

BRUNA AMARAL FELÍCIO

**EFEITO INIBITÓRIO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
NISINA SOBRE *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS
FRESCAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte

Coorientador: Prof. Dr. Maximiliano Soares Pinto

Montes Claros - MG

2013

Felício, Bruna Amaral.

F314e Efeito inibitório de diferentes concentrações de nisina sobre
2013 *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal /Bruna Amaral Felício.
Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2013.

56 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte.

Banca examinadora: Gilzeane dos Santos Sant'ana Prazeres, Igor Viana Brandi, Maximiliano Soares Pinto, Eduardo Robson Duarte.

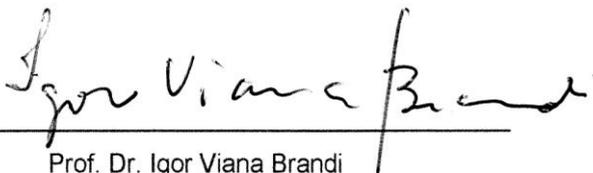
Inclui bibliografia: f. 44-52.

1. Microbiologia. 2. Queijo fresco. 3. Nisina. I. Duarte, Eduardo Robson. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 579

BRUNA AMARAL FELÍCIO

**EFEITO INIBITÓRIO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NISINA
SOBRE *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL**



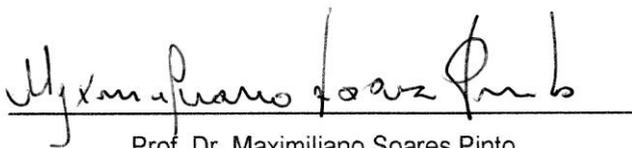
Prof. Dr. Igor Viana Brandi
(ICA – UFMG)



Profa. Dra. Gilzeane dos Santos Sant'ana Prazeres
(Membro Externo – FACIT)



Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte
(Orientador/ ICA – UFMG)



Prof. Dr. Maximiliano Soares Pinto
(Coorientador/ICA – UFMG)

Aprovada em 21 de dezembro de 2012.

Montes Claros

2012

“O saber se aprende com os mestres. A sabedoria, com o corriqueiro da vida.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao bom e grandioso Deus por mais uma conquista, por me dotar de força e coragem para buscar meus ideais e permitir a convivência com pessoas tão especiais.

Ao professor Maximiliano Soares Pinto, pela orientação, paciência, amizade e todos os conhecimentos que me permitiu adquirir, não apenas sobre queijos, mas em valores pessoais.

Aos meus amados pais, Felício e Elenice, pela incondicionalidade na dedicação, amor e zelo, todas as abdições em favor das minhas realizações.

Ao Mateus, por fazer parte da minha vida, pela companhia constante, amor irrestrito, e em especial por abrir mão de seu sono durante várias madrugadas para me acompanhar neste experimento.

Ao meu irmão Rafael, pelo carinho e todas as alegrias que me proporciona.

À minha irmã Jéssica, pelo carinho e apoio em todas as decisões.

À minha avó Maria, pela valiosa sabedoria.

Ao professor Eduardo Robson Duarte, que gentilmente me aceitou como orientanda.

Às professoras Daniele Ferreira da Silva, Eliete Fernandes Flávio e Nísia Andrade Vilella Dessimoni Pinto, por me encorajarem a seguir no caminho *strictu sensu*.

À banca avaliadora desta dissertação, pela disponibilidade e contribuições com o trabalho.

Aos meus amigos do mestrado Anne Karoene, Danielle, Emanuella e Marcus, pela amizade, fundamental para a conclusão desta etapa.

À Francielly, pela companhia e imensa colaboração nas análises laboratoriais.

Aos meus grandes amigos e familiares, que souberam compreender minha ausência.

À Universidade Federal de Minas Gerais e à coordenação da Pós-graduação em Ciências Agrárias.

Aos que contribuíram, de diversas formas, para a concretização deste ideal.

Enfim, “agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto suficiente”.

A todos, minha gratidão.

RESUMO

A utilização de nisina em alimentos, dentre eles os lácteos, é atualmente objeto de várias pesquisas. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito antagônico da adição de diferentes doses de nisina sobre *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal durante 30 dias após fabricação. Preliminarmente foi realizado teste *in vitro* com as concentrações de nisina de 100, 200, 400 e 500UI/mL, para avaliar o efeito sobre a multiplicação de *S. aureus* em leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%). Mediante os dados obtidos nessa etapa, foram selecionadas as concentrações de nisina de 400 e 500 UI/mL, que apresentaram maior potencial de inibição sobre *S. aureus in vitro*, para serem testadas nos queijos Minas Frescal. Durante o processo de fabricação dos queijos adicionou-se cultura de *S. aureus* ATCC 6538 no leite, em quantidade suficiente para a concentração inicial atingir aproximadamente 10^6 UFC/mL, e nisina nas concentrações de 400 e 500 UI/mL. Foram analisadas amostras do leite, soro, massa, queijo no primeiro, sétimo, décimo quarto e trigésimo dias após a fabricação. Os resultados evidenciaram que a nisina na dose de 500 UI/mL proporcionou contagens de *S. aureus* mais baixas nos queijos, demonstrando maior efeito bactericida que a dose de 400 UI/mL. A utilização da nisina foi eficaz na redução inicial de *S. aureus* e em manter a contaminação em níveis mais baixos nos queijos Minas Frescal durante 30 dias de armazenamento.

Palavras-chave: Leite desnatado reconstituído. Bacteriocina. Efeito bactericida. Teste *in vitro* com nisina.

ABSTRACT

The use of nisin in food has been the object of several studies, dairy products included. The main objective of this research was to evaluate the antagonistic effect the addition of different nisin doses had on *Staphylococcus aureus* in Minas Frescal cheese during 30 days after being made. A preliminary *in vitro* test was carried out with four nisin doses, 100, 200, 400 and 500 IU/mL, to assess the effect on the multiplication of *S. aureus* in reconstituted nonfat milk at 10% (RNM 10%). By the data obtained at this stage, nisin concentrations of 400 and 500 IU/mL were selected to be tested on Minas Frescal cheese. Those concentrations presented higher inhibition potential against *in vitro* *S. aureus*. During the cheese manufacture process, a *S. aureus* ATCC 6538 culture was added in a sufficient amount so that the initial concentration would reach approximately 10^6 CFU/mL, and nisin concentrations of 400 and 500 IU/mL. Samples of milk, whey, curd and cheese on the first, seventh, fourteenth and thirtieth day after being made were analyzed. The results showed that nisin in 500 IU/mL provided lower counts of *S. aureus* in cheese, demonstrating a better bactericidal effect than the 400 IU/mL dose. The use of nisin was effective for the initial reduction of *S. aureus* and for maintaining its lower counts in Minas Frescal cheese during during 30 days after being made.

Keywords: Reconstituted nonfat milk. Bacteriocin. Bactericidal effect. *In vitro* test with nisin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Queijo Minas Frescal	13
2.2 Processo de fabricação do queijo Minas Frescal	13
2.2.1 Aquisição da matéria-prima	13
2.2.2 Acidificação e coagulação	14
2.2.3 Corte da coalhada e obtenção da massa	15
2.2.4 Salga	15
2.3 Valor nutricional do queijo Minas Frescal	15
2.4 Vida de prateleira	16
2.5 Produção queijeira no Brasil	17
2.6 Segurança alimentar do queijo Minas Frescal	17
2.7 Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido e comercializado no Brasil	20
2.8 <i>Staphylococcus</i> spp.....	21
2.8.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.9 Nisina em alimentos	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Cultura de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.2 Análise de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.3 Efeito inibitório <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de nisina sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em leite desnatado reconstituído a 10% esterilizado	26
3.4 Delineamento estatístico	27
3.5 Efeito antagônico da nisina sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em queijo Minas Frescal	28
3.6 Produção do queijo Minas Frescal	28

3.7 Delineamento estatístico	30
3.8 Tempo de coagulação do leite e medida dos queijos	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Efeito inibitório <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de nisina sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em leite desnatado reconstituído a 10% esterilizado	31
4.2 Efeito antagônico da nisina sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em queijo Minas Frescal	35
4.2.1 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> no leite, soro e massa	35
4.2.2 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> no queijo Minas Frescal	37
4.3 Tempo de coagulação do leite e medida dos queijos	42
5 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO - Procedimento para enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i>	53

1 INTRODUÇÃO

O queijo representa importante forma de conservação do leite, como instrumento de preservação e estocagem de alimentos para a população humana. Com a expansão e modernização do modo de produção, hoje há 18 classes de queijos no mundo, que agregam 400 tipos diferentes, em 800 denominações distintas (MENESES, 2006). Dentre eles, destaca-se o queijo Minas Frescal, produto bastante apreciado pelos brasileiros, em função das qualidades sensoriais como aroma, sabor e textura. Segundo dados da Embrapa (2004), a produção de queijo Minas Frescal no ano de 2004 foi de 4,5 mil toneladas.

Do ponto de vista alimentar pode-se afirmar que o queijo Minas Frescal apresenta elevado valor nutricional, estando entre os alimentos mais complexos e recomendáveis para a dieta de um indivíduo (GALLAGHER, 2010).

