



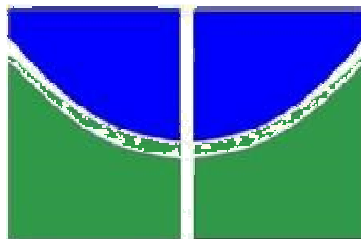
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA AÇÃO DA
NATAMICINA SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS**

KAMILA FERREIRA COSTA SERAFINI

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA AÇÃO DA
NATAMICINA SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS**

KAMILA FERREIRA COSTA SERAFINI

ORIENTADORA: MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 121

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2016**

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA AÇÃO DA NATAMICINA
SOBRE MICRO- ORGANISMOS PATOGÊNICOS

KAMILA FERREIRA COSTA SERAFINI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS A
OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

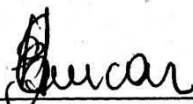
APROVADA POR:



MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA, Dra. (Universidade de Brasília)
Orientadora



MARCOS RODRIGUES DE MATTOS, Dr. (Universidade Federal de Lavras)
(Membro externo)



ERNANDES RODRIGUES ALENCAR, Dr. (Universidade de Brasília)
(Membro externo)

BRASÍLIA/DF, 17 DE FEVEREIRO DE 2016

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SERAFINI, K.F.C. **Estudo da influência da concentração de sal na ação da natamicina sobre micro-organismos patogênicos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 29p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos; foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Serafini, Kamila Ferreira Costa

Estudo da influência da concentração de sal na ação da natamicina sobre micro-organismos patogênicos. /Kamila Ferreira Costa Serafini Orientação de Márcia de Aguiar Ferreira, 2016. 29p.: il.

Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Veterinária, 2016.

1. Conservantes. 2. Salmoura. 3. *Candida albicans*. 4. *Escherichia coli*. I. Ferreira, Márcia de Aguiar.
II. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida e família abençoadas que me permitiu ter, por guiar meus passos em busca dos meus objetivos e me presentear com pessoas especiais no convívio diário em busca da realização pessoal e profissional.

Ao meu marido Clóvis, meu parceiro em todos os momentos. Sempre pude contar com seu apoio, em todos os obstáculos encontrados no caminho. Você me ajudou a ser forte e acreditar que seria capaz. Muito obrigada por ser este marido especial.

Aos meus pais, Camilo e Vera, pelo apoio às minhas escolhas. Por me apoiarem quando ainda menina, resolvi ganhar o mundo e ir em busca dos meus sonhos. Vocês são meu exemplo de honestidade, trabalho e amor. Qualquer agradecimento seria insuficiente por tudo que vocês representam em minha vida.

Ao meu irmão Marcelo, pelo carinho e força, e a quem admiro muito pelo que vem conquistando a cada dia. À minha afilhada Ana Laura por cada sorriso, por tornar a minha vida mais leve e cheia de amor. À minha sogra e meu sogro pelo carinho e por serem meus exemplos para seguir na vida acadêmica.

Aos amigos do Laboratório de Análises de Leite e Derivados-LABLEITE por me receberem com toda paciência e atenção. Pelas oportunidades diárias de aprendizado, em especial ao Emanuel Pereira Couto pela paciência no início do projeto e à Jaqueline Lamounier por toda ajuda e risadas diárias.

À minha orientadora Márcia de Aguiar Ferreira, que abriu as portas do laboratório para que eu pudesse realizar este projeto, que confiou no meu trabalho e em minha dedicação. Por ter se tornado além de exemplo, uma grande amiga para toda vida. Obrigada por estar ao meu lado nos piores e melhores momentos.

À Associação Brasileira das Indústrias de Queijo na pessoa da professora Maria Cristina Mosquim, por todo o apoio, confiança e amizade. À Cap-Lab e DSM pela doação do material utilizado na realização desta pesquisa.

Ao técnico em laticínios e amigo Fernando Cabral Viana, pela troca de experiências e ensinamentos. À Loiane de Souza, que além de sócia se tornou uma grande amiga, obrigada pela parceria de sempre. A amiga Cristiane Campos pelo carinho e ajuda neste momento importante da minha vida e a todos os amigos de Divinópolis, Viçosa, Goiânia e de tantos outros lugares por onde passei: vocês sempre serão lembrados com muita saudade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi

CAPÍTULO I

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA AÇÃO DA NATAMICINA SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS.....	1
INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	6
CONCLUSÕES	12
REFERÊNCIAS.....	13

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>S. natalensis</i>	<i>Streptomyces natalensis</i>
<i>S. chattanoogensis</i>	<i>Streptomyces chattanoogensis</i>
<i>S. lydicus</i>	<i>Streptomyces lydicus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
FDA	Food and Drug Administration
CAC	Comissão do Codex Alimentarius
H2O pep.	Água peptonada
NaCl	Cloreto de sódio
T0	0 horas
T1	24 horas
T2	48 horas
A1	Tratamento 1
A2	Tratamento 2
A3	Tratamento 3
S.S.	Solução salina
Aa	Atividade de água
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mg	Miligrama
dm	Densímetro
UFC	Unidade formadora de colônia
°C	Grau Celsius

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de <i>C. albicans</i> após adição de natamicina (0,025%), por 0, 24 e 48 h, por 0, 24 e 48 h, em diferentes concentrações salinas.	7
Tabela 2 Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes às contagens de <i>C. albicans</i> (A) e <i>E. coli</i> (B) quando associadas e expostas a natamicina (0,025%), por 0, 24 e 48 h, em diferentes concentrações salinas.	8
Tabela 3 Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de <i>S. aureus</i> após a adição de natamicina (0; 0,025; 0,05; e 0,1%), em 0 (A), 24 (B) e 48 h (C), em diferentes concentrações salinas.	9
Tabela 4 Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de <i>E. coli</i> exposta a natamicina 0, 0,025, 0,050 e 0,100%, por 0 (A), 24 (B) e 48 h (C), em diferentes concentrações salinas.	11
Tabela 5 Resultados médios obtidas na avaliação do efeito da natamicina sobre as contagens (log UFC/mL) de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i> inoculados em água peptonada.	12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da natamicina	2
Figura 2	Contagens de <i>C. albicans</i> após adição de natamicina (0,025%), em 0, 24 e 48 h, e diferentes concentrações salinas.	6
Figura 3	Contagem de <i>C. albicans</i> (A) e <i>E. coli</i> (B) quando em associação e após a adição de natamicina (0,025%), por 0, 24 e 48 h, em diferentes concentrações salinas.	8
Figura 4	Contagem de <i>S. aureus</i> após adição de natamicina em 0 (A), 24 (B) e 48 h (C) e diferentes concentrações salinas.	9
Figura 5	Contagem de <i>E.coli</i> após adição de natamicina 0, 0,025, 0,050 e 0,100%, por 0 (A), 24 (B) e 48 h (C), em diferentes concentrações salinas.	10
Quadro 1	Tratamentos para avaliação da ação da natamicina sobre contagens de <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .	5

