

Atividade antimicrobiana da fumaça líquida obtida de *Bambusa sp.* contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp.* isolados de mastite bovina

Antimicrobial activity of liquid smoke obtained from *Bambusa sp.* against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus sp.* isolated from bovine mastitis

Roberto Lozam Junior*
Amélia Elena Terrile*
Claudio Lima de Aguiar***

* Discente do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).
e-mail: <juniorengal@bol.com.br>

** Mestre em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Docente do curso de Engenharia de Alimentos da UNOPAR.
e-mail: <amelia.terrile@unopar.br>

*** Doutor em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Docente e Pesquisador do Centro de Pesquisa em Ciência e Tecnologia do Leite (CEPTEL/UNOPAR).
e-mail: <claguiar@yahoo.com.br>

Resumo

A mastite é uma doença multifatorial de grande importância para a pecuária e a indústria do leite, acarretando sérios prejuízos econômicos decorrentes da diminuição da secreção láctea ou da perda total desta capacidade, além de representar um importante problema de Saúde Pública. A fumaça líquida apresenta compostos fenólicos que contribuem com o aroma e atuam como agentes antioxidantes e antimicrobianos ativos, podendo ser utilizada para o controle de microrganismos tais como *Staphylococcus spp.*, alguns de cujas espécies produzem mastite. Este trabalho visou à verificação da atividade inibitória dos extratos de fumaça líquida obtida da pirólise de *Bambusa vulgaris* contra isolados da mastite bovina (*Staphylococcus spp.*). Determinação de pH e acidez, identificação por espectrofotometria UV e cromatografia em camada delgada (CCD) e quantificação por espectrofotometria a 725 nm dos compostos fenólicos foram realizados nos destilados e resíduos aquoso e alcoólico obtidos por destilação simples e fracionada da fumaça líquida. A atividade inibitória de cada fração e resíduo foi avaliada através de halos de inibição comparados com Gentamicina. A partir dos dados obtidos, conclui-se que a fumaça líquida obtida da pirólise de *Bambusa vulgaris* apresentou atividade antimicrobiana contra quatro cepas de estafilococos isolados de mastite bovina. O maior efeito da atividade antimicrobiana foi observado para o resíduo da destilação simples, o qual apresentou maior halo de inibição para as quatro cepas isoladas, com cerca de 76,9% da atividade inibitória da amostra controle com 10 µg de Gentamicina.

Palavras-chave: Mastite. Fumaça líquida. Estafilococos. Antimicrobiano.

Abstract

Mastitis is a highly important multifactorial disease for cattle-raising and the dairy industry, causing serious economic damage due to the decrease of milk secretion or its total loss, besides representing an important problem in Public Health. Liquid smoke presents phenolic compounds that contribute with flavoring and act as active antioxidant and antimicrobial agents, and can be used for the control of microorganisms such as Staphylococcus sp., as some of its species produce mastitis. This work aimed at verifying the inhibiting activity of liquid smoke extracts obtained by pyrolysis of Bambusa vulgaris against isolated microorganisms of bovine mastitis (Staphylococcus sp.). Determination of pH and acidity, identification by UV spectrophotometry and thin-layer chromatography and quantification by spectrophotometry at 725 nm of the phenolic compounds were conducted in the distilled products and aqueous and alcoholic residues obtained by simple and fractioned distillation of liquid smoke. The inhibiting activity of each fraction and residue was evaluated by means of inhibition halos compared with Gentamicin. From the obtained data, it was concluded that liquid smoke obtained from pyrolysis of Bambusa vulgaris presented antimicrobial activity against four strains of staphylococcus isolated from bovine mastitis. The strongest effect of the antimicrobial activity was observed in relation to the residue of simple distillation, which presented bigger inhibition halo for the four isolated strains, with about 76.9% of the inhibiting activity of the control sample with 10 µg of Gentamicin.

Key words: Mastitis. Liquid smoke. Staphylococcus. Antimicrobial.

1 Introdução

As perdas na produção de leite atribuídas à mastite subclínica alcançam de 10 a 26% do total de produção, de acordo com grau de intensidade do processo inflamatório, da prevalência da doença, da patogenicidade do agente infeccioso e do estágio de lactação. Além da diminuição na produção leiteira, torna o úbere uma reserva de microrganismos patogênicos, o que ocasiona perda na qualidade do leite. O animal não apresenta alterações visíveis na glândula, porém o leite apresenta alta contagem de células somáticas. Essas infecções, além de contribuírem com significativas perdas econômicas, podem ser consideradas como um problema sério para a saúde pública.