Em função das características próprias, como a disponibilidade de nutrientes, elevado teor de umidade, alterações decorrentes após a fabricação e grande manipulação durante a produção, os queijos Minas Frescal são alimentos altamente perecíveis, com baixa vida útil, suscetíveis à contaminação microbiológica; por essa questão estão frequentemente associados a intoxicações alimentares (PINTO *et al.*, 2009; GONZALEZ *et al.*, 2000; FURTADO, 2005). Dentre os principais micro-organismos contaminantes de queijos destaca-se *Staphylococcus aureus* (BALABAN; RASSOLY, 2000), micro-organismo conhecidamente enterotoxigênico (HENNEKINNE *et al.*, 2012).

Poli *et al.* (2007) sugerem que a alternativa mais eficiente para a produção de queijos seguros e redução da contaminação inicial resume-se em melhorar o nível de higiene na ordenha do leite e na fabricação do produto. Entretanto, tais medidas não são suficientes para assegurar a qualidade dos queijos produzidos, haja vista vários estudos mostrando queijos Minas Frescal com contagens microbiológicas elevadas e impróprios

para o consumo (PASSOS *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2006; SALOTTI *et al.*, 2006).

Dentre os compostos antimicrobianos existentes atualmente, há a tendência em expandir a utilização industrial de bacteriocinas naturais como conservante de alimentos, tendo em vista a ampliação do mercado consumidor em busca de alimentos sem conservantes artificiais, com baixa ou nenhuma toxicidade (MORAES, 2002; ARQUÉS *et al.*, 2011).

Atualmente, o uso da bacteriocina nisina é aprovado em mais de 50 países (BOWER *et al.*, 2002), em alimentos como queijos, frutas enlatadas, produtos de padarias, carnes e embutidos (MORAES, 2002).

A utilização de bacteriocinas em alimentos é feita pela adição direta na forma de bacteriocina purificada, produção em alimentos fermentados pela adição de culturas lácticas produtoras desses antimicrobianos ou adição dessas culturas como adjuntas (NASCIMENTO *et al.*, 2008a).

O uso de nisina em alimentos, como queijo Minas Frescal, representaria um entrave adicional ao desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis (NASCIMENTO *et al.*, 2008a), conforme demonstrado em diferentes estudos (PINTO *et al.*, 2011; CHOLLET *et al.*; 2008; ARQUÉS *et al.*, 2005).

Diante do exposto e considerando a relevância do controle de *S. aureus* para garantir a segurança alimentar dos apreciadores de queijos, buscou-se com este trabalho avaliar o efeito inibitório de diferentes concentrações de nisina sobre *S. aureus* em queijo Minas Frescal durante 30 dias de armazenamento do produto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A fabricação de queijo, um dos alimentos mais antigos registrados na história, remonta ao ano 10000 a.C., durante a domesticação de animais. Acredita-se que a descoberta da produção de queijo tenha sido espontânea, mediante a observação do leite transportado para alimentação durante as longas viagens, o qual era armazenado em cantis feitos com estômago seco de animais. A presença da quimosina nesse material, associada ao calor e à agitação, formava as condições ideais para separação de leite em soro e coalho, e assim, o queijo era formado. Séculos depois, com a domesticação de bovinos, o queijo passou a ser produzido em larga escala (IEPHA, 2011).

No Brasil, a técnica de produção do queijo foi introduzida nos primeiros anos de colônia pelos portugueses, seguindo o modo tipicamente artesanal de confecção do produto. Essa técnica foi difundida pelas demais regiões do país à medida que se expandia a busca por ouro e pedras preciosas, sobretudo no Estado de Minas Gerais, dando origem ao queijo Minas (IEPHA, 2011).

Os queijos brasileiros apresentam variações quanto aos teores de gordura e de umidade, conforme descrito na tabela abaixo (TAB. 1) (BRASIL, 1996a).

TABELA 1

Classificação de queijos conforme variação dos teores de gordura e umidade

Teor de Gordura		Teor de Umidade	
Classificação	Percentual	Classificação	Percentual
Extragordo	> 60%	Muita alta umidade	> 55%
Gordo	45,0 a 59,9%	Alta umidade	54,9 a 46%
Semigordo	25 a 44,9%	Média umidade	45,9 a 36%
Magro	10 a 24,9%	Baixa umidade	< 35%
Desnatado	< 10%		

Fonte: BRASIL (1996a)

2.1 Queijo Minas Frescal

O queijo Minas Frescal é designado como o produto fresco obtido por coagulação enzimática do leite pasteurizado com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, coagulação que seria complementada com a ação de bactérias lácticas específicas, dando origem a uma massa coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada. Deve apresentar consistência branda, cor levemente esbranquiçada, com ou sem olhaduras mecânicas, sabor suave ou levemente ácido, odor suave, com crosta fina ou não (BRASIL, 1996b).

O queijo Minas Frescal é classificado como semigordo, de muita alta umidade, a ser consumido fresco. Após a fabricação, deve ser mantido a temperaturas não superiores a 8°C para conservação (BRASIL, 1996b).

2.2 Processo de fabricação do queijo Minas Frescal

O processo básico de fabricação é comum a quase todos os queijos; entretanto, as variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação são responsáveis pela grande variedade de queijos conhecidos no Brasil e no mundo (PERRY, 2004).

2.2.1 Aquisição da matéria-prima

A qualidade do queijo Minas Frescal está diretamente associada à qualidade da matéria-prima utilizada. O leite utilizado deve ser proveniente de animais sadios, refrigerado e pasteurizado corretamente; as práticas higiênicas devem ser adequadas durante a ordenha e em todo o processamento do leite (FURTADO, 2005).

A disponibilidade de nutrientes, alta atividade de água e pH próximo da neutralidade favorecem o crescimento microbiano. A temperatura e o período de armazenamento do leite antes da pasteurização determinam seletivamente a intensidade e desenvolvimento de várias espécies de microorganismos contaminantes (ARCURI *et al.*, 2006). Os mesmos autores

ressaltam que a presença de bactérias patogênicas no leite é preocupação de saúde pública, haja vista que se torna um risco para os consumidores do produto, ou derivados deste, e para quem os manuseia.

Outra questão relevante é a produção de enterotoxinas por bactérias patogênicas presentes no leite, a exemplo da enterotoxina estafilocócica. Por se tratar de toxina termo-estável e resistente à pasteurização/ultrapasteurização, queijos produzidos com leite contaminado poderão dar origem ao produto final contaminado (BORGES *et al.*, 2008a).

2.2.2 Acidificação e coagulação

Durante o processo de coagulação do leite ocorre a concentração das proteínas com retenção das partículas de gordura. No processamento por cultura láctica são adicionadas bactérias específicas ao leite, com liberação de ácido láctico como subproduto do metabolismo. Assim, o pH reduz-se gradativamente, facilitando a ação coagulante, expulsão do soro e desfavorecendo o crescimento da microbiota indesejável no queijo (FOX *et al.*, 2000).

A acidificação direta é realizada pela adição de ácido láctico diretamente ao leite; com isso há aumento no rendimento do produto e redução das alterações físico-químicas durante a estocagem do queijo (CARVALHO *et al.*, 2007).

No processamento por ultrafiltração é utilizado o método do pré-queijo líquido, em que o queijo é obtido a partir da coagulação direta desse líquido pela adição do coalho diretamente à embalagem comercial do produto; esse processo aumenta a produtividade, tendo em vista a eliminação das etapas de corte da massa e dessoragem, e melhora as condições higiênicas do queijo, pois o processamento é feito em sistema fechado (CARVALHO *et al.*, 2007).

2.2.3 Corte da coalhada e obtenção da massa

O corte da coalhada objetiva produzir superfície livre para haver sinérese e retração do coalho. Esse corte determinará as características do produto final, pois quanto maiores os grãos, maiores serão a retenção de água e, conseqüentemente, o teor de umidade do queijo. Já na etapa de enformagem da massa, há a finalização da sinérese com as sucessivas viragens do queijo, que força a saída do soro. Nessa etapa, os queijos adquirem consistência e forma típica, com medidas e peso almejados (FOX *et al.*, 2000).

2.2.4 Salga

A salga consiste na etapa final de produção dos queijos e promove uma discreta sinérese. Entretanto, não é satisfatória para o controle de umidade de queijos. Quanto aos tipos, a salga pode ser feita no leite ou na massa previamente dessorada, a seco na superfície dos queijos e por imersão em salmoura, sendo as duas últimas mais habitualmente utilizadas nas indústrias (FOX *et al.*, 2000).

2.3 Valor nutricional do queijo Minas Frescal

O consumo de queijo e leites fermentados tem impulsionado o crescimento do setor de leite. O aumento do consumo de queijos se justifica por diversas razões, como apelo nutricional e dietético, variedade de texturas e sabores, flexibilidade e comodidade na utilização. Em função da versatilidade, o queijo é consumido sem preparação prévia ou após tratamento térmico, utilizado como componente principal de uma refeição, em doces e sobremesas (SOUZA *et al.*, 2008; JENSEN; KROGER, 2000).

O queijo Minas Frescal apresenta elevado teor de nutrientes, possuindo proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas (principalmente A e D) e minerais, como cálcio e fósforo (MENDES, 1997; ROTARU *et al.*, 2008). O valor biológico de suas proteínas se compara ao de outros alimentos de

origem animal, como carnes e ovos (GALLAGHER, 2010).