RESUMO

Micro-organismos patogênicos podem contaminar os alimentos por meio da manipulação, higienização e controle ambiental insatisfatórios. Além da adoção das Boas Práticas, o uso de antimicrobianos em alimentos constituiu um passo importante para o controle de doenças infecciosas. Nos sistemas em que ocorre migração do composto ativo para o alimento devem ser considerados apenas aqueles que são aprovados como aditivos alimentares. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da concentração de sal na ação da natamicina sobre micro-organismos patogênicos visto que este conservante tem sido utilizado em banhos de imersão em diversos laticínios no país. Cepas de *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram inoculadas em diferentes concentrações salinas e em água peptonada e receberam tratamentos com natamicina. Estas soluções foram mantidas a temperatura de 12°C e o comportamento dos micro-organismos avaliados com 0, 24 e 48 horas (T0, T1 e T2). Cada micro-organismo foi avaliado isoladamente bem como a associação de *C. albicans* e *E. coli*. Nas condições propostas pela pesquisa, foi possível concluir que a natamicina 0,025% não apresenta eficácia sobre *Candida albicans* inoculada em concentrações salinas abaixo de 5%. Os resultados obtidos nas contagens de *E. coli* sugerem que a natamicina pode interferir no seu desenvolvimento mesmo em concentrações que podem ser consideradas baixas (0,1%) e em condições de salinidade de 7,5% a 10%. A associação da natamicina com cloreto de sódio potencializa a sua ação antimicrobiana podendo representar economia e o seu uso ser ampliado pelas indústrias.

Palavras-chave: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, salmoura, conservantes.

ABSTRACT

Pathogenic microorganisms can contaminate food through manipulation cleaning and environmental control unsatisfactory. Besides the adoption of good practice, the use of antimicrobials in food established an important step for the control of infectious diseases. In systems which there are migration from the active ingredient to the food they should be regarded only those compounds that are approved as food additives. The purpose of this study was to evaluate the influence of the concentration of salt in the action of natamycin over pathogenic micro-organisms since this preservative has been used in immersion baths in several dairy products in the country. Strains of *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were inoculated in different salt concentrations and in peptone water and were treated with natamycin. These solutions were maintained at temperature of 12 ° C and the behavior of micro-organisms assessed at 0, 24 and 48 hours (T0, T1 and T2). Each microorganism was evaluated singly as well as the combination of *C. albicans* and *E. coli*. As proposed by the survey it was concluded that the 0.025 % natamycin has no effect on *Candida albicans* inoculated in salt concentrations below 5 %. The results obtained from the *E. coli* counts suggests that natamycin can interfere with their development even at concentrations that may be considered low (0.1 %) and saline conditions of 7.5 % to 10 %. The combination of natamycin with sodium chloride enhances its antimicrobial activity may represent the economy and its use be extended by industries.

Keywords: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, brine, preservatives.

CAPÍTULO I

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA AÇÃO DA NATAMICINA SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS.

INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são atribuídas à ingestão de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados, além da contaminação por contato do alimento com as mãos do manipulador (BRASIL, 2005; OLIVEIRA, 2010). No Brasil entre os anos de 1999 a 2008, as bactérias foram identificadas como o agente etiológico responsável por 84% dos surtos (OLIVEIRA, 2010). Segundo dados do Ministério da Saúde, o leite e seus derivados estão dentre os alimentos envolvidos nos surtos alimentares no país de 2000 a outubro de 2015 (BRASIL, 2015).

A maioria das DTAs estão ligadas às más condições da matéria prima, aos maus hábitos dos manipuladores e à higienização e controle ambiental insatisfatórios (NOLLA, 2005). Estudos indicam que *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão entre os principais agentes etiológicos envolvidos nestes surtos (FISHER, 2013; BRASIL, 2012).

Outros micro-organismos como a levedura *Candida albicans*, também podem contaminar alimentos por meio da manipulação (MEDEIROS, 2012). Este micro-organismo faz parte da microbiota natural dos seres humanos, tendo como habitat as membranas mucosas da boca, do trato intestinal e geniturinário sendo um patógeno oportunista que pode proliferar quando há um desequilíbrio da microbiota do meio (ROSENBAACH, 2010; TORTORA, 2012). Estudos relatam também, a capacidade dos fungos e leveduras em se desenvolverem em ambientes com baixa atividade de água (TUDOR & BOARD, 1993; SAMSON, 2002).

S. aureus tem sido frequentemente envolvido em surtos de DTA, e está associado à manipulação inadequada dos alimentos sendo encontrado na pele e mucosas do trato respiratório superior em humanos (GIOLO, 2014). Este micro-organismo possui a capacidade de desenvolvimento em baixa atividade de água sendo considerado, de acordo com Garrity et al (2003), como extremamente halofílico com capacidade de tolerância a concentrações de até 15% de NaCl.

A busca de informações sobre a epidemiologia de *E. coli* e seus reservatórios tem sido o foco de atenção, devido ao aumento de surtos alimentares causados em todo o mundo

(MACHADO, 2014). Vários estudos tem relatado a capacidade de desenvolvimento deste patógeno em ambientes com alta salinidade (HRENOVIC E IVANKOVIC, 2009; DON, 2009; HOW et al., 2013).

Para controle das DTA's, além da adoção das Boas Práticas, existem outros mecanismos para diminuição da contaminação dos alimentos por micro-organismos indesejáveis. Entre estes mecanismos o desenvolvimento e uso de antimicrobianos constituíram um passo importante para o controle de doenças infecciosas (PUTMAN et al., 2000). Alguns destes, para uso em alimentos, e a escolha de qual será utilizado envolve tanto a atividade antimicrobiana em si quanto a possibilidade deste entrar em contato com o alimento (PIRES, 2014).

Alguns autores discordam do uso de antimicrobianos em alimentos relatando a possibilidade de resistência bacteriana, porém, estudos confirmam que o antimicrobiano quando utilizado de forma adequada e dosagem recomendada não causa resistência de micro-organismos (BANDEIRA et al., 2014; MUCINHATO et al., 2015; WELSCHER et al., 2007; BRUSTOLIN, 2009).