No intuito de solucionar ou minimizar os problemas causados pela ação dessas bactérias no leite e em seus derivados, diversas ações têm sido tomadas para inibir o crescimento de agentes microbianos que promovem o processo inflamatório nas glândulas mamárias de bovinos no Brasil. A aplicação de antibiótico sintetizado por via química tem sido a prática usual de criadores de bovinos leiteiros, quando o animal é identificado. No entanto, normas de vigilância sanitária internacional têm criado barreiras sanitárias para a comercialização de produtos de origem animal, quando do tratamento com certos tipos de antibióticos.

A fumaça líquida usualmente tem sido empregada para conferir aroma e cor a produtos cárneos, mas também apresenta outros benefícios. Suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes tornam os produtos mais seguros, aumentando sua vida-de-prateleira. Relata-se atividade bacteriostática da fumaça líquida quando testada em *Proteus sp.* e *Staphylococcus sp.*, bem como o efeito bacteriano em peixes, obtendo-se resultados positivos no controle do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Proteus vulgaris*.

De modo geral, verifica-se que a resposta individual dos microrganismos para a fumaça líquida é extremamente variável, o que torna interessante a identificação dos possíveis compostos ativos na inibição do crescimento de bactérias presentes em processos inflamatórios de glândulas mamárias de bovinos leiteiros.

Neste sentido, o objetivo do artigo foi o de verificar a atividade inibitória dos extratos de fumaça líquida obtida da pirólise de bambu comum (*Bambusa vulgaris*) contra quatro bactérias identificadas como agentes etiológicos da mastite bovina, sendo dois isolados de *Staphylococcus aureus* e dois isolados de *Staphylococcus sp.*

2 Material e Métodos

2.1 Destilação fracionada da fumaça líquida

Um volume de 400 mL de fumaça líquida obtida por pirólise de *Bambusa vulgaris* foi submetido à destilação fracionada obtendo-se quatro frações destiladas que foram denominadas: *Destilado 1*, *Destilado 2*, *Destilado 3* e *Destilado 4*. O resíduo restante no balão foi dissolvido com água (*Resíduo aquoso*). Em seguida, o balão ainda possuía resíduo de fumaça líquida que foi solubilizado em etanol (*Resíduo alcoólico*).

2.2 Destilação simples

Um volume de 300 mL de fumaça líquida, obtida por pirólise de *Bambusa vulgaris*, foi submetido a uma destilação simples a 97°C obtendo-se uma fração destilada de 280 mL (*Destilado S*) e um resíduo de 30 mL (*Resíduo S*).

2.3 Determinação de acidez

A acidez foi concluída por uma técnica simples de titulação com uma base padronizada, utilizando o potenciômetro de acordo com a técnica proposta por Cecchi (1999).

2.4 Absorbância por espectrofotometria na região ultravioleta

Os espectros na região ultravioleta das amostras foram obtidos por meio da adição de uma alíquota de 50 µL da amostra com 15 mL de solução a 75% de etanol. Os espectros de absorção foram determinados na faixa de comprimento de onda de 190 a 362 nm, em espectrofotômetro.

2.5 Quantificação de compostos fenólicos

A determinação de fenóis foi realizada de acordo com a técnica empregada por Nozella (2001). Foram testadas várias diluições das amostras dissolvidas em água destilada, para obter uma melhor leitura de absorbância. A diluição mais adequada foi a de vinte e uma vezes para todas as amostras. Em tubos de ensaio, foram adicionados 50 µL do sobrenadante referente a cada diluição da amostra em água (em duplicata), 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu (1 N) diluído 1:10, 450 µL de água destilada e 1,25 mL de carbonato de sódio (20%). Os tubos foram agitados e, após quarenta minutos, foi feita a leitura em um espectrofotômetro, em absorbância de 725 nm. O teor de fenóis totais (FT) foi calculado em equivalente de ácido tânico.