Estudo de Silva e Ferreira (2010) demonstrou que queijos Minas Frescal podem ser considerados alimentos fonte de proteínas.. Uma porção de 50 gramas do alimento representa a ingestão de aproximadamente 11% do consumo proteico diário recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa.

Em função da alta concentração de cálcio (579mg/100g queijo) e fósforo (123mg/100g queijo) (TACO, 2011), é alimento indicado para crianças, pois favorece o fortalecimento de dentes e ossos, auxiliando no crescimento saudável (QUEIJOS NO BRASIL, 2012; GALLAGHER, 2010).

O consumo de leite e derivados, portanto, deve ser estimulado, tendo em vista que a ingestão dietética desses minerais é deficiente em grande parte da população. Ratificando o fato, uma pesquisa conduzida em 2007 pela *Brazilian Osteoporosis Study* – BRAZOS (PINHEIRO *et al.*, 2009), mostrou que 90% das pessoas ingeriam diariamente cerca de 400mg de cálcio, o que equivale a apenas 33% da recomendação diária de referência - DRI.

2.4 Vida de prateleira

É crescente a busca do consumidor por produtos de qualidade, principalmente do ponto de vista microbiológico, característica que permite avaliar o alimento desde as condições de obtenção da matéria-prima, processamento, armazenamento e distribuição, além de estimar a vida de prateleira (PONSANO *et al.*, 2000).

Os queijos do tipo leves, brancos e frescos são muito perecíveis e por isso apresentam vida de prateleira curta, mesmo sob refrigeração (SILVA *et al.*, 2003), variando entre 10 e 14 dias (GONZALEZ *et al.*, 2000). Ribeiro *et al.* (2009) citam duração média de até 20 dias. Já Sangaletti *et al.* (2009) referem queijos Minas Frescal, armazenados sob temperatura de 4°C, aptos para o consumo com até 30 dias após fabricação.

Segundo Furtado (2005), o queijo Minas Frescal deve ser comercializado tão logo seja fabricado, tendo em vista que é um produto

altamente susceptível à contaminação microbiológica. Devem ser consideradas ainda as alterações decorrentes do próprio alimento, tornando o produto impróprio para o consumo em poucos dias.

2.5 Produção queijeira no Brasil

A produção de leite bovino no Brasil, em 2010, foi estimada em 31,6 bilhões de litros (EMBRAPA, 2010), o que colocou o país em 5º lugar na produção leiteira mundial. O Estado de Minas Gerais foi responsável por 27,3% da produção (IBGE, 2011). As formas de comercialização desse produto no país são os leites fluidos e em pó e seus derivados, como iogurte, queijo e requeijão.

A produção de queijos em 2004 foi de aproximadamente 450 mil toneladas, sendo que 10% foram queijos frescos, dentre os quais se destaca o queijo Minas Frescal, com produção de 4,5 mil toneladas (EMBRAPA, 2004). Dados mostram que houve aumento de 30,8% no consumo per capita de queijos de 2000 a 2008, representando crescimento de 2,6 para 3,4 kg/habitante/ano. Com base no crescimento médio no período, estima-se um consumo atual de 4 kg de queijo por habitante (LIMA FILHO, 2010).

O queijo Minas Frescal apresenta processamento simples, ausência de período de maturação, rendimento na fabricação de 6,0 a 6,5 kg de leite para 1kg de queijo e menor preço para o consumidor (FURTADO, 2005).

Lopes e colaboradores (2006) indicaram maior rentabilidade na comercialização do queijo em detrimento do leite, demonstrando que a venda do queijo agrega maior valor comercial, sem alteração significativa do custo operacional efetivo de produção.

2.6 Segurança alimentar do queijo Minas Frescal

Entende-se por segurança alimentar a garantia de bem-estar social do indivíduo, de modo que não seja privado de alimentos em quantidade que atenda às necessidades nutricionais e qualidade nutricional e higiênico-sanitária satisfatória para o consumo (CUNHA; LEMOS, 1997).

A produção de queijos com qualidade satisfatória está diretamente relacionada à qualidade do leite utilizado que, por sua vez, associa-se à sanidade do rebanho, como ausência de mastite e de resíduos de antibióticos (HENNEKINNE *et al.*, 2012). Outro ponto fundamental é a utilização de boas práticas de fabricação, tendo em vista que a produção de queijos exige frequente manipulação. Assim, esses alimentos tornam-se passíveis de contaminação por micro-organismos patogênicos e deterioradores (PINTO *et al.*, 2009). Perry (2004) ressalta que o leite com resíduos de antibióticos acarretaria perdas na produção, pois os resíduos tendem a inibir a coagulação do leite em função de alterações na microbiota lática.

Com o intuito de garantir a segurança alimentar do queijo Minas Frescal, foi criado o Regulamento Técnico Mercosul (BRASIL, 1996b), que determina condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Além disso, estabelece que o leite a ser utilizado na produção de queijo Minas Frescal deverá ser higienizado e submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente para assegurar a fosfatase residual negativa, combinado ou não com outros métodos físicos e biológicos para garantir a inocuidade dos queijos.

Embora o leite utilizado na produção de queijos frescos deve obrigatoriamente ser pasteurizado, sabe-se que tal método não é suficiente para garantir a segurança do produto final, tendo em vista que é eficiente contra *S. aureus*, entretanto não promove a inativação das suas enterotoxinas (BORGES *et al.*, 2008a; PERRY, 2004; FUEYO *et al.*, 2001).

Além das condições higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação, o Regulamento Técnico do Mercosul (BRASIL, 1996a) fixou parâmetros microbiológicos para esses tipos de queijos, de modo a assegurar o consumo (TAB. 2).

O controle de contaminantes microbiológicos nos alimentos é relevante, pois estão associados a surtos de doenças alimentares, como intoxicações, infecções e toxinfecções (RIEDEL, 2005).

TABELA 2

Parâmetros microbiológicos da Portaria nº145, de 07 de março de 1996, para queijo Minas Frescal

Micro-organismos	Critérios de aceitação
Coliformes/g(30°C)	n=5 c=2 m=10.000 M=100.000
Coliformes/g(45°C)	n=5 c=2 m=1.000 M=5.000
Estafilococos Coagulase Positiva/g	n=5 c=2 m=100 M=1.000
<i>Salmonella</i> sp / 25g	n=5 c=0 m=0
<i>Listeria monocytogenes</i> 25g	n=5 c=0 m=0

n: número de unidades da amostra; c: número aceitável de unidades da amostra representativa com resultado entre os valores m e M; m: limite inferior (mínimo) aceitável; M: limite superior (máximo) aceitável.

Fonte: BRASIL (1996a).

Dentre os principais contaminantes de queijos está a bactéria *S. aureus* (BALABAN; RASSOLY, 2000). Segundo Stamford *et al.*, (2006), o gênero *Staphylococcus* é o agente responsável por 45% das toxinfecções no mundo.

De 1998 a 2002 ocorreram 109 surtos de intoxicação estafilocócica por consumo de queijo contaminado, acometendo 1398 pessoas na América Latina e Caribe. Dos casos, 13 ocorreram no Brasil, envolvendo 72 enfermos (SIRVETA, 2012).

Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS (BRASIL, 2011), em 2011 ocorreram mais de 500 surtos no Brasil, envolvendo mais de 10 mil pessoas. Além disso, os dados mostram que a Região Sudeste é a segunda maior envolvida em surtos alimentares no país, chegando a representar 37,3% do total de casos identificados. Os agentes etiológicos mais frequentemente associados aos surtos no Brasil foram *Salmonella* ssp. e *S. aureus*, sendo que em 2009 foram identificados 122 casos envolvendo apenas *S. aureus* (BRASIL, 2011).

Apesar da magnitude do problema, os surtos de intoxicação alimentar raramente são investigados no Brasil, as notificações aos órgãos de Vigilância Sanitária são escassas, levando à subnotificação da doença, principalmente porque, na maioria dos casos, a doença cessa rapidamente, sem haver necessidade de intervenção médica (BORGES *et al.*, 2008b; BARRETO; COSTA, 1998).

A intoxicação estafilocócica apresenta sintomatologia variável, dependendo da quantidade de enterotoxina ingerida e a susceptibilidade individual. Geralmente apresenta curso brando com presença de náusea, vômito, diarreia, tontura e fraqueza cerca de 30 minutos a oito horas após ingestão do alimento contaminado. Em casos graves podem surgir dores de cabeça, prostração e redução da pressão arterial. Na maioria dos casos, a recuperação acontece de 24 a 48 horas sem tratamento específico (HENNEKINNE *et al.*, 2012).

2.7 Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido e comercializado no Brasil

Um alimento para ser considerado seguro não deve oferecer riscos biológicos, químicos ou físicos à saúde do consumidor (RIEDEL, 2005).

O crescimento dos micro-organismos em queijos depende do controle no teor de umidade, teor de sal, pH do meio, temperatura e concentração de oxigênio do meio (BERESFORD *et al.*, 2001).

Queijos Minas Frescal analisados por Peresi *et al.* (2001), quanto à presença de *Staphylococcus* coagulase positivo, apresentaram contaminação além do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira em 60% das amostras analisadas.