Em sistemas em que ocorre migração do composto ativo para o alimento, devem ser considerados apenas aqueles compostos aprovados como aditivos alimentares (RESTUCCIA, 2010). Como a natamicina (Figura 1), que é um antifúngico macrolídeo polienico produzido por cepas de *Streptomyces*, como *S. natalensis*, *S. chattanoogensis* e *S. lydicus* (APARICIO et al., 2003; ATTA et al., 2015). A natamicina está entre os derivados poliênicos amplamente utilizados para tratamento de ceratite fúngica em animais e, a sua utilização tópica foi o primeiro antifúngico aceito pela *Food and Drug Administration* (FDA) (CLODE,2010). Também é utilizada em humanos para tratamento tópico de ceratite bacteriana e fúngica, boca, pele e infecções vaginais e, na indústria alimentícia como conservante para queijos, salames, iogurtes, e em alguns países, sucos e vinhos (MALECHA, 2004; DALHOFF, 2015).

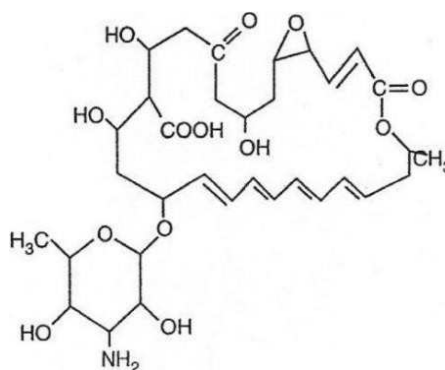


Figura 1: Estrutura química da natamicina (Cé, 2009)

Esse antimicrobiano faz parte do grupo dos conservantes da lista de aditivos alimentares autorizados na União Europeia e está aprovada pela FDA dos Estados Unidos da América para aplicação em superfície de queijos. (EFSA, 2009). A natamicina apresenta atividade antimicrobiana preferencialmente, contra leveduras e bolores, sendo que a sua ação sobre o desenvolvimento de bactérias, protozoários e vírus é considerada inexpressiva sendo, portanto, pouco estudada (BRASIL, 1996; MYERS, 2006; EFSA, 2009; RESTUCCIA, 2010; RAMOS et al, 2012; VENTURINI, 2012). Entretanto, Atta et al. (2015) demonstraram que a natamicina produzida por *S. lydicus* apresentou ação efetiva sobre *C. albicans*, e diversas bactérias como *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa*, e bolores e leveduras. De acordo com dados do Ministério da Saúde, estes micro-organismos foram identificados entre os agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA no Brasil de 2000 a outubro de 2015 (BRASIL, 2015).

Na Resolução Mercosul/GMC n° 79/94 e no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos, instituído pela Portaria 146/1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento consta a natamicina na tabela “Aditivos e Coadjuvantes e Tecnologia ou Elaboração”, para uso em superfície como conservador com limite máximo de 1mg/dm² não detectável a 2 mm de profundidade, sendo ausente na massa (BRASIL,1996). Brustolin (2009) relata que a natamicina é utilizada para o controle de bolores e leveduras na superfície de queijos. Segundo Furtado (2005), a natamicina tem sido utilizada em banhos após a salmoura na forma de solução aquosa (de 0,1 a 0,2%) em inúmeros laticínios do país.

Dentre as várias formas de se proceder a salga de queijos, destaca-se a imersão do produto em salmoura, cujo período de tempo varia em função do tipo de queijo (BEHMER, 1991). As salmouras são um ponto crítico de controle no fluxograma de produção de queijos, pois representam uma importante fonte de contaminação (AMARAL et al, 1991). Estes mesmos autores em pesquisa realizada, observaram elevados índices de contaminação por coliformes totais, *S. aureus* e leveduras com contagens de 7,8 x 10¹² UFC/mL; 2,3 x 10³ UFC/mL e 7,4 x 10⁵ UFC/mL, respectivamente. Segundo Furtado (1991), sempre que a contagem global da salmoura exceder 10⁵ UFC/mL é necessária a sua correção e recuperação que envolve: reajuste do teor de sal; correção da acidez titulável 0,2% (m/v) de ácido láctico; redução da carga microbiana por tratamento térmico ou por meio de produtos químicos como o peróxido de hidrogênio ou hipoclorito de sódio.

A legislação é muito pouco específica ao tratar de salmouras, não mencionando, por exemplo, quais produtos podem ser utilizados para a sanitização ou para correção do pH. A redução da carga microbiológica de salmoura é feita tradicionalmente, por tratamento térmico

ou por meio da adição de produtos químicos como peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e dióxido de cloro (FONSECA, 1996; de LIMA SANTOS et al, 2008; BORTOLON, 2013).

Apesar da recomendação do uso da natamicina na produção de queijo estar limitada à aplicação por aspersão ou por imersão em soluções aquosas, com concentrações variando em torno de 0,1% a 0,4% (OLIVEIRA et al., 2006), na prática profissional é possível constatar o seu uso como coadjuvante no tratamento de salmouras. Entre as justificativas destaca-se a de facilitar o fluxograma de produção de queijos, pois a aplicação por banhos de imersão torna o processo mais lento havendo ainda, a necessidade de correção constante das concentrações do antimicrobiano. Essa utilização tem se difundido e, a concentração utilizada nos tanques de salmoura, geralmente é de natamicina a 0,025%.

Em julho de 2015 na 38ª sessão da Comissão do Codex Alimentarius realizada em Genebra, foi definida a necessidade de revisão dos parâmetros dos conservantes à base de sorbatos, propionatos, nisina e natamicina, que atualmente são permitidos no queijo do tipo mussarela, pelos padrões definidos pelo Codex (CODEX STAN 262-2006). Na ocasião, foi solicitado que cada país se manifeste sobre a justificativa tecnológica do uso da natamicina nesse queijo (CAC, 2015), demonstrando o grande interesse na avaliação desse antimicrobiano na indústria de lácteos.

O objetivo dessa pesquisa foi verificar a ação da natamicina (Delvolid Plus®) sobre o desenvolvimento de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* em diferentes concentrações salinas, bem como seu efeito na associação de *C. albicans* com *E. coli*, a fim de verificar a sua efetividade nessas condições.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local da pesquisa

O trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Leite e Derivados localizado na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília no período de janeiro de 2015 a janeiro de 2016.

Preparo dos inóculos e tratamentos

Para preparo dos inóculos utilizou-se as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, de *Escherichia coli* ATCC 25922 e de *Candida albicans* SC5314, que foram

inoculadas em solução salina 0,85% de forma a se obter um grau de turvação correspondente ao tubo 1 da escala de McFarland (Nefelobac®, Probac do Brasil), que representa uma concentração de aproximadamente $3,0 \times 10^8$ UFC/mL; após, procedeu-se diluições sucessivas, a fim de se atingir a concentração aproximada de $3,0 \times 10^4$ UFC/mL dos micro-organismos testados. A natamicina utilizada foi o produto Delvocid Plus® (Delvocid, DSM Food Specialties), e os tratamentos avaliados foram os contidos no Quadro 1.