2.6 Atividade antimicrobiana das frações da fumaça líquida

Os microrganismos utilizados para analisar a atividade antimicrobiana das frações de fumaça líquida destilada de *Bambusa vulgaris* foram isolados pelo prof. L. C. Silva (UNOPAR) de animais com mastite. O meio de cultura utilizado foi agar-nutriente (15 g de agar-agar e 8g de caldo-nutriente para cada litro de água destilada). A reativação dos microrganismos *Staphylococcus aureus* (SA1 e SA2) e *Staphylococcus sp.* (STA1 e STA2) realizou-se em duplicata em que os microrganismos foram repicados em tubos de ensaio contendo 10 mL de agar-nutriente inclinado e incubados a 37°C por 18 h. O antibiograma foi realizado por comparação com um antibiótico (Gentamicina, 10 µg) e com um disco-controle de etanol. Em discos de papel filtro de 5 mm, foram aplicados 20 µL dos destilados, dos resíduos e dos controles, sendo em seguida incubados a 100°C por 5 min para evaporar o excesso de álcool das amostras. Foram acrescentados 5 mL de água destilada estéril no tubo do inóculo STA1 e repassado 5mL deste inóculo para outro tubo da mesma espécie STA1, repetindo o processo para os outros microrganismos.

Após o processo, foram retirados 150 µL de cada tubo com os diferentes inóculos e transferidos para placas de Petri contendo agar-nutriente e emplacedados em superfície. Logo após, foram adicionados os discos contendo as amostras, o controle e o antibiótico, sendo ambos incubados a 37°C por 18 h.

2.7 Cromatografia em camada delgada em fase normal

A cromatografia em camada delgada foi realizada adicionando-se 5 µL de cada amostra de fumaça líquida, de resíduo alcoólico e de resíduo da destilação simples, em uma cromatoplaça sílica-gel 60 F₂₅₄ (10 x 4 cm). Uma solução de solventes (tolueno, 40 mL; clorofórmio, 25 mL; acetona, 35 mL) foi utilizada como fase móvel, sendo a cuba cromatográfica coberta para completa saturação. O tempo de corrida cromatográfica foi de 40 min. A placa foi retirada da cuba e revelada em luz ultravioleta e em solução reveladora de anisaldeído-sulfúrico (ácido acético, 50 mL; ácido sulfúrico, 1 mL; anisaldeído, 0,5 mL), sendo colocada a 100°C por 5 min para revelação das bandas.

3 Resultados e Discussão

Vários fracionamentos das amostras de fumaça líquida foram desenvolvidos por destilação fracionados a temperatura constante de 97°C, mas nenhuma variação no teor de fenólicos totais foi percebida após o fracionamento. No entanto, a variação no teor de compostos fenólicos totais foi percebida nas amostras residuais da fumaça líquida, ou seja, resíduo alcoólico (408,6 µg) e resíduo aquoso (1317,1 µg). Na Figura 2, pode-se observar nos espectros de absorção das frações destiladas de fumaça líquida que há um aumento na absorção na região de 280 nm, característica de compostos fenólicos. Porém, nenhuma variação no perfil dos espectros foi observada, o que pode caracterizar que as amostras não apresentam diferenças de composição química das várias frações obtidas da destilação fracionada. As frações residuais foram as que apresentaram maiores absorções nas regiões de 200-220 nm e 280 nm, o que poderia corroborar o aumento da concentração de compostos fenólicos (ver Tabela 2).

A cromatografia em camada delgada dos destilados de fumaça líquida foi feita para permitir uma visualização rápida que distinguísse compostos ou grupos de compostos químicos presentes nas amostras. Pelos resultados obtidos, diferentes compostos químicos foram isolados das amostras destiladas e dos resíduos (Figura 2). Os compostos foram eluídos nos cromatogramas em camada delgada e, após irradiação a 366 nm, obtiveram-se os perfis das bandas presentes nas amostras (Figura 2a), bem como após aplicação de solução reveladora de anisaldeído-sulfúrico (Figura 2b).

Conforme observado na Figura 1, diferentes compostos químicos foram isolados das amostras de fumaça líquida e suas frações. As bandas obtidas na eluição cromatográfica e reveladas pela solução de anisaldeído-sulfúrico apresentaram diferentes colorações conforme as reações específicas com o composto ou grupo de compostos

separados. Na análise em cromatoplaças de sílica-gel 60 F₂₅₄, em todas as frações de fumaça líquida, alguns compostos apresentaram similaridade de Rf's e colorações (do amarelo ao vermelho, bem como uma banda azul-clara) após revelação com anisaldeído-sulfúrico e em luz ultravioleta (Tabela 1).