Salotti *et al.* (2006), em estudo na região de Jaboticabal – SP, verificaram que 10% das amostras de queijo Minas Frescal analisadas apresentaram contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo acima do padrão aceitável pela legislação.

Rocha *et al.* (2006), ao analisarem a qualidade microbiológica de sete marcas de queijo Minas Frescal vendidos em supermercados da cidade de

São Paulo, verificaram que seis das marcas analisadas apresentaram contagens elevadas de *Staphylococcus* spp., chegando a 7,83 log UFC/g de produto, ainda com sete dias após a fabricação. Os autores ressaltam que todos os queijos analisados apresentavam inspeção federal.

Queijos Minas Frescal comercializados à temperatura ambiente em feiras-livres na cidade de Goiânia apresentaram contaminação elevada por *Staphylococcus* coagulase positiva em 100% das amostras analisadas (ARRUDA *et al.*, 2007).

Passos *et al.* (2009) identificaram que 36,7% das amostras de queijo Minas Frescal, comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina – PR, estavam contaminadas com *S. aureus* além do limite recomendado pela legislação brasileira, colocando em risco a segurança alimentar dos apreciadores do produto.

Estudo de Komatsu *et al.* (2010), com queijo Minas Frescal produzido em Uberlândia - MG, apurou que de 50 amostras avaliadas, 88% estavam contaminadas com *S. aureus*, apresentando médias superiores a 10^5 UFC/g.

2.8 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococaceae, incluindo 36 espécies e 21 subespécies, classificadas em coagulase positivas - principais produtoras de enterotoxinas, e as coagulase negativas (GIAMMARINARO *et al.*, 2005).

Ainda que a legislação brasileira estabeleça parâmetros unicamente para a espécie de *Staphylococcus* coagulase positiva (BRASIL, 1996a), a produção de enterotoxina igualmente tem sido observada em *Staphylococcus* coagulase negativo, e surto de intoxicação associada à espécie (CARMO *et al.*, 2002).

No gênero *Staphylococcus*, a espécie *S.aureus* é a mais comum no leite *in natura*. Juntamente com *S. intermedius*, são as bactérias que produzem enterotoxina com maior frequência. Outras espécies que podem estar presentes na microbiota contaminante do leite são *S. carnosus*, *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. hyicus* e *S. schleiferi* (STAMFORD *et al.*, 2006).

2.8.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é encontrado, frequentemente, em seres humanos e animais. Está presente na boca, garganta, pele e cabelos de pelo menos 50% dos indivíduos saudáveis. Trata-se de bactéria esférica, gram-positiva, catalase positiva, anaeróbia facultativa, que sobrevive em faixas variáveis de temperatura, pH e atividade de água (Aa). Vistas ao microscópio, suas células apresentam-se aos pares, em cadeias curtas ou em forma de cacho de uvas. Produz grande variedade de fatores de patogenicidade e virulência, e as intoxicações alimentares decorrem da produção de enterotoxinas, altamente termoestáveis (FORSYTHE, 2002; HENNEKINNE *et al.*, 2012). As enterotoxinas produzidas por *S. aureus* pertencem ao grupo das exotoxinas e apresentam baixo peso molecular, variando entre 22 a 29 kDa (HENNEKINNE *et al.*, 2012). Os principais parâmetros para o desenvolvimento de *S.aureus* e enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos estão descritos na tabela 3.

São classificadas diversas toxinas produzidas por *S. aureus*: SEA (*Staphylococcal Enterotoxin A*), SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SEU (BALABAN; RASOOLY, 2000; FORSYTHE, 2002; SCHERRER *et al.*, 2004). Essas enterotoxinas são resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestório e permanecem ativas após a ingestão (BORGES *et al.*, 2008a).

A produção de enterotoxinas ocorreria durante todo o desenvolvimento bacteriano. Entretanto, na fase exponencial a produção é mais elevada (SORIANO *et al.*, 2002). Cerca de 59% dos surtos de intoxicação alimentar estão associadas às toxinas SEA e SEE (PINTO *et al.*, 2005), provavelmente porque *Staphylococcus* produzem essas toxinas em ampla faixa de condições de crescimento (TAB. 3) (PIMENTEL FILHO, 2010).

TABELA 3

Parâmetros para o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas em alimentos

Parâmetro	Desenvolvimento de <i>S. aureus</i>		Produção de enterotoxina	
	Ótimo	Variação	Ótimo	Variação
Temperatura				
(°C)	35 – 37	07- 48	35 – 40	01 – 45
pH	6,0 – 7,0	4,0 - 10,0	6,0 - 7,0	4,8 - 9,0
Aa	> 0,99	0,83 - 0,99	0,99	0,83 - 0,99
NaCl (%)	0 – 4	0 – 20	0 - 0,5	0 – 10
Atmosfera	Aeróbica	Aeróbica/ anaeróbica	Anaeróbica (5%-20% O ₂)	Aeróbica/ anaeróbica

Fonte: BORGES *et al.* (2008b) *apud* ICMSF (1996).

2.9 Nisina em alimentos

Bacteriocinas são peptídeos, proteínas ou complexos proteicos biologicamente ativos que possuem ação bactericida ou bacteriostática (CLEVELAND *et al.*, 2001).

A nisina foi descoberta em 1928 e trata-se de bacteriocina produzida por diversas cepas de *Lactococcus lactis* subesp. *Lactis* (CLEVELAND *et al.*, 2001), principalmente durante a fase exponencial de crescimento (NAS CIMENTO *et al.*, 2008b).

Em 1988, essa bacteriocina foi reconhecida pela Food and Drug Administration (FDA) como aditivo alimentar seguro (Substances Generally Recognized as Safe – GRAS), em função da baixa toxicidade (CLEVELAND *et al.*, 2001). A nisina é degradada pelas enzimas pepsina e tripsina no organismo (ROSA & FRANCO, 2002). BOWER *et al.* (2002) ressaltam que essa bacteriocina está naturalmente presente em alimentos fermentados e, portanto, é consumida há bastante tempo.

No Brasil, a utilização de nisina é permitida em queijos fundidos, preparados à base de queijos fundidos, requeijão e queijo pasteurizado, na dosagem máxima de 12,5 mg/Kg de produto final (BRASIL, 1996c; BRASIL, 1997). Em 1998, foi aprovado o uso da nisina em superfície externa de embutidos (BRASIL, 1998).

Essa bacteriocina possui resistência térmica, principalmente se associada a meios ácidos (ADAMS, 2003), totalmente estável em solução de pH 2,0, sendo estocada por longos períodos a temperatura entre 2°C e 7°C (NASCIMENTO *et al.*, 2008a). A ação principal se relaciona às interações eletrostáticas com os fosfolipídeos da membrana citoplasmática dos microorganismos e formação de poros (ADAMS, 2003).

A nisina apresenta atividade bactericida contra grande variedade de bactérias Gram-positivas, como as dos gêneros *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* (MORAES, 2002). As bactérias Gram-negativas possuem resistência à ação dessa bacteriocina em função do revestimento lipopolissacarídico da membrana externa que protege a membrana plasmática bacteriana (ARAUZ *et al.*, 2009). Entretanto, quando utilizada em associação com outros compostos, como agentes quelantes, a nisina demonstra eficiência contra bactérias Gram-negativas (BOWER *et al.*, 2002).

Algumas propriedades dos alimentos como pH, teor de gordura, aditivos e enzimas, limitariam a atividade bactericida da nisina (ARQUÉS *et al.*, 2011). Além disso, moderadas concentrações de NaCl seriam responsáveis por neutralizar a ação de bacteriocinas em alimentos (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004).

Diversos estudos demonstram resultados positivos na utilização de nisina em alimentos, conforme a tabela abaixo (TAB. 4).

TABELA 4

Estudos envolvendo nisina e seu potencial inibitório sobre micro-organismo alvo em alimentos

Alimento	Micro-organismo alvo	Redução*	Referência
Leite	Esporos de <i>Bacillus licheniformis</i>	4,00	MANSOUR <i>et al.</i> , 1999
Queijo coalho	<i>Staphylococcus</i> sp.	2,00	MELO, 2003
Queijo artesanal	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,45	ARQUÉS <i>et al.</i> , 2005
Carne de vitela	Bactérias aeróbicas	1,50	GUERRA <i>et al.</i> , 2005
Clara de ovo	<i>Listeria monocytogenes</i>	4,50	JIN; ZHANG, 2008

*Log UFC/g ou log UFC/mL ou log UFC/embalagem.

Fonte: Da autora.

Segundo Arevalos-Sánchez *et al.* (2011), estudos sobre a utilização de nisina são relevantes para aumentar as formas de utilização na indústria de alimentos, desde a adição diretamente ao alimento, como componente de embalagens ativas ou como sanitizante para alimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos ocorreram nos laboratórios de Microbiologia Aplicada e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, durante o período de março a setembro de 2012, em duas etapas: teste *in vitro* com diferentes concentrações de nisina e potencial inibidor sobre *S. aureus* em leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%) e efeito antagônico da nisina sobre *S. aureus* em queijos Minas Frescal.

3.1 Cultura de *Staphylococcus aureus*

Utilizou-se a cultura de *S. aureus* ATCC 6538, repicada e ativada em caldo BHI - *Brain Heart Infusion*, por três dias consecutivos e incubadas a 37°C.