Foram realizados tratamentos em água peptonada para *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* e para associação de *C. albicans* e *E. coli*. Nos tratamentos com *C. albicans* e associação de *C. albicans* e *E. coli* foi avaliada a concentração de 0,025% de natamicina, já nos tratamentos com *E. coli* e *S. aureus* foram avaliadas as concentrações de 0,025%, 0,05% e 0,1% de natamicina além do controle sem adição de natamicina (0%).

Quadro 1. Tratamentos para avaliação da ação da natamicina sobre contagens de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

<i>C. albicans</i>	A1 (*Natamicina 0,025% adicionada em SS 0,85%; SS 2%; SS 5%; SS 7,5%; SS 10%)
<i>S. aureus</i>	A0 (SS 0,85%; SS 2%; SS 5%; SS 7,5%; SS 10%)
	A1 (*Natamicina 0,025% adicionada em SS 0,85%; SS 2%; SS 5%; SS 7,5%; SS 10%)
	A2 (*Natamicina 0,05% adicionada em SS 0,85%; SS 2%; SS 5%; SS 7,5%; SS 10%)
	A3 (*Natamicina 0,1% adicionada em SS 0,85%; SS 2%; SS 5%; SS 7,5%; SS 10%)
<i>E. coli</i>	A0 (SS 0,85%; SS 2%; SS 5%; SS 7,5%; SS 10%)
	A1 (*Natamicina 0,025% adicionada em SS 0,85%; SS 2%; SS 5%; SS 7,5%; SS 10%)
	A2 (*Natamicina 0,05% adicionada em SS 0,85%; SS 2%; SS 5%; SS 7,5%; SS 10%)
	A3 (*Natamicina 0,1% adicionada em SS 0,85%; SS 2%; SS 5%; SS 7,5%; SS 10%)
<i>C. albicans</i> + <i>E. coli</i>	A1 (*Natamicina 0,025% adicionada em SS 0,85%; SS 2%; SS 5%; SS 7,5%; SS 10%)

A1: tratamento 1; A2: tratamento 2; A3: tratamento 3; SS: Solução Salina

* Delvocid Plus®

Para as contagens de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* utilizou-se o sistema Rida®Count Staph. Aureus, Rida®Count E.coli/Coliform e Rida®Count Yest & Mold Rapid (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) respectivamente, conforme recomendações do fabricante.

Todos os micro-organismos testados foram avaliados imediatamente após a inoculação (T0), em 24h (T1) e em 48h (T2) sendo mantidos em temperatura médias de 12 °C, e avaliados em triplicata. Os resultados das contagens dos micro-organismos pesquisados foram convertidos em log₁₀.

Adotou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado em triplicata. Na avaliação do efeito da natamicina sobre *S. aureus* e *E. coli*, adotou-se esquema fatorial 4x5x3, sendo quatro concentrações de natamicina (0, 0,025%, 0,05% e 0,1%), cinco concentrações da solução salina (0,85%; 2%; 5%; 7,5%; 10%) e três períodos de avaliação (0, 24 e 48h).

Na avaliação do efeito da natamicina sobre *C. albicans* e sobre *C. albicans* e *E. coli* associados, adotou-se esquema fatorial 5x3, sendo cinco concentrações da solução salina (0,85%; 2%; 5%; 7,5%; 10%) e três períodos de avaliação (0, 24 e 48h). Realizou-se análise de regressão, sendo os gráficos plotados com software SigmaPlot 10.0. Utilizou-se estatística descritiva na análise do efeito da natamicina sobre *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* inoculados em água peptonada

RESULTADOS E DISCUSSÃO

C. albicans foi submetida a tratamentos em soluções salinas distintas e em água peptonada adicionados de natamicina 0,025%, que segundo observações em indústrias corresponde à concentração utilizada nas salmouras. Entretanto, apenas a partir da inoculação em solução salina a 5% e, em 48 horas não se observou desenvolvimento da levedura (Figura 2). Quando a levedura foi inoculada em água peptonada, não se observou eliminação em nenhum dos tempos avaliados, apenas tendência à redução indicando que a presença de matéria orgânica na salmoura de queijos, pode interferir na ação do antimicrobiano (Tabela 5).

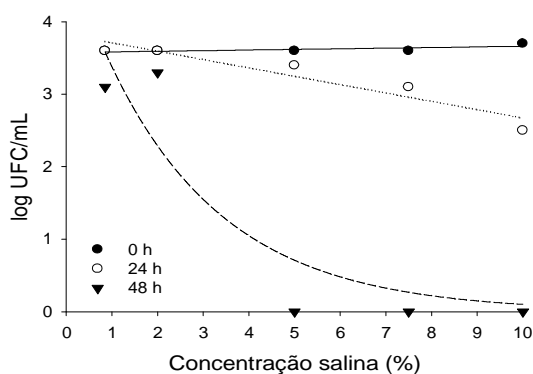


Figura 2. Contagens de *C. albicans* após adição de natamicina (0,025%), em 0, 24 e 48 h, e diferentes concentrações salinas.

Tabela 1. Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de *C. albicans* após adição de natamicina (0,025%), por 0, 24 e 48 h, por 0, 24 e 48 h, em diferentes concentrações salinas.

Período de exposição (h)	Equação de regressão ajustada	R ²
0	$\hat{y} = 3,58$	-
24	$\hat{y} = 3,82 - 0,12 * X$	0,90
48	$\hat{y} = 4,99e^{-0,39X}$	0,85

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

De acordo com pesquisas de Welscher et al. (2007) e Samson (2002) a maioria dos fungos possui capacidade de desenvolvimento em condição de baixa atividade de água, que pode ser alcançada por adição de cloreto de sódio como realizado nesta pesquisa. Porém, na avaliação do efeito da natamicina 0,025% sobre a associação de *C. albicans* com *E. coli*, não se observou desenvolvimento da levedura após 24 horas, tanto quando inoculada em solução salina ou em água peptonada (Figura 3 A) .

Segundo Tortora (2012), *C. albicans* é um patógeno oportunista que pode proliferar quando a microbiota bacteriana do meio é suprimida. No ensaio contendo apenas *C. albicans*, observou-se desenvolvimento que foi inibido pela natamicina a partir de 48 horas quando em solução salina maior que 5%. Já na associação de *C. albicans* com *E.coli*, a presença da bactéria no meio inviabilizou o crescimento da levedura. Este resultado corrobora com o estudo de Peleg et al (2010), no qual foram relatadas interações entre *C. albicans* e bactérias. Segundo os autores, estas interações têm sido associadas com redução da viabilidade fúngica, que pode ser atribuída à secreção de moléculas antifúngicas por bactérias, pela transferência direta de toxinas das bactérias para as células fúngicas ou pela depleção de nutrientes.