Na tentativa de obter diferentes perfis cromatográficos entre as amostras da fumaça líquida de *Bambusa vulgaris*, diferentes frações foram obtidas (*Destilado 1, Destilado 2, Destilado 3, Destilado 4, Resíduo Alcoólico e Resíduo Aquoso*); no entanto, pôde-se observar que os espectros sob luz ultravioleta (366 nm) e revelados por solução de anisaldeído apresentaram acentuada similaridade, mostrando uma certa correlação entre os compostos químicos presentes nas amostras de fumaça líquida independentemente da fração analisada neste trabalho. A diferença nos espectros cromatográficos se deu pelo aumento na concentração de compostos fenólicos totais. As concentrações de fenólicos totais, expressos em ácido tânico, foram determinadas e podem ser observadas na Tabela 2.

A Tabela 2 mostra os valores de pH e acidez das frações obtidas da fumaça líquida de *Bambusa vulgaris*.

A fumaça líquida obtida da pirólise de *Bambusa vulgaris* foi testada quanto às suas propriedades antimicrobianas contra quatro cepas de *Staphylococcus sp.* e isoladas de vacas leiteiras clinicamente identificadas com mastite bovina. Os valores de inibição microbiana foram expressos em milímetros de halo de inibição, conforme Tabela 3.

Como pode ser observado na Tabela 3, não se apresenta diferença na atividade antimicrobiana. E pelo fato de não apresentar diferença na atividade antimicrobiana, o processo de fracionamento dos compostos fenólicos através da destilação fracionada foi modificado. Trocando o método de destilação fracionada pela destilação simples, a qual resultou na obtenção das amostras *Destilado S e Resíduo S*, os valores de inibição são apresentados na Tabela 4.

O maior efeito da atividade antimicrobiana foi percebido para a amostra do *Resíduo da Destilação Simples* (RhS), a qual apresentou maiores halos de inibição para as quatro cepas isoladas. Para as cepas de *S. aureus* (STA1 e STA2), os halos de inibição representaram 71,4 e 88,2% da atividade inibitória da amostra controle com 10 mg de gentamicina. Para as cepas de *Staphylococcus sp.* (SA1 e SA2), os halos de inibição representaram 73,3 e 75,0% da atividade inibitória da amostra controle com 10 µg de gentamicina.

4 Conclusão

A partir dos dados obtidos no presente trabalho, pôde-se concluir que a fumaça líquida obtida da pirólise de *Bambusa vulgaris* apresentou atividade antimicrobiana contra quatro cepas de estafilococos isolados de mastite bovina. O maior efeito da atividade antimicrobiana foi percebido para *Resíduo da Destilação Simples*, o qual apresentou maior halo de inibição para as quatro cepas isoladas, com cerca de 76,9% da atividade inibitória da amostra controle com 10 µg de gentamicina.