3.2 Análise de *Staphylococcus aureus*

Para as análises microbiológicas de *S. aureus* utilizou-se Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) Count Plate (AOAC 981.15), conforme procedimento indicado pelo fabricante (ANEXO). De acordo com Silbernagel *et al.* (2003), o método é adequado para análise de leite e de queijos.

3.3 Efeito inibitório *in vitro* de diferentes concentrações de nisina sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em leite desnatado reconstituído a 10% esterelizado

Inicialmente reconstituiu-se leite em pó desnatado (Molico[®]) a 10% em água destilada até o volume de 1000mL, e transferiram-se porções de 200mL para cinco recipientes, os quais foram imediatamente esterilizados. Em seguida, foi inoculado *S. aureus* nos cinco recipientes em quantidade suficiente para se obter concentração inicial de 10⁵ UFC/mL,

aproximadamente. Posteriormente, foi adicionado o preparado comercial de nisina (Nisaplin[®] 2,5 % p/p - Danisco Brasil Ltda. – Cotia – SP - Brasil) diretamente ao leite, conforme indicado pelo fabricante para testes *in vitro*, em quantidade suficiente para as concentrações de 100, 200, 400 e 500 UI/mL serem alcançadas.

As amostras foram homogeneizadas e fracionadas em tubos estéreis com tampas rosqueáveis, no volume de 10mL e incubadas a 37°C. As amostras foram analisadas nos tempos 0, 3, 8, 16, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação, conforme metodologia adaptada de Pinto *et al.* (2011). Os controles seguiram as mesmas etapas descritas acima, sem a adição de nisina.

Decorrido o tempo de incubação, as amostras contidas nos tubos de ensaio foram homogeneizadas, e em seguida houve diluições decimais subsequentes, utilizando água peptonada 0,2%, até a diluição de 10⁻⁶. Posteriormente, fez-se o plaqueamento de 1ml de cada diluição das amostras em petrifilm. Os petrifilms foram incubados a 37°C por 24h para posterior leitura dos resultados.

3.4 Delineamento estatístico

O experimento foi conduzido com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial, sendo o tempo e as concentrações de nisina os fatores estudados. Os logaritmos dos números de UFC/mL foram analisados adequadamente por meio de regressão. Para a análise, foram aceitos os modelos que apresentaram nível de significância igual ou inferior a 5% para modelo e para coeficientes linear, e quadrático quando foi o caso. As análises estatísticas ocorreram com o auxílio do software *Analysis and Experimentation Group* (SAEG) – versão 8.0.

3.5 Efeito antagônico da nisina sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal

Mediante os resultados obtidos no teste *in vitro*, foram selecionadas as concentrações de nisina de 400 IU/mL e 500 IU/mL por apresentarem maior potencial de inibição sobre *S. aureus*. Tendo em vista que utilizou-se leite pasteurizado para fabricação dos queijos, a cultura ativada de *S. aureus* foi igualmente adicionada, em quantidade suficiente para atingir concentração inicial de 10^6 UFC/mL.

As análises microbiológicas aconteceram no leite, soro e massa do queijo durante o momento da fabricação e nos tempos 1, 7, 14 e 30 dias após a fabricação. Houve três produções distintas, sendo os controles produzidos sem adição de nisina (TAB. 5).

Em cada análise, foram homogeneizadas 25g (25ml no caso do leite e soro) da amostra com 225mL de água peptonada a 0,2%. Em seguida, ocorreram diluições decimais subsequentes, utilizando o mesmo diluente, até a concentração de 10^{-5} . Posteriormente, fez-se o plaqueamento de 1ml de cada diluição das amostras em petrifilm. Os petrifilms foram incubados a 37°C por 24h para posterior leitura dos resultados.

3.6 Produção do queijo Minas Frescal

Para produção dos queijos, utilizou-se leite pasteurizado tipo C adquirido no mercado local, padronizado com 3% de gordura, e cloreto de cálcio, coalho líquido e cloreto de sódio a 2%, conforme metodologia adaptada de Silva (2008) (Figura 1). Além desses itens, foram utilizadas cultura de *S. aureus* e nisina. Observaram-se todas as normas higiênico-sanitárias e boas práticas para fabricação de alimentos (Brasil, 1996a).

Após a retirada do soro, a massa foi transferida para formas com capacidade de 500g. Houve quatro viragens na massa em intervalos de 20 minutos. Na sequência, os queijos foram embalados a vácuo, para evitar outro tipo de contaminação durante o período de armazenamento, e mantidos refrigerados a 4°C durante os 30 dias de experimento. Nos tratamentos com

nisina, a adição ocorreu imediatamente após a adição de *S. aureus*. Foram produzidos quatro queijos por tratamento, um para cada dia de análise, totalizando 12 queijos por repetição.

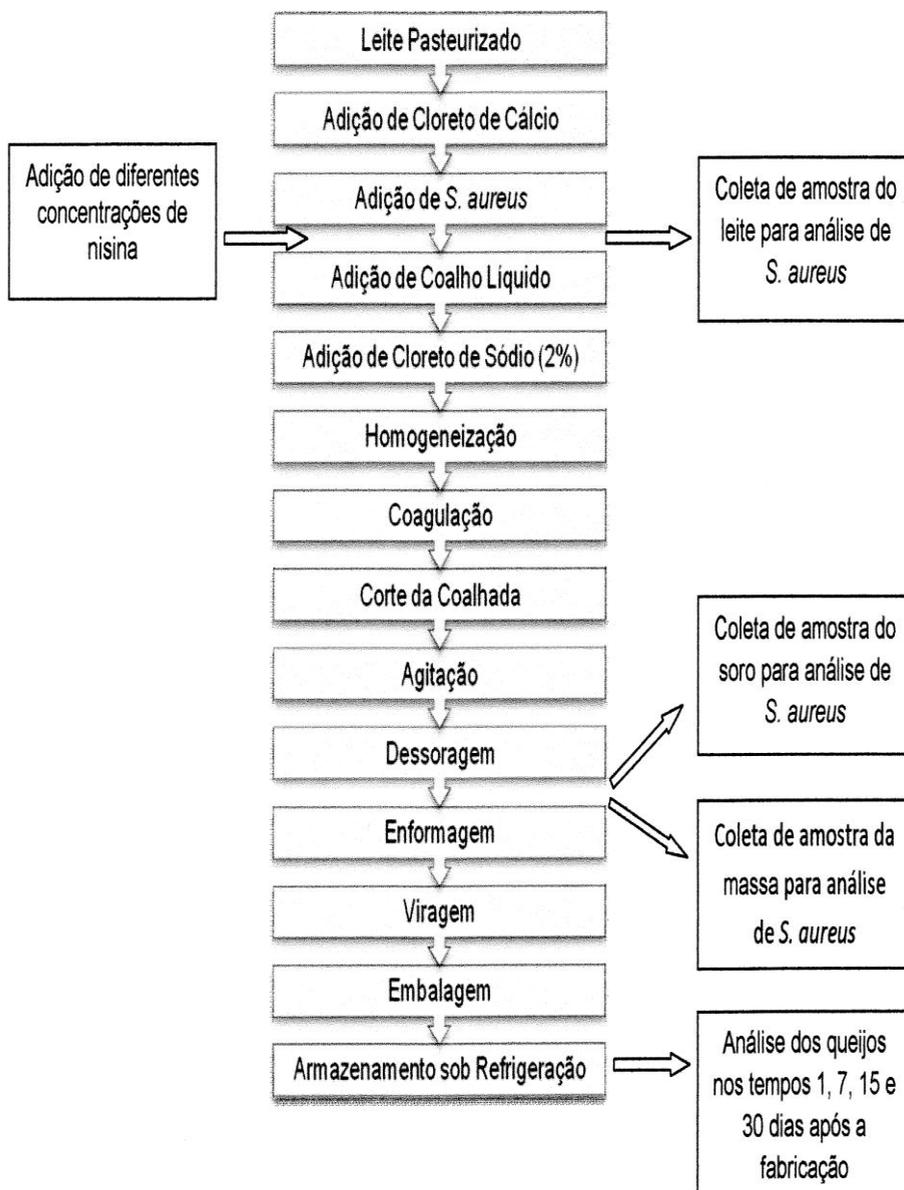


FIGURA 1 – Fluxograma de produção do queijo Minas

Fonte: Adaptado de Silva (2008).

3.7 Delineamento estatístico

O experimento foi conduzido com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey em cada tempo isoladamente. As análises ocorreram com o auxílio do software *Analysis and Experimentation Group* (SAEG) – versão 8.0.

3.8 Tempo de coagulação do leite e medida dos queijos

Durante a fabricação dos queijos, verificou-se o tempo necessário para a coagulação do leite até a formação da massa, para cada tratamento. Além disso, foram mensurados peso, altura e diâmetro dos queijos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito inibitório *in vitro* da adição de diferentes concentrações de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* em leite desnatado reconstituído esterilizado a 10%

O efeito de diferentes concentrações de nisina sobre a contagem de *S. aureus* em LDR 10% encontra-se exposto no Gráfico 1.