Estas interações somadas à ação da natamicina sobre *C. albicans* e *E. coli* acarretam em redução na contagem final destes micro-organismos. De acordo com Myers (2006) e Cong et al. (2007), a natamicina possui ação antimicótica por sua preferência pelo ergosterol, um esterol presente especialmente na membrana celular de fungos e pouco encontrado em bactérias.

As contagens de *E. coli* nessa associação apresentaram reduções maiores que um ciclo log somente nas avaliações após 48 horas, quando inoculada em soluções salinas de 2%, 5% e 7,5% e não se observou crescimento da levedura quando em solução salina 10% (Figura 3 B). Quando a associação foi realizada em água peptonada, não ocorreu redução nas contagens de *E. coli* (Tabela 5).

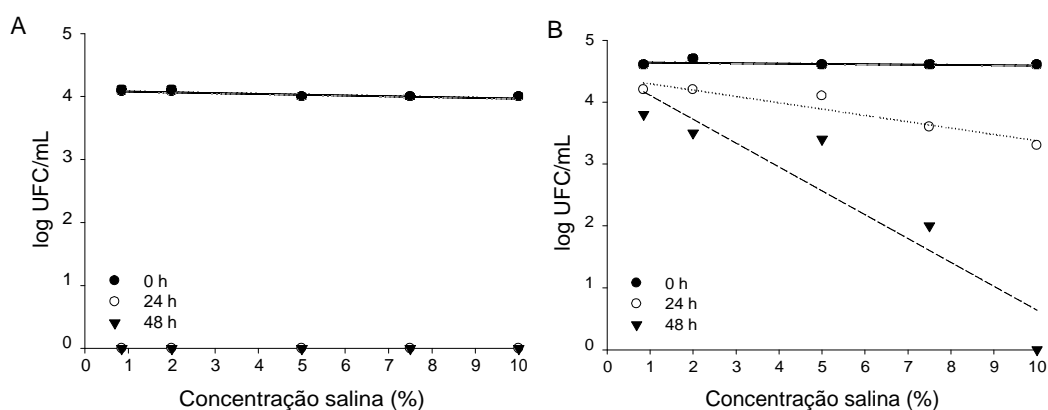


Figura 3. Contagem de *C. albicans* (A) e *E. coli* (B) quando em associação e após a adição de natamicina (0,025%), por 0, 24 e 48 h, em diferentes concentrações salinas.

Tabela 2. Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes às contagens de *C. albicans* (A) e *E. coli* (B) quando associadas e expostas a natamicina (0,025%), por 0, 24 e 48 h, em diferentes concentrações salinas.

Espécie	Período de exposição (h)	Equação de regressão ajustada	R ²
<i>C. albicans</i>	0	$\hat{y} = 4,10$	-
	24	$\hat{y} = 0$	-
	48	$\hat{y} = 0$	-
<i>E. coli</i>	0	$\hat{y} = 4,65$	-
	24	$\hat{y} = 4,40 - 0,10 * X$	0,90
	48	$\hat{y} = 4,50 - 0,39 * X$	0,86

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Nos ensaios realizados com *S. aureus* não se observou redução em nenhum dos tratamentos avaliados (Figura 4), sendo que nas inoculações em água peptonada, as contagens aumentaram expressivamente (Tabela 5). Ramos et al. (2012), em estudo com filmes comestíveis, afirmaram que a natamicina não possui ação contra bactérias. *S. aureus* é uma bactéria Gram positiva e sua parede celular está constituída por muitas camadas de peptideoglicano que formam uma estrutura espessa e rígida que pode impedir a ação de alguns antimicrobianos sobre o microrganismo (JAY, 2005; SILVA, 2010; TORTORA, 2012). Além de serem tolerantes a concentrações de sal de 10% a 20% e a nitratos, com capacidade de multiplicação em condições de atividade de água (Aa) inferiores a 0,86 (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

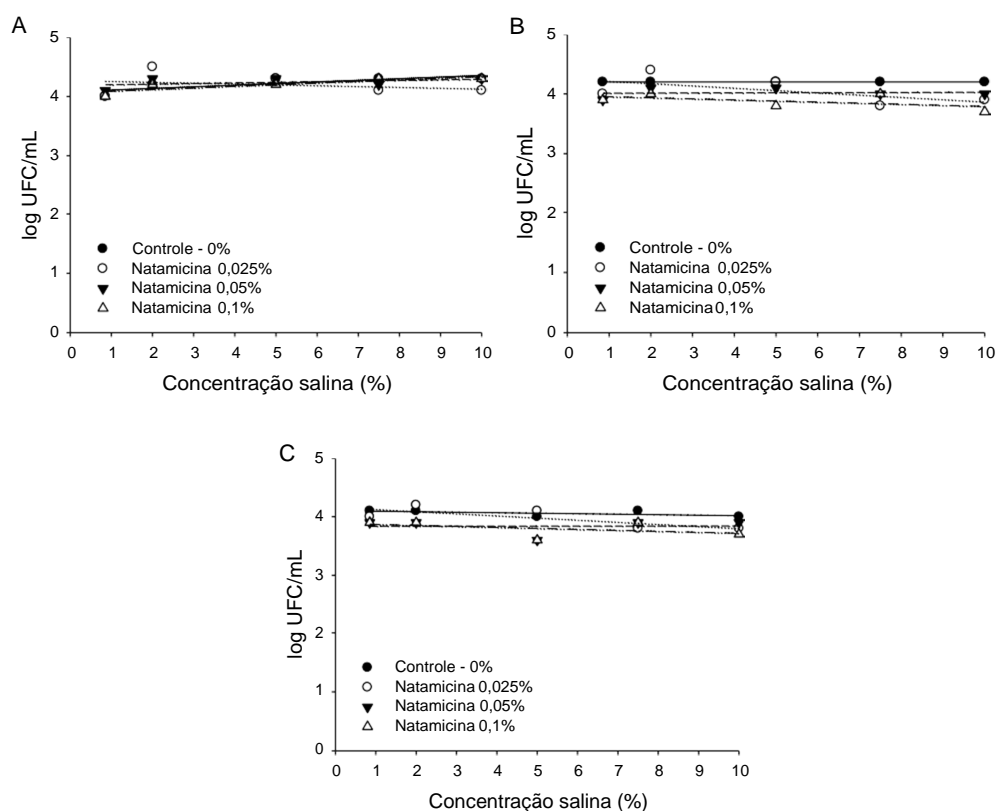


Figura 4. Contagem de *S. aureus* após adição de natamicina em 0 (A), 24 (B) e 48 h (C) e diferentes concentrações salinas.