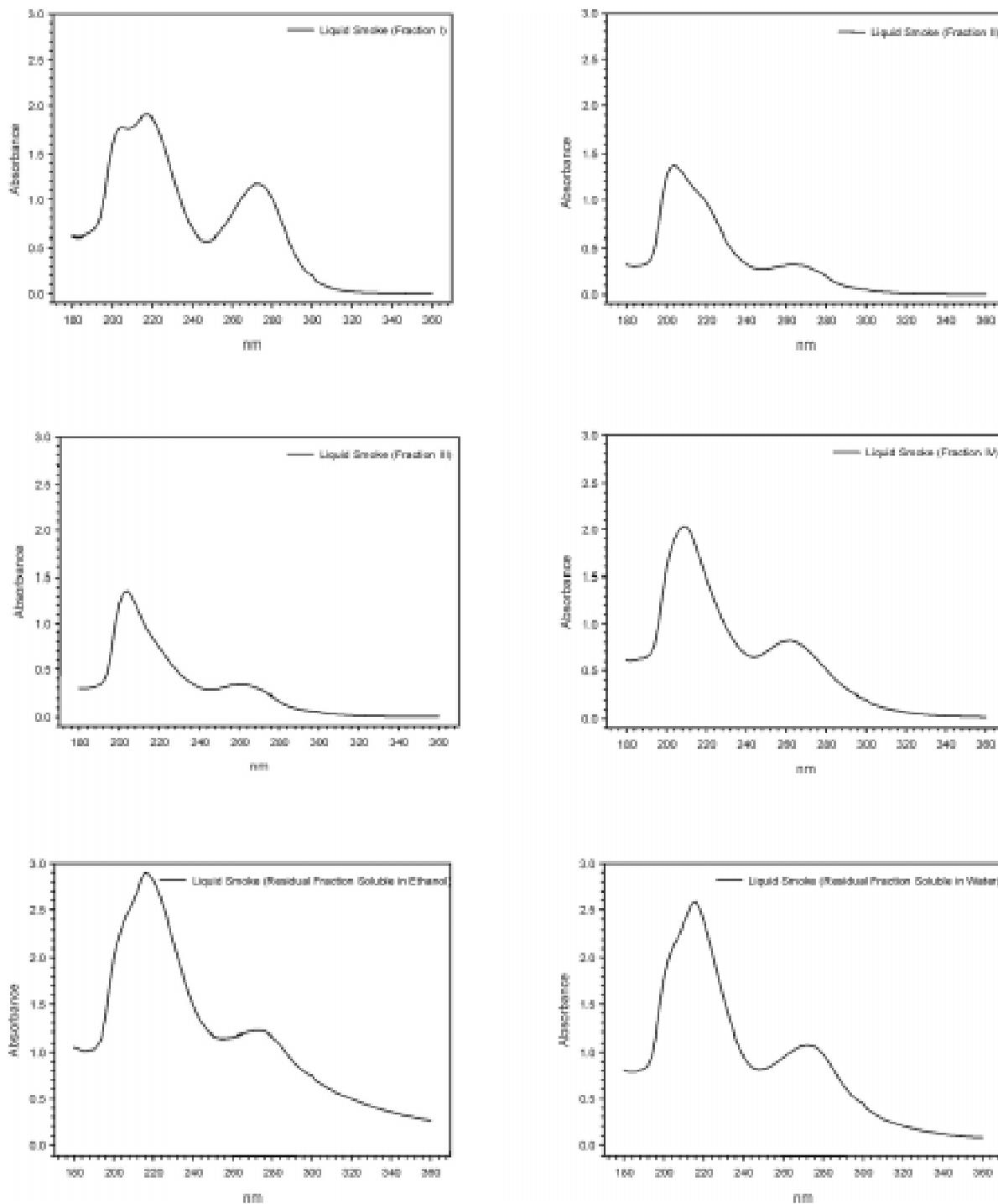


Figura 1. Espectro de absorção na região do ultravioleta das frações destiladas de fumaça líquida obtida de 400 mL de fumaça líquida de *Bambusa vulgaris*.

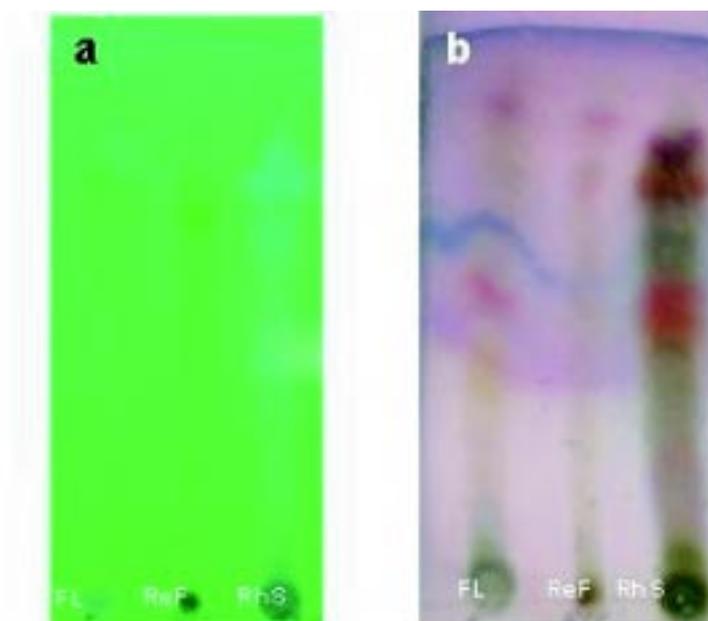


Figura 2. Cromatografia em camada delgada em fase normal (CCDFN), (a) irradiada a 366 nm e (b) revelada com solução de anisaldeído, das frações destiladas de fumaça líquida de *Bambusa vulgaris*. FL: fumaça líquida; ReF: resíduo alcoólico fracionado; RhS: resíduo aquoso simples.