Observou-se que houve redução gradativa do crescimento de *S. aureus* quando a dose de 100 UI/mL de nisina foi utilizada em relação ao controle. Verificou-se ainda que a nisina apresentou efeito bactericida quando utilizada nas doses 200, 400 e 500 UI/ mL durante as primeiras oito horas de incubação.

Os coeficientes angulares das curvas de crescimento de *S. aureus* referentes ao controle e à dose de nisina de 100 UI/mL não diferiram entre si ($p \geq 0,05$), no entanto diferiram da dose de 200 UI/mL ($p < 0,05$), sendo que esta apresentou maior potencial de inibição do que aquelas. Já os coeficientes angulares de *S. aureus* nas dosagens de nisina de 400 e 500 UI/mL não diferiram entre si ($p \geq 0,05$), mas apresentaram maior efeito inibitório que as demais doses utilizadas.

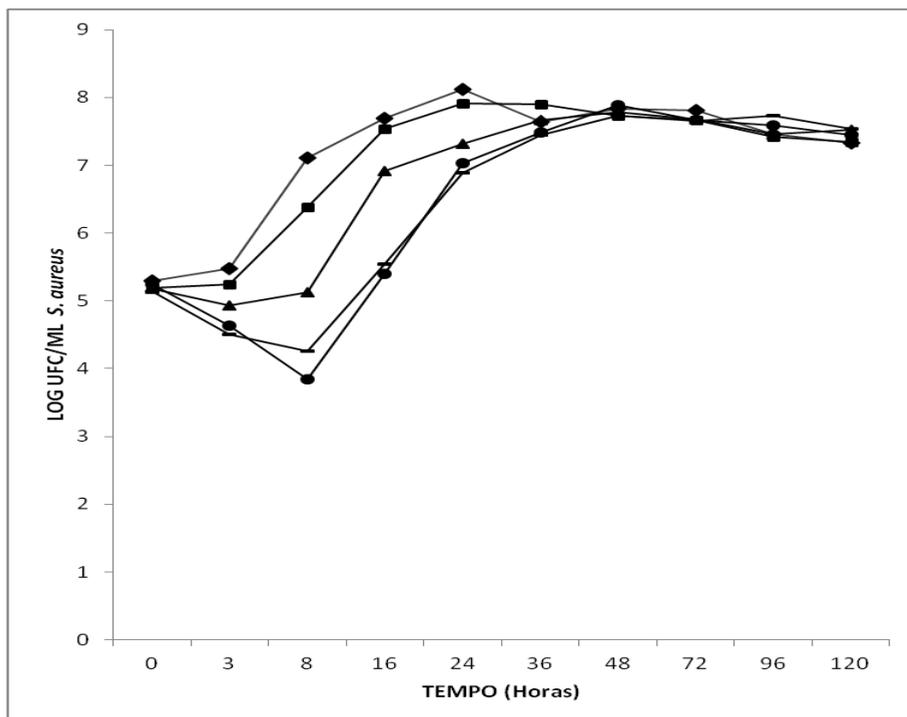


GRÁFICO 1 - Efeito de diferentes doses de nisina em LDR 10% sobre as contagens de *S. aureus*: (◆) 0 UI/mL, (■) 100 UI/mL; (▲) 200 UI/mL; (●) 400 UI/mL; e (-) 500 UI/mL

Fonte: Da autora.

Verificou-se que a fase log de crescimento de *S. aureus* nos tratamentos sem a adição de nisina e com a dose de 100 UI/mL iniciou-se logo após a inoculação do micro-organismo. Nos tratamentos com 200, 400 e 500 UI/mL a fase log iniciou-se após oito horas de inoculação.

A fase estacionária no tratamento sem adição de nisina e com a dose mais baixa da bacteriocina ocorreu entre 24 e 72 horas após a inoculação. Na dose de nisina 200 UI/mL, a fase estacionária ocorreu entre 36 e 72 horas, enquanto nas doses de 400 e 500 UI/mL o intervalo observado foi entre 48 e 96 horas.

Ainda de acordo com as curvas de crescimento de *S. aureus*, observou-se que a partir de 36 horas após a inoculação houve tendência de equiparação nas contagens do micro-organismo em todos os tratamentos,

em relação ao controle. O fato seria atribuído à ação inibitória da nisina, que diminuiu a população inicial do micro-organismo, que necessitou de maior tempo para atingir máxima contagem, observada no tratamento sem a adição da bacteriocina.

A menor contagem de *S. aureus* observada no leite ocorreu no tratamento com a adição de 400 UI nisina/mL, oito horas após inoculação, com redução de 1,46 ciclo log (TAB. 5).

TABELA 5

Valores logarítmicos médios das contagens iniciais, finais, mínimas e máximas de *Staphylococcus aureus* em leite desnatado reconstituído a 10%, na ausência de nisina e adicionado de 100, 200, 400 e 500 UI/mL de nisina.

Tratamentos (Nisina UI/mL)	Log ₁₀ UFC/mL <i>S. Aureus</i>			
	Contagem inicial	Contagem final	Contagem mínima (tempo)	Contagem máxima (tempo)
0	5,3	7,34	5,30 (0 hora)	8,12 (24 horas)
100	5,19	7,35	5,19 (0 hora)	7,91 (24 horas)
200	5,18	7,52	4,93 (3 horas)	7,78 (48 horas)
400	5,24	7,44	3,84 (8 horas)	7,88 (48 horas)
500	5,13	7,54	4,26 (8 horas)	7,73 (96 horas)

Fonte: Da autora.

Em estudo de *Arqués et al.* (2011), avaliando a atividade inibitória da nisina contra micro-organismos no leite, observou-se que após quatro horas de incubação, houve redução de 4,68 log UFC/mL de *S. aureus* no leite adicionado de nisina na dosagem de 10.000 UI/mL, quando comparado ao controle. A partir de 24 horas após inoculação reiniciou-se a multiplicação do micro-organismo, fato atribuído à presença de células resistentes.

Já García *et al.* (2010) desenvolveram trabalho com dosagens de nisina na ordem de 0,37 e 0,75 µg/ml de leite pasteurizado para avaliar potencial inibidor sobre *S. aureus*, nas concentrações de 10^2 e 10^5 UFC/mL. Os autores verificaram que a adição da bacteriocina foi capaz de inibir a multiplicação de *S. aureus* no leite. Ao final de oito horas de incubação, manteve-se a mesma contagem inicial. Diferentemente do encontrado no presente trabalho, tendo em vista que as dosagens de 200, 400 e 500 UI de nisina/mL apresentaram ação bactericida sobre o crescimento populacional de *S. aureus* e não apenas bacteriostática.

Grisi e Gorlach-Lira (2005), em estudo com dosagens de nisina de 100, 300 e 600 µg/ml de BHI, para avaliar potencial inibidor sobre *S. aureus* (cepa ETP 33), igualmente verificaram efeito bacteriostático. A bacteriocina apresentou efeito inibitório durante oito horas de incubação, mantendo a contagem inicial de *S. aureus* para as concentrações avaliadas. Entretanto, após esse período, houve rápido crescimento, alcançando população semelhante ao controle em 24 horas após a incubação. No presente estudo, observou-se essa condição com 36 horas após a incubação.

Pimentel Filho (2010) observou que a fase lag de *S. aureus* 6538 apresentou aumento de sete horas, em caldo *Tryptic Soy Broth*, tratado com diferentes concentrações de nisina. Quando o experimento ocorreu com leite integral UHT - *Ultra High Temperature*, verificou-se que a nisina, nas doses de 400 e 800 UI/mL, não inibiu o crescimento de *S. aureus*. Na dose de 1200 UI/mL, a nisina exerceu efeito bactericida frente à *S. aureus*. Entretanto, o crescimento foi reassumido e atingiu 8,38 log UFC/mL ao fim do experimento. O autor atribuiu o resultado à seleção de células bacterianas resistentes no leite.

Ao longo do experimento, a maior contagem de *S. aureus* ocorreu no tratamento sem adição de nisina, com 24 horas após a inoculação, atingindo 8,12 log UFC/mL. Essa contagem não foi verificada em nenhum dos tratamentos com adição de nisina, nem mesmo em períodos posteriores de incubação (Tabela 5). Resultados semelhantes foram encontrados por Pinto (2008) e Teodoro (2012), com LDR a 12%, que também observaram as

maiores contagens de *S. aureus* nos tratamentos sem adição de nisina, após 48 horas de inoculação do micro-organismo, de 8,75 log de UFC/mL e 7,24 log de UFC/mL, respectivamente.

Embora a nisina nas doses de 200, 400 e 500 UI/mL tenha apresentado ação bactericida sobre *S. aureus*, decidiu-se por dar continuidade à segunda etapa do experimento utilizando-se as dosagens mais altas, tendo em vista que a dosagem de 400 UI/mL foi a que proporcionou menor contagem de *S. aureus* no LDR, e na dose de 500 UI/mL a contagem máxima de *S. aureus* ocorreu somente 96 horas após a inoculação do micro-organismo.

4.2 Efeito antagônico da nisina sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal

4.2.1 Contagem de *Staphylococcus aureus* no leite, soro e massa

O efeito de diferentes concentrações de nisina sobre a contagem de *S. aureus* no leite, soro e massa durante o processo de fabricação do queijo Minas Frescal está apresentado na Tabela 6.

