOZANO, A. F. Q.; BAGNE, L.; HORA, D. C. B. Uma abordagem dos efeitos terapêuticos do *Allium sativum* (alho) no sistema imunológico. **Revista Científica da FHO|UNIARARAS**, v.3, n.1, p.32-36, 2015.

MAGENIS, R. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; STEPHAN, M. P.; EGITO, A.S.; DAGUER, H. Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. **Food Control**, v.45, p.22-28, 2014.

MAHAJANA, D.; BHAT, Z. F.; KUMARC, S. Pine needles (*Cedrus deodara* (Roxb.) Loud.) extract as a novel preservative in cheese. **Food Packaging and Shelf Life**, v.7, p.20-25, 2016.

MAJEWSKI, M. *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v.65, n.1, p.1-8, 2014.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post harvest conditions: A review. **Food Chemistry**, v.211, p.41-50, 2016.

MEDEIROS, M. I.; FILHO, A. N.; SOUZA, V.; MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; CANALEJO, L. M. M. Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* na produção de queijo minas frescal. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.1, p.98-105, 2013.

MELO, J.; ANDREW, P. W.; FALEIRO, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and dairy environment remains a food safety challenge: the role of stress responses. **Food Research International**, v.67, p.75-90, 2015.

- MORO, A. et al. Dairy matrix effect on the transference of rosemary essential oil compounds during cheese making. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.95, p.1507-1513, 2015.
- NASCIMENTO, M. G.; PRATO, T. S. Influência da cor e do odor na discriminação do sabor de um produto. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e tecnologia de Alimentos, 2016.
- NEJAD, A. S. M.; SHABANI, S.; BAYAT, M.; HOSSEINI, S.E. Antibacterial Effect of Garlic Aqueous Extract on *Staphylococcus aureus* in Hamburger. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.7, n.9, p. 131-34, 2014.
- NUNES, M. M.; CALDAS, E. D. Preliminary quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus* enterotoxins in fresh Minas cheese, a popular food in Brazil. **Food Control**, v.73, p.524-531, 2017.
- OLIVA, F. A.; AMIN, M. V.; FERNANDES, D.; POCAIA, A. P. V.; LIMA, B. C.; CARVALHO, L. O.; LIMA, L. A. Análises de custos e lucratividade da cultura do alho. **Colloquium Agrariae**, v.13, p.30-34, 2017.
- OLIVEIRA, C. P.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SILVA, J. A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v.7, n.1, p.09-15, 2012.
- OLIVEIRA, A. M.; KURIHARA, R. Y.; SILVA, F. F.; SILVA, G. G.; RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; BELOTI, V. Condições higiênico-sanitárias da produção de queijos tipo mussarela e minas frescal comercializados no norte do Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.72, n.1, p.40-47, 2017.
- OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H.; LEE, S. H. I.; GONÇALVES, B. L.; BARANCELLI, G. V. Pathogenic Bacteria in Cheese, Their Implications for Human Health and Prevention Strategies. **DAIRY MILK IN CONTEXT: THE DAIRY COW, MILK PRODUCTION, AND YIELD**, 2017.
- OTA, C. C. C.; GOMES DA SILVA, D. V.; JACON, K. C.; BAURA, V.; NUNES, S. Avaliação da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* (alho). **Tuiuti: Ciência e Cultura**, n.43, p.37-49, 2010.
- PERIN, L. M.; SARDARO, L. S.; NERO, L. A.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v.65, p.160-169, 2017.
- QUEIROZ, M. M.; ROSSI, B. F.; CASTILHO, I. G.; RALL, V. L. M. Hygienic-sanitary quality of Minas fresh cheeses sold in the city of Botucatu, São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.84, p.1-6, 2017.
- RAHMAN, M. M.; FAZLIC, V.; SAAD, N. W. Antioxidant properties of raw garlic (*Allium sativum*) extract. **International Food Research**, v.19, n.2, p.589-593, 2012.

RYBAK, M. E.; CALVEY, E. M.; HARNLY, J. M. Quantitative determination of allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of allin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.682-687, 2004.