Tabela 1. Relações de frente (Rf) e cores desenvolvidas para os compostos separados em CCD das amostras de fumaça líquida e suas frações.

Amostra	Reveladores					
	Anisaldeído			Luz Ultravioleta		
	FL	ReF	RS	FL	ReF	RS
Banda #1	0,85 Vermelho	0,84 Vermelho	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Banda #2	0,77 Vermelho	0,76 Vermelho	0,81 Vermelho	0,77 Azul	n.d.	0,81 Azul
Banda #3	n.d.	0,75 Vermelho	0,76 Vermelho	0,73 Amarelo	0,73 Amarelo	n.d.
Banda #4	0,5 Vermelho	n.d.	0,52 Vermelho	n.d.	n.d.	n.d.
Banda #5	n.d.	n.d.	0,48 Vermelho	n.d.	n.d.	n.d.
Banda #6	0,36 Amarelo	n.d.	0,38 Amarelo	n.d.	n.d.	n.d.
Banda #7	0,14 Azul	0,09 Azul	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabela 2. Valores de pH, acidez e compostos fenólicos totais das frações destiladas de fumaça líquida de *Bambusa vulgaris* (n=3).

Amostras	pH ^a	Acidez		Fenólicos Totais ^d
		m _{eq} H ⁺ /100 mL ^b	% ácido acético ^c	
Destilado 1	2,69	13,4	1,18	78
Destilado 2	2,64	16,6	1,46	43
Destilado 3	2,58	21,5	1,89	37
Destilado 4	2,63	42,5	3,74	172
Destilado S	n.d. ^e	n.d. ^e	3,05	190
Res. Aquoso	3,37	7,0	0,62	245
Res. Álcool	n.d. ^e	5,1	0,45	408
Res. Simples	n.d. ^e	n.d. ^e	11,8	1317
Fumaça Líquida	n.d. ^e	n.d. ^e	4,34	337

^aA medida dos potenciais hidrogeniônicos foram avaliados pela medida direta em potenciômetro Tecnal Mod. Tec-2. ^bAcidez foi avaliada por titulação potenciométrica (CECCHI, 1999). ^cO teor de fenólicos totais foi avaliada a partir da reação com solução de Folin Ciocalteu contra curva padrão de ácido tânico e expresso como microgramas de compostos fenólicos. ^en.d. Medida não determinada.

Tabela 3. Valores de inibição do crescimento bacteriano pelas amostras da destilação fracionada de fumaça líquida de *Bambusa vulgaris*^a.

Frações (Código de controle)	<i>S. aureus</i> (STA1)	<i>S. aureus</i> (STA2)	<i>Staphylococcus sp.</i> (SA1)	<i>Staphylococcus sp.</i> (SA2)
Destilado 1	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
Destilado 2	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
Destilado 3	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
Destilado 4	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
Controle (etanol)	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
Resíduo alcoólico	7	7	n.d. ^c	n.d. ^c
Resíduo aquoso	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
Fumaça líquida	8	7	7	8
Gentamicina ^b	14	17	15	16

^aValores médios obtidos da amostra em duplicata, expressos em mm. ^bGentamicina foi empregada como um antibiótico de controle-positivo, 10 µg. ^cn.d.: atividade inibitória do crescimento microbiano não foi detectada.

Tabela 4. Valores de inibição do crescimento bacteriano pelas amostras da destilação simples da fumaça líquida de *Bambusa vulgaris*^a.

Frações (Código de controle)	<i>S. aureus</i> (STA1)	<i>S. aureus</i> (STA2)	<i>Staphylococcus sp.</i> (SA1)	<i>Staphylococcus sp.</i> (SA2)
Destilado S	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
Resíduo S	10	15	11	12
Fumaça líquida	8	7	7	8
Gentamicina ^b	14	17	15	16

^aValores médios obtidos da amostra em duplicata, expressos em mm. ^bGentamicina foi empregada como um antibiótico de controle-positivo, 10 µg. ^cn.d.: atividade inibitória do crescimento microbiano não foi detectada.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Eng^o. Jorge Kariya pela doação das amostras de fumaça líquida utilizadas neste trabalho. Os autores também são gratos pela colaboração de Dionadir de Almeida e Elaine Luvisotto, do Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade Norte do Paraná.