Na análise do leite, observou-se que os tratamentos adicionados da bacteriocina apresentaram contagens menores que no controle ($p < 0,05$), reduzindo em 0,75 (11,90%) e 0,91 (14,40%) ciclo log de *S. aureus* para as doses de 400 UI/mL e 500 UI/mL, respectivamente. Entretanto, a diferença entre as doses não foi estatisticamente significativa.

Resultados superiores a estes foram encontrados no estudo de Takahashi *et al.* (2003), ao verificarem que a nisina, na dosagem de 400 UI/mL, inibiu em 26,2% a população de *S. aureus* (FRI-196E) em leite cru. Entretanto, os autores trabalharam com contaminação inicial mais baixa, de $6,03 \times 10^2$ UFC/mL.

TABELA 6

Contagem de *S. aureus* em função das diferentes doses de nisina e das diferentes etapas de fabricação do queijo Minas Frescal

Etapas	Log ₁₀ UFC/mL <i>S. aureus</i>		
	Dose de nisina (UI/mL)		
	0	400	500
Leite	6,30 ^a	5,55 ^b	5,39 ^b
Soro	5,48 ^a	4,50 ^b	3,40 ^c
Massa	4,59 ^a	2,91 ^b	2,49 ^c

Para cada tempo isoladamente, as médias seguidas por letras diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

A literatura relata a utilização de nisina com o objetivo de aumentar a vida de prateleira de leite e queijo, a exemplo do estudo de Mitra *et al.* (2011), que demonstrou extensão de dois meses na vida de prateleira de leite pasteurizado sob refrigeração após a adição de nisina.

Em outro estudo, verificou-se que houve aumento na vida útil de 21 dias no queijo controle para 35 dias nos queijos adicionados de nisina na dose de 50 UI/g, e para 42 dias nos adicionados de 150 UI/g (KYKKIDOU *et al.*, 2007).

As contagens de *S. aureus* no soro foram menores ($p < 0,05$) nos tratamentos com adição de nisina do que a concentração observada no controle, quando analisadas em cada tempo separadamente. Na dose de 400 UI/mL houve redução de 0,98 ciclo log, e na dose de 500 UI/mL, 2,02 ciclos log, com diferença estatística entre as doses utilizadas (TAB 6).

Na análise da massa, verificou-se que na dose de 400 UI/mL houve redução de 1,68 ciclo log de *S. aureus*, em relação ao controle ($p < 0,05$). Na dose de 500 UI/mL houve redução de mais de 2 ciclos log ($p < 0,05$), o que confirmou a ação bactericida da bacteriocina durante a fabricação dos queijos, reduzindo a contagem de *S. aureus* para números inferiores ao limite preconizado pela legislação, que é de 10^3 UFC/g (Brasil, 1996a).

Em trabalho de Teodoro (2012), com queijos feitos a partir de leite cru, foi demonstrada a eficácia da nisina, em dosagens mais baixas que as utilizadas no presente estudo. Na dose de 100 UI/mL, a autora verificou a inibição do desenvolvimento de *S. aureus* até a obtenção da massa, tendo em vista que a fase log do micro-organismo somente iniciou-se após esse momento. Por outro lado, nos queijos sem adição de nisina, a fase log iniciou-se ainda no leite cru. No entanto, deve-se considerar que, no leite cru, a própria microbiota endógena pode contribuir para a inibição do crescimento de *S. aureus*, potencializando a ação da nisina.

Semelhante ao encontrado no presente trabalho, o estudo de Pinto (2008), com queijos artesanais produzidos no município do Serro - MG, demonstrou que a nisina apresentou eficiência na inibição de *S. aureus* nas etapas de coagulação do leite e separação do soro, fato que resultou em concentrações iniciais mais baixas do micro-organismo nos queijos.

4.2.2 Contagem de *Staphylococcus aureus* nos queijos Minas Frescal

Conforme exposto na Tabela 7, observou-se que embora as contagens de *S. aureus* tenham aumentado nos queijos, com o decorrer do armazenamento esse aumento foi menor nos tratamentos com adição de nisina, quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Verificou-se diferença estatística entre todos os tratamentos.

Os queijos adicionados de nisina, mesmo após 30 dias de armazenamento, apresentaram contagens mais baixas que as verificadas no tratamento controle, evidenciando o efeito inibitório desejável do antimicrobiano utilizado.

TABELA 7

Contagem de *Staphylococcus aureus* em função das diferentes doses de nisina e dos diferentes dias (1º, 7º, 15º e 30º) após fabricação dos queijos Minas Frescal

Log ₁₀ UFC/mL <i>S. aureus</i>			
Dias	Dose de nisina (UI/mL)		
	0	400	500
1	6,68 ^a	5,54 ^b	4,73 ^c
7	6,95 ^a	6,16 ^b	5,65 ^c
14	7,54 ^a	6,52 ^b	5,91 ^c
30	6,72 ^a	6,51 ^b	6,13 ^c

Para cada tempo isoladamente, as médias seguidas por letras diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

Verificou-se que a ação inibitória da nisina foi progressivamente menor com relação à inibição de ciclos log de *S. aureus* em função do tempo após fabricação dos queijos (TAB. 8). Entretanto, há que se considerar que, no tratamento controle (TAB. 7), a partir do 14º dia de armazenamento dos queijos, houve tendência de decréscimo da população de *S. aureus*, indicando o início da fase de morte celular. Essa condição não foi observada nos tratamentos adicionados de nisina. Uma possível justificativa seria o fato do antimicrobiano ter diminuído as contagens iniciais do micro-organismo estudado, aumentando o tempo para atingir a contagem máxima e, posteriormente, a morte celular, não detectada neste estudo.

As menores inibições da nisina sobre *S. aureus* foram verificadas no 30º dia de experimento (TAB. 8), sugerindo a minimização do potencial inibitório da bacteriocina frente ao aumento populacional de *S. aureus* e/ou pela possível seleção de células resistentes à ação da bacteriocina.

TABELA 8

Redução de ciclos log de *Staphylococcus aureus* em relação às contagens do tratamento controle conforme dia de análise dos queijos Minas Frescal

Redução de ciclos log de <i>S. aureus</i>		
Dias	Dose de nisina (UI/mL)	
	400	500
1	1,14	1,95
7	0,71	1,30
14	1,02	1,63
30	0,21	0,59

Fonte: Da autora.

Corroborando as hipóteses citadas, Venema *et al.* (1995) consideram que algumas cepas de bactérias, após contato com os antimicrobianos, são capazes de produzir proteína de imunidade ou podem passar por processo de mutação espontânea, tornando-se resistentes à ação de bacteriocinas.

Além disso, Nascimento *et al.* (2008a) ressaltam que a eficiência inibitória das bacteriocinas se associaria ao nível de contaminação do alimento pelo micro-organismo alvo, pois a contaminação inicial muito elevada torna a atividade da bacteriocina restrita, não impedindo o desenvolvimento do micro-organismo. Fato ratificado por Hamama *et al.* (2002), ao analisarem queijos inoculados com 10^3 UFC/g e 10^5 UFC/g de *S. aureus*, na presença e ausência de nisina. Nos queijos adicionados da bacteriocina não houve detecção de *S. aureus*, após quatro dias de fabricação e armazenamento a 4°C; já nos queijos produzidos sem a nisina, a presença de *S. aureus* foi confirmada. Quando o inóculo foi de 10^5 UFC/g, verificou-se a presença de *S. aureus* nos queijos até o terceiro dia de armazenamento e presença de enterotoxina após 24 horas da inoculação.

Outra possível hipótese para a minimização do potencial inibitório da nisina sobre *S. aureus* neste estudo estaria relacionada à dessoragem do

produto, processo comum durante o armazenamento de queijo Minas Frescal, o que pode ter facilitado a agregação das partículas de gordura em função do menor teor de água livre, criando barreira contra a ação da nisina (CHOLLET *et al.*, 2008). A eficácia das bacteriocinas como conservantes de alimentos pode ainda variar em função da distribuição irregular das moléculas de bacteriocina na matriz alimentar (GÁLVEZ *et al.*, 2007).

Bouttefroy e Millère (2000) complementam que o crescimento de bactérias em alimentos tratados com bacteriocina aconteceria em decorrência da adição de concentrações desses antimicrobianos em quantidade insuficiente para inativar todas as células bacterianas.

Observando ainda a Tabela 8, infere-se que os queijos adicionados da maior dose de nisina apresentaram as contagens de *S. aureus* mais próximas de 10^5 UFC/mL, sendo que no primeiro dia após a fabricação a contagem foi mais baixa, de 4,75 log UFC/mL. Isso sugere que a nisina pode ser alternativa importante para dificultar a produção de enterotoxinas em queijo Minas Frescal, principalmente se a contaminação inicial do produto for mais baixa, fato corroborado por Hamama *et al.* (2002).

No que tange à produção de enterotoxinas, Borges *et al.* (2008a) enfatizam que contagens elevadas de *S. aureus* em alimentos, superiores a 10^5 UFC/mL, favoreceriam a produção de enterotoxina estafilocócica sob condições ambientais adequadas. Não obstante, Borelli *et al.* (2011) identificaram contagens de *S. aureus* na ordem de 10^8 UFC/g de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, e em nenhuma das amostras analisadas detectaram-se enterotoxinas.