Tabela 3. Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de *S. aureus* após a adição de natamicina (0; 0,025; 0,05; e 0,1%), em 0 (A), 24 (B) e 48 h (C), em diferentes concentrações salinas.

Período de exposição (h)	Concentração de natamicina (%)	Equação de regressão ajustada	R ²
0	Controle - 0	$\hat{y}= 4,08$	-
	0,025	$\hat{y}= 4,27$	-
	0,050	$\hat{y}= 4,19$	-
	0,100	$\hat{y}= 4,06$	-
24	Controle - 0	$\hat{y}= 4,20$	-
	0,025	$\hat{y}= 4,26$	-
	0,050	$\hat{y}= 4,01$	-
	0,100	$\hat{y}= 3,97$	-
48	Controle - 0	$\hat{y}= 4,10$	-
	0,025	$\hat{y}= 4,17$	-
	0,050	$\hat{y}= 3,84$	-
	0,100	$\hat{y}= 3,88$	-

Entretanto, Atta et al. (2015) demonstraram que um composto antimicrobiano produzida por *Streptomyces lydicus* e classificado como natamicina, apresentou atividade contra bactérias Gram positivas como *S. aureus*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis*.

Na ação sobre *E. coli* observou-se reduções de até um ciclo log nas contagens após 24 horas nos tratamentos com adição de natamicina 0,025, 0,05 e 0,1% a partir da solução salina 7,5% (Figura 5 B). Nestes mesmos tratamentos após 48 horas, observaram-se reduções maiores que um ciclo log a partir dos tratamentos em solução salina 7,5% (Figura 5 C). Quando a bactéria foi inoculada em água peptonada nenhuma das concentrações de natamicina avaliadas, foi capaz de promover redução das contagens, observando-se inclusive, aumentos $\geq 1,5$ ciclos log nas contagens finais (Tabela 5), sugerindo que a disponibilidade de substrato pode acelerar o metabolismo bacteriano e inviabilizar a ação do antimicrobiano. Segundo informações obtidas junto ao fabricante é recomendado adicionar 5-10% de sal para o banho de imersão para limitar o desenvolvimento bacteriano na casca do queijo. Porém, os resultados demonstraram que na concentração recomendada (0,025%), a natamicina apresentou efeito sobre a bactéria apenas quando em solução salina 7,5% após 24 horas indicando que apenas a imersão talvez, não seja eficiente para limitar o desenvolvimento bacteriano referido. De acordo com Atta et al. (2015) a natamicina produzida por *S. lydicus* apresenta ação antimicrobiana efetiva contra *E. coli*, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa*.

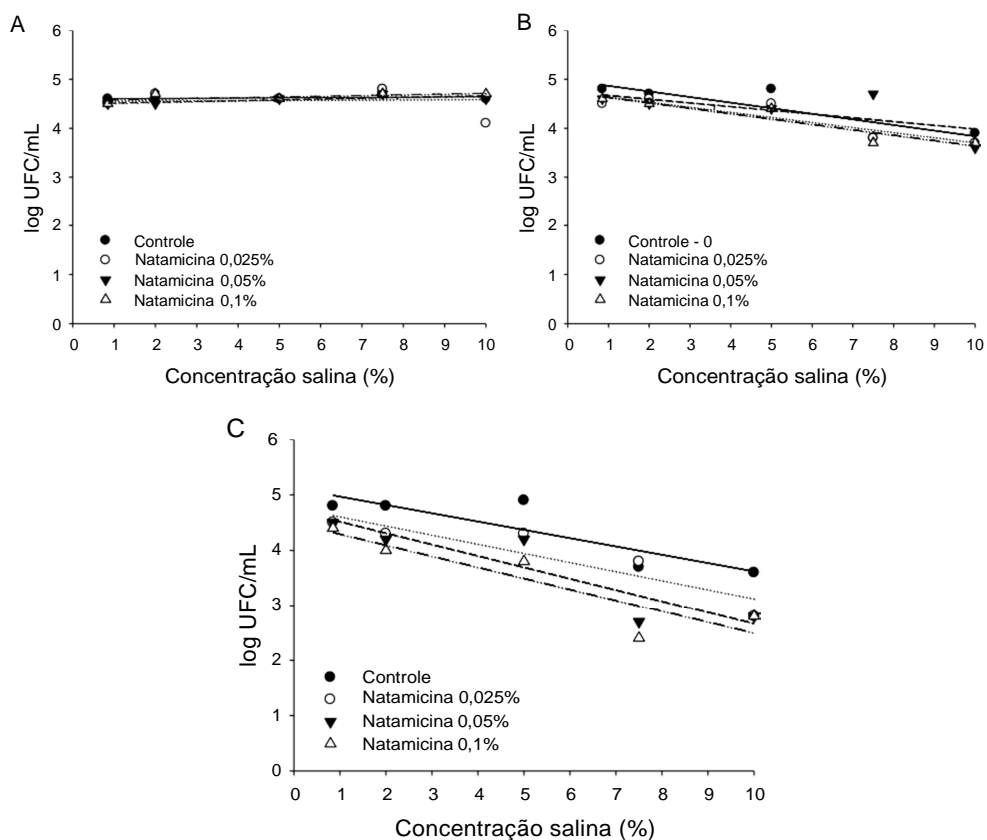


Figura 5. Contagem de *E. coli* após adição de natamicina 0, 0,025, 0,050 e 0,100%, por 0 (A), 24 (B) e 48 h (C), em diferentes concentrações salinas.

Tabela 4. Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de *E. coli* exposta a natamicina 0, 0,025, 0,050 e 0,100%, por 0 (A), 24 (B) e 48 h (C), em diferentes concentrações salinas.