REITSMA, C. J.; HENNING, D. R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, v.59, n.5, p.460-464, 1996.

SAHA, S. K.; SAHA, S.; AKHTER, S. M.; KHATUN, S.; ISLAM, M. M.; ROY, P. In Vitro Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Aqueous Garlic Extract and Imipenem against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Mymensingh Medical Journal**, v.25, n.3, p.477-484, 2016.

SAKAGAMI, Y.; KAIOH, S.; KAJIMURA, K.; YOKOYAMMA, H. Inhibitory effect of clove extract on vero-toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Biocontrol Science**, v.5, p.47-49, 2000.

SALLAM, K. I.; ISHIOROSHI, M.; SAMEJIMA, K. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage, **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v.37, p.849-855, 2004.

SAMPAIO, M. P.; SIQUEIRA JUNIOR, C. L. Agricultura sustentável: a busca por alimentos mais saudáveis. **Raízes e Rumos**, v.5, p.197-203, 2017.

SANTANA, E. H. W. Determinação do perigo de consumo do leite cru relacionado a intoxicação estafilocócica. Londrina, PR. Tese de Doutorado. **Universidade Estadual de Londrina - UEL**; 2006.

SANTOS, D.; OLIVEIRA, M. Turismo e gastronomia: o patrimônio imaterial alimentar em Minas Gerais, Brasil. **Revista Turismo & Desenvolvimento**, n.27, p.1097-1102, 2017.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; BROOKS J. D.; CORKE H. Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. **Journal of Medicinal Food**, v.14, p.284-290, 2001.

SHEELA, C. G.; KUMUD, K.; AUGUSTI, K. T. Antidiabetic effect of onion and garlic sulfoxideamino acids in rats. **Planta Medica**, v.61, p.356-357, 1995.

SHORI, A. B.; BABA, A. S. Survival of *Bifidobacterium bifidum* in cow- and camel-milk yogurts enriched with *Cinnamomum verum* and *Allium sativum*. **Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences**, v.18, p.7-11, 2015.

SILVA, F. T. Queijo minas frescal. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.

SOFFAR, S. A.; MOKHTAR, G. M. Evaluation of the antiparasitic effect of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract in hymenolepiasisnana and giardiasis. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.21, p.497-502, 1991.

SOUZA, T. B.; CRUZ, A. G.; MOURA, M. R. L.; VIEIRA, A. C. M.; SANT'ANA, A. S. Microscopic quality indicators of Minas frescal cheese. **Food Control**, v.19, p.71-75, 2008.

TEIXEIRA, V. T. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v.64, n.366, p.12-21, 2009.

TERPOU, A.; GIALLELI A. I.; BOSNEA, L.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A.; CASTRO, G. R. Novel cheese production by incorporation of sea buckthorn berries (*Hippophae rhamnoides L.*) supported probiotic cells. **Food Science and Technology**, v.79, p.616-624, 2017.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. Microbiologia. *Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRANI, P. E. Cultura do alho (*Allium sativum*): Diagnóstico e recomendações para seu cultivo no Estado de São Paulo. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/alho/index.htm. Acesso em: 10/5/2017.

VILLARRUEL-LOPEZ, A.; CASTRO-ROSAS, J.; OMEZ-ALDAPA, C. A.; NUÑO, K.; TORRES-VITELA, M. R.; GARAY-MARTINEZ, L. E. Indicator microorganisms, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcal enterotoxin*, and physicochemical parameters in requeson cheese. **African Journal of Food Science**, v.10, n.9, p.178-184, 2016.

YADAV, S.; TRIVEDI, N. A.; BHATT, J. D. Antimicrobial activity of fresh garlic juice: An *in vitro* study. **Ayu Journal**, v.36, n.2, p. 203-207, 2015.

ZOCHE, F.; BASTOS, C. P.; BASSANI, M. T.; FRANÇA, R. C.; LIMA, A. S.; SILVA, W. P. Estafilococos coagulase positiva em queijos Minas Frescal e Minas Padrão comercializados em Pelotas, Rio Grande do Sul. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.30, n.1, p.119-124, 2012.