Referências

ADICON. Indústria e Comércio de Aditivos Ltda. Disponível em: <<http://www.adicon.com.br>>. Acesso em: 10 ago. 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, 7 jul. 1952.

BRITO, M.A.V.P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J.R.F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Ciênc. Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 79-82, jan./fev. 2002.

CECCHI, H.M. *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1999.

CHEN, B.H.; LIN, Y.S. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons during processing of duck meat. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 45, n. 4, p. 1394-1403, Apr. 1997.

COLDEBELLA, A. et al. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas de alta produção. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1451-1457, dez. 2003.

FUMAÇA líquida. *Aditivos e Ingredientes*, São Paulo, n. 13, p. 25-39, 2001.

GUILLEN, M. D.; IBARGOITIA, M. L. Influence of the moisture content on the composition of the liquid smoke produced in the pyrolysis process of *Fagus sylvatica* L. wood. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 47, n. 10, p. 4126-4136, Oct. 1999.

GUILLEN, M.D.; MANZANOS, M.J.; IBARGOITIA, M.L. Carbohydrate and nitrogenated compounds in liquid smoke flavorings. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 49, n. 5, p. 2395-2403, May 2001.

GUILLEN, M. D.; SOPELANA, P.; PARTEARROYO, M. A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavorings obtained from different types of wood. Effect of storage in polyethylene flasks on their concentrations. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 48, n. 10, p. 5083-5087, Oct. 2000.

GUILLEN, M.D.; SOPELANA, P.; PARTEARROYO, M.A. Study of several aspects of a general method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavourings by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, London, v. 17, n. 1, p. 27-44, Jan. 2000.

LEITE, R.C.; BRITO, J.R.F.; FIGUEIREDO, J.B. Alterações da glândula mamária de vacas tratadas intensivamente via mamária com penicilina em veículo aquoso. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, Belo Horizonte, v. 28, p. 27-31, 1976.

MILLY, P.J.; TOLEDO, R.T.; RAMAKRISHNAN, S. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Liquid Smoke Fractions. *J. Food Sci.*, Champaign, v. 70, n.1, p. M12-M17, Jan./Feb. 2005.

NASH, J.C. Review of technical considerations for smoke curing processes of foods. In: ASAE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING, 1997, Minneapolis, Minnesota. *Paper-American-Society-of-Agricultural-Engineers*. St. Joseph, USA: ASAE American Society of Agricultural Engineers, 1997. nº 976095.

NOZELLA, E.F. *Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes*. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências - Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba.

PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F.; SARRÍES, G.A. Contagem de células somáticas e características produtivas de vacas da raça holandesa em lactação. *Sci. Agric.*, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 649-654, out./dez. 2001.

- PINTO, M. S. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.
- POTTHAST, K. Fluessigrauch eine alternative zum frisch entwickelten Raeucherrauch? *Fleischwirtschaft*, v. 73, n. 12, p. 1378-1383, 1993.
- REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 55, n. 6, p. 651-658, dez. 2003.
- SOFOS, J.N.; MAGA, J.A.; BOYLE, D.L. Effect of ether extracts from condensed wood smokes on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.*, Champaign, v. 53, n. 6, p. 1840-1843, 1988.
- UTILIZAÇÃO das fumaças líquidas naturais na indústria da carne. *Aditivos e Ingredientes*, São Paulo, n. 5, p. 41-43, 1999.
- VIANNI, M.C.E.; LÁZARO, N.S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isoladas de mastite subclínica bubalina. *Pesq.Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 47-51, abr./jun. 2003.
- WENDORFF, W.L.; RIHA, W.E.; MUEHLENKAMP, E. Growth of molds on cheese treated with heat or liquid smoke. *J. Food Prot.*, Ames, v. 56, n. 11, p. 963-966, Nov. 1993.
- WHITE, R.H.; HOWARD, J.W. Thin-layer chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 108-114, Jul. 1967.