Período de exposição (h)	Concentração de natamicina (%)	Equação de regressão ajustada	R ²
0	Controle - 0	$\hat{y} = 4,60$	-
	0,025	$\hat{y} = 4,36$	-
	0,050	$\hat{y} = 4,49$	-
	0,100	$\hat{y} = 4,57$	-
24	Controle - 0	$\hat{y} = 4,98$	-
	0,025	$\hat{y} = 4,75 - 0,10 * X$	0,82
	0,050	$\hat{y} = 4,75 - 0,08 * X$	0,43
	0,100	$\hat{y} = 4,74 - 0,11 * X$	0,88
48	Controle - 0	$\hat{y} = 5,12$	-
	0,025	$\hat{y} = 4,77 - 0,16 * X$	0,82
	0,050	$\hat{y} = 4,72 - 0,21 * X$	0,82
	0,100	$\hat{y} = 4,49 - 0,20 * X$	0,81

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Diferente de *S. aureus*, o efeito da natamicina sobre *E. coli* pode ser devido ao fato dessa bactéria ser Gram negativa e apresentar uma parede celular formada por uma ou poucas camadas de peptidoglicano e uma membrana externa que não fornece uma barreira para todas as substâncias no ambiente, sendo mais permeável devido a presença de porinas que formam canais que permitem a passagem de determinadas moléculas, sendo inclusive, mais suscetíveis ao rompimento mecânico (TORTORA, 2012)

E. coli não é uma bactéria considerada halotolerante, entretanto diversas pesquisas têm demonstrado a sua capacidade de desenvolver tolerância a concentrações salinas extremas. Hrenovic e Ivankovic (2009) realizaram pesquisa com o objetivo de verificar a resistência dessa bactéria em ambientes marinhos, quando provenientes de esgoto doméstico ou de efluentes de estações de tratamentos, constatando que a eliminação da bactéria somente ocorreu em concentrações de 20% de sal em 72 horas e de 30% em 48 horas, mantendo atividade de multiplicação em concentrações salinas acima de 5%. How et al. (2013) demonstraram a capacidade de *E. coli* se adaptar a diferentes concentrações de sal (de 0% a 10%) e após 60 passagens ser capaz de aumentar sua tolerância em 1%, se multiplicando em ambientes com concentração salina de 11%. Don (2009), pesquisou o comportamento da cepa K-12 de *E. coli* quando submetida a diversas condições de estresse relacionadas a temperatura, pH e concentração de sal, entre outras, e observou que a bactéria não foi inibida por nenhuma das concentrações salinas avaliadas, que variaram de 0% a 10%.

Tabela 5 – Resultados médios obtidas na avaliação do efeito da natamicina sobre as contagens (log UFC/mL) de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* inoculados em água peptonada.

Tratamentos/ Tempo		Água peptonada		
		0h	24h	48h
<i>C. albicans</i>	Natamicina 0,025%	3,6	3,5	3,0
<i>S. aureus</i>	Controle	4,2	4,8	Incontável
	Natamicina 0,025%	4,2	4,8	Incontável
	Natamicina 0,05%	4,4	4,9	Incontável
	Natamicina 0,1%	4,0	4,2	4,6
<i>E. coli</i>	Controle	4,5	5,9	6,7
	Natamicina 0,025%	4,5	5,9	6,3
	Natamicina 0,05%	4,5	5,8	6,0
	Natamicina 0,1%	4,5	5,8	6,0
<i>C. albicans / E.coli</i>	Natamicina 0,025%	4,0 / 4,9	0 / 4,7	0 / 4,5

CONCLUSÕES

Nas condições propostas pela pesquisa, foi possível concluir que a natamicina 0,025% não apresenta eficácia sobre *Candida albicans* inoculada em concentrações salinas abaixo de 5%. As reduções nas contagens da levedura ocorreram somente, após incubação por até 24 horas e em concentrações elevadas de sal.

Os resultados obtidos nas contagens de *E. coli* demonstraram que a natamicina pode interferir no seu desenvolvimento, mesmo em concentrações que podem ser consideradas baixas (0,1%) e em condições de salinidade de 7,5% a 10%.

C. albicans quando em associação com *Escherichia coli* apresentou susceptibilidade aos tratamentos propostos, porém a redução nas contagens pode ser devida à baixa capacidade da levedura em se desenvolver quando em associação com outros micro-organismos.

A associação da natamicina com cloreto de sódio potencializa a sua ação antimicrobiana podendo representar economia e o seu uso ser ampliado pelas indústrias.

REFERÊNCIAS

AMARAL, L.A. do; NADER FILHO, A. IARIA, S.T. Variação das características físico-químicas e microbiológicas das salmouras durante sua utilização na salga de queijos tipo Minas “Frescal”. **Revista de Microbiologia**, v.22, n.2, p.136-140, 1991.

APARICIO, J.F.; CAFFREY, P., GIL, J.A., ZOTCHEV, S.B.. polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, n. 61, p. 179-188, 2003.

ATTA, H.M.; EL-SAYED, A.S.; EL-DESOUKEY, M.A; HASSAN, M.; EL-GAZAR, M. Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentatin, extraction and biological activities. **Journal of Saud Chemical Society**, v. 19, p. 360-371, 2015.

BANDEIRA, M.G.; SANTOS, A.S.; ABRANTES, M.R.; REBOUÇAS, G.G.; da SILVA, M.E.T.; de SOUZA PAIVA, W.; DAMACENO, M.M. Perfil de Sensibilidade de *Staphylococcus* Spp. Isolados de Alimentos A Antibióticos de Uso Farmacêutico. **Blucher Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 23-24, 2014.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite**. 15 ed. São Paulo: Nobel, 1991, 320p.

BORTOLON, E. Avaliação da qualidade de salmouras empregadas na salga de queijos de laticínios inscritos no Serviço de Inspeção do Paraná (SIP) na microrregião de Francisco Beltrão – PR. 2013

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade Queijos**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 07 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil 1999 – 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, DF, n.6, p.1, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. 2008. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizartexto.cfm?idtxt=31758>>. Acesso em 19 dez 2015.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Análise Epidemiológica dos Surto de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Coordenação de Vigilância Alimentar, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf>. Acesso em 16 dezembro 2015.

BRASIL. Doenças Transmitidas por Alimentos. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2015. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta---o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>>. Acesso em 21 dez 2015.

BRUSTOLINI, J. C. **Uso de natamicina no controle do desenvolvimento de fungos em salame tipo italiano**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Santa Maria, 53p. 2009.

CÉ, N. **Utilização de filmes de quitosana contendo nisina e natamicina para cobertura de kiwis e morangos minimamente processados**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 95p. 2009.

CLODE, A.B. Therapy of equine infectious keratitis: a review. **Equine Veterinary Journal**, v.37, n.37 (Suppl.), p. 19-23, 2010.

CONG, F.; ZHANG, Y. & DONG, W. Use of surface coatings with natamycin to improve the storability of Hami melon at ambient temperature. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, n.1, p. 71-75, 2007.

DALHOFF, A.A.; LEVY, S.B. Does use of the polyene natamycin as a food preservative jeopardise the clinical efficacy of amphotericin B? A word of concern. **International journal of antimicrobial agents**, v.45, n.6, p. 564-567, 2015.

de LIMA SANTOS, A.; de SÁ, J.F.D.O.; TEODORO, V.A.; PINTO, M.S. Utilização de dióxido de cloro estabilizado em solução aquosa no tratamento de salmouras. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n.364, p.19-26, 2008.

DON, S.M. Optimal conditions for the growth of *E. coli*. **Biology EEI**, n.4, p. 3-18, 2008.

EFSA (European Food Safety Authority). Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS); Scientific Opinion on the use of natamycin (E 235) as a food additive. **EFSA Journal**, v.7, n. 12, 1412-1437, 2009.

FONSECA, C.F. **Processos de salga e sua interação nos queijos**. Juiz de Fora: Epamig/ilct, 1986. 23p. Apostila.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.L.S. Microbiologia dos alimentos, Ed. Atheneu. São Paulo-SP, Brasil, 182p., 2003.

FURTADO, M.M. A arte e a ciência do queijo. 2 ed. São Paulo: Globo, 297p., 1991.

FURTADO M. M. **Principais problemas dos queijos: Causas e Prevenção (Main problems of cheeses: Causes and Prevention)**. São Paulo, SP, Brasil: Ed. Fonte Comunicações, 2005.

FISHER, M.M. **Contaminação microbiológica de alimentos envolvidos em surtos e doenças transmitidas por alimentos ocorridas no estado do Rio Grande do Sul entre 2004 e 2012**. Monografia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 41p. 2013.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LIBURN, T.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Springer-Verlag, New York, 2003.

GIOLO, N.L.; TEIXEIRA, I.S.C.; SILVA, S.I.L.; GONÇALVES, M.G.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; PERESI, J.T.M. Staphylococcus aureus como agente causal de surtos de doenças transmitidas por alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.73, n.1, p.6-1, 2014.

HRENOVIC, J.; IVANKOVIC, T. Survival of *Escherichia coli* and *Acetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride. **EurAsian Journal of Biosciences**, v. 3, p. 144-151, 2009.

HOW, J.A.; LIM, J.Z.; GOH, D.J.; NG, W.C.; OON, J.S.; LEE, K. C.; LEE, C.H.; LING, M.H.T. Adaptation of *Escherichia coli* ATCC 8739 to 11% NaCl. **Dataset Papers in Science**, v. 2013, 2013.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOINT FAO/WHO CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Request for information on the justification of the use of preservatives and anticaking agents for surface treatment of Mozzarella with a high moisture content**. CL 2015/26-CAC, 2015.

MACHADO, L.A.P.; LUCCA, F.; ALVES, J.; POZZOBON, A., FILHO, I.C.B. Prevalência e genotipagem de *Escherichia coli* patogênica em carcaças de suínos abatidos em frigoríficos comerciais na Região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.08, n. 1, p. 129-146, 2014.

MALECHA, M.A. Fungal keratitis caused by *Scopulariopsis brevicaulis* treated successfully with natamycin. **Cornea**, v.23, n.2, p. 201-203, 2004.

MEDEIROS Jr, M.C.; SILVEIRA, G.S.; PEREIRA, J.B.B.; CHAVASCO, J.M.; CHAVASCO, J.K. Verificação de contaminantes de natureza fecal na superfície de torneiras de banheiros públicos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.10, n.1, p. 297 -303, 2012.

MERCOSUL/GMC/RES N° 79/94. **Regulamento Técnico Geral Mercosul Identidade e Qualidade de Queijos**, 1994.

MUCINHATO, R.M.D.; TORMEM, S.H.; TERRA, M.R.; FURLANETO, M.C.; & FURLANETO-MAIA, L. *Enterococcus* spp. Isolados de Alimentos Vegetais: Análise da resistência a Antimicrobianos. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v.1, n.2, p. 99-102, 2015.

MYERS, R. S. **Antifungal Agents. In Immunizing and Antimicrobial Agents**, 2006.

Disponível

em:

<http://courses.washington.edu/medch401/pdf_text/401_06_VI_Antifungal.pdf>. Acesso em 20 set 2015.

NOLLA, A.C.; CANTOS, G.A. Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos e aspectos epidemiológicos em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Cad Saúde Pública**, v.21, p. 641-645, 2005.

OLIVEIRA, T.M.; SOARES, N.F.F.; PEREIRA, R.M.; FRAGA, K.F. Avaliação do teor de natamicina em queijos gosgonzola através de quantificação espectrofotométrica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 61, n.349, p.48-50, 2006.

OLIVEIRA, A.B.A.; PAULA, C.M.D.; CAPALONGAS, R.; CARDOSO, M.R.I.; TODOS, E.C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, n.30, v.3, p.279-285, 2010.

PELEG, A.Y.; HOGAN, D.A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial–fungal interactions. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 5, p. 340-349, 2010

PIRES, M.; PETZHOLD, C. L.; SANTOS, R. V.; PERÃO, L.; & CHIES; A. P. Effect of antimicrobial compound migration on final properties of polyethylene based film. **Polímeros**, v. 24, n. 2, p. 237-242, 2014.

PUTMAN, M.; VEEN, H.W. V.; KONINGS, W. N. (2000). Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 1092, pp. 672-693.

RAMOS, Ó.L.; SILVA, S. I.; SOARES, J. C.; FERNANDES, J. C.; POÇAS, M. F.; PINTADO, M. E. & MALCATA, F. X. Features ad performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research international**, v. 45, n.1, p. 351-361, 2012.

RESTUCCIA, D.; SPIZZIRRI, U. G.; PARISI, O. I.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; IEMMA, F.; PUOCI, F.; VINCI, G. & PICCI, N. New EU regulation aspects and global Market of active and inteligente packaging for food industry applications. **Food Control**, v.21, n.11, p.1425-1435, 2010.

ROSENBACH, A.; DIGNARD, D.; PIERCE, J.V.; WHITEWAY, M.; KUMAMOTO, C.A. Adaptations of *Candida albicans* for growth in the mammalian intestinal tract. **Eukaryot Cell**, v.9, p. 1075-1086, 2010.

SAMSON, R.A. **Introduction to food and airborne fungi**. 6. Edição. Netherlands: Centralbureau voor schimmelcultures, 2002.

SILVA, V. A. M. et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru , do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma granja leiteira. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 38, v. 1, p. 51 – 57, 2010.

WELSCHER, Y. M. et al. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. **J Biol Chem**, v. 283, n. 10, p.6393-401, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, L. C. **Microbiologia** – 10. Edição – Porto Alegre: Artmed, 2012.

TUDOR, E.A.; BOARD, R.G. Food-spoilage yeasts. **The Yeasts. Volume 5: yeast technology.**, n.Ed. 2, Academic Press, Londres, pp 435-516, 1993.

VENTURINI, A.T. **Natamicina: análise e controle em sucos de uva e vinhos nacionais e importados comercializados no Brasil**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 57p, 2012.