Segundo Hamama *et al.* (2002), o comportamento de *S. aureus* pode ser alterado em função do tamanho de sua população inicial, da competição com a microbiota natural do alimento e das condições da fermentação. Dessa forma, a ocorrência de enterotoxinas estafilocócicas em produtos lácteos parece estar associada mais diretamente à habilidade das cepas em produzir enterotoxinas do que, de fato, ao grau de contaminação por *Staphylococcus* (Borges *et al.*, 2008a).

Inibição inferior à encontrada no presente trabalho foi verificada por Pimentel Filho (2010), ao verificar que o queijo Minas Frescal com contagens

iniciais de *S. aureus* na ordem de 10^4 UFC/g apresentou redução de apenas um ciclo log em 15 dias de estocagem do produto a 4 °C, quando tratado com dose de 600 UI/g de nisina combinada com outra bacteriocina, sendo o crescimento reassumido após esse período.

Resultado de inibição igualmente inferior ao do presente trabalho foi encontrado por Arqués *et al.* (2005), que testaram a ação de bactérias lácticas produtoras de nisina sobre queijos produzidos a partir de leite cru adicionado de *S. aureus*. Apuraram que os queijos com contagem inicial de 6,46 ciclos log apresentaram contagem de 6,07 no terceiro dia após fabricação e 5,89 ciclos log 20 dias após a produção dos queijos, com redução de 0,39 e 0,57 ciclos log, respectivamente.

Os resultados de Pinto *et al.* (2011) foram superiores ao do presente estudo, ao analisarem o potencial inibidor da nisina frente à *S. aureus* em queijo Minas artesanal no Serro - MG. Verificou-se redução na contagem de *S. aureus* de 0,7 ciclo log na dose de nisina 100 UI/mL e 2,0 ciclos log na dose de 500 UI/mL, em relação ao tratamento com ausência de nisina, após sete dias de fabricação do produto. Entretanto, os autores relatam que outros fatores podem ter agido sinergicamente, contribuindo com a atuação da nisina, a exemplo das alterações físico-químicas decorrentes do processo de maturação dos queijos.

Teodoro (2012) demonstrou eficácia da nisina (dose de 500 UI/mL) no controle de *S. aureus* em queijo Minas artesanal na Serra da Canastra – MG até o sétimo dia de maturação do queijo, com aumento da fase de lag de multiplicação do micro-organismo. Além disso, os queijos tratados com nisina atingiram a contagem máxima prevista pela legislação (10^3 UFC/g) apenas aos 30 dias de maturação.

Apesar dos resultados encontrados neste trabalho, ressalte-se que a utilização da nisina deve ser empregada como parte do sistema de conservação de alimentos, mas não deve substituir as boas práticas de fabricação, fundamentais para a produção de alimentos seguros (NASCIMENTO *et al.*, 2008a; SCHULZ *et al.*, 2003).

4.3 Tempo de coagulação do leite e medida dos queijos

Com relação ao tempo de coagulação do leite, durante a fabricação dos queijos Minas Frescal verificou-se que não houve diferença nos tratamentos, sendo que o tempo médio gasto foi de 62 minutos para o tratamento sem nisina; para o tratamento com 400 UI nisina/mL foram gastos 65 minutos e para 500 UI nisina/mL 63 minutos. Portanto, a nisina não exerceu influência sobre o processo de coagulação do leite.

As médias de peso e altura dos queijos para o controle 400 UI nisina/mL e 500 UI nisina/mL, foram de 216g e 2,25cm, 224g e 2,31cm, 219g e 2,28cm, respectivamente. O diâmetro dos queijos de todos os tratamentos foi padronizado pelo diâmetro da forma utilizada, em 11cm. Observou-se que os queijos provenientes dos diferentes tratamentos apresentaram medidas semelhantes, demonstrando que a nisina não exerceu influência sobre o tamanho deles.

5 CONCLUSÃO

A adição de nisina nas dosagens de 400 UI/mL e 500 UI/mL em queijo Minas Frescal foi eficaz em reduzir as populações iniciais de *S. aureus* e em manter os níveis de contaminação mais baixos ao longo dos 30 dias de armazenamento sob refrigeração.

Os queijos adicionados de nisina na dose de 500 UI/mL apresentaram contagens de *S. aureus* mais baixas, demonstrando que essa concentração apresentou maior ação inibitória que a dose de 400 UI/mL.

Infere-se, portanto, que a nisina representou obstáculo adicional frente ao desenvolvimento de *S. aureus*, podendo ser importante aliada no processo de conservação do queijo Minas Frescal.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. Nisin in multifactorial food preservation. In: ROLLER, S. **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**. England: Woodhead Publishing Limited, p. 11-33, 2003.
- ARAUZ, L. J.; JOZALA, A. F.; MAZZOLA, P. G.; PENA, T. C. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 146-154, 2009.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ANGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- AREVALOS-SÁNCHEZ, M.; REGALADO, C.; MARTIN, S. E.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, J.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E. Effect of neutral electrolysis water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilms, and on listeriolysin O activity. **Food Control**, v. 24, p. 116-122, 2011.
- ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; GAYA, P.; MEDINA, M.; GUAMIS, B.; NUÑEZ, M. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 254-260, 2005.
- ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. **Food Control**, v. 22, p. 457-461. 2011.
- ARRUDA, M. L. T.; NICOLAU, E. S.; REIS, A. P.; ARAÚJO, A. S. MESQUITA, A. J. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijos Minas tipos frescal e padrão comercializados nas feiras-livres de Goiânia-GO. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, p. 292-298, 2007.
- BALABAN, N.; RASSOLY, A. *Staphylococcus enterotoxins*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1-10, 2000.
- BARRETO, S. M.; COSTA, M. F. L. Investigação de um surto de intoxicação alimentar em Belo Horizonte, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 14, n. 2, p. 442-443, 1998.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4, p. 259-274, 2001.
- BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; BRANDÃO, L. R.; VIANNA, C. R.; FERREIRA, M. C.; GOMES, F. C. O.; CARMO, L. S.; HENEIDE, L. D. G.; ROSA, C. A. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening

process of a traditional Minas cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 481-487, 2011.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYEV, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p.1431-1438, 2008a.

BORGES, M. F.; ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A. Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 71-86, 2008b.

BOUTTEFROY, A.; MILLIÈRE, J. Nisin-curvaticin 13 combination for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 65-75, 2000.

BOWER, C. K.; PARKER, J. E.; HIGGINS, A. Z.; OEST, M. E.; WILSON, J. T.; VALENTINE, B. A.; BOTHWELL, M. K.; McGUIRE, J. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. **Colloids and Surfaces**, v. 25, p. 81-90, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. **Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos**, 1996a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 145 de 13 de dezembro de 1996. Alterada pela Instrução Normativa nº 4 de 01 de março de 2004. **Regulamento técnico Mercosul de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal**, 1996b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Revisão nº 6 do compêndio da legislação de alimentos: atos do Ministério da Saúde**. São Paulo: ABIA, v. 1, p. 3-31, 1996c.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do requeijão**, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ofício: AUO/DOI/DISPOA nº 563/1998. **Autorização de uso de produto**, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. **Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2011_site.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2012.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARD, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, p. 262–267, 2007.

CHOLLET, E.; SWESI, Y.; DEGRAEVE, P.; SEBTI, I. Monitoring nisin desorption from a multi-layer polyethylene-based film coated with nisin loaded HPMC film and diffusion in agarose gel by an immunoassay (ELISA) method and a numerical modeling. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 208–214, 2009.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

CUNHA, A. R. A. A.; LEMOS, M. M. **Segurança alimentar sob o prisma das políticas urbanas de abastecimento**. Texto para discussão n.113, 1997. Disponível em: <<http://cedeplar.ufmg.br/pesquisas/td/TD%20113.pdf>>. Acesso em: 03 abr. 2011.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 273-285, 2004.

EMBRAPA. Pesquisa da Pecuária Nacional. **Estatísticas do Leite**. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/>>. Acesso em: 03 jun. 2011.

FORSYTHE, S. J. Micro-organismos causadores de doenças de origem alimentar. In: FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, cap. 5, p. 155-204, 2003.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 587 p., 2000.

FUEYO, J. M.; MARTIN, M. C.; GONZÁLEZ-HERVIA, M. A.; MENDONZA, M. C. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food sample. Relation between genetic types and enterotoxin. **Journal Food Microbiology**, v. 67, p. 139-145, 2001.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 200p. 2005.

GALLAGHER, M. L. Os nutrientes e seu metabolismo. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 3, p. 39-143, 2010.

GÁLVEZ, A. ABRIOUEL, H. LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51-70, 2007.

GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, L.; RODRÍGUEZ, A. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 151–155. 2010.

GUERRA, N. P.; MACÍAS, C. L.; AGRASAR, A. T.; CASTRO, L. P. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin® as biopreservative agent. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 106-110, 2005.

GIAMMARINARO, P.; LEROY, S.; CHACORNAC, J. P.; DELMAS, J.; TALON, R. Development of a new oligonucleotide array to identify Staphylococcal strains at species level. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3673-3680, 2005.

GONZALEZ, A. G. M.; ROSA, A. C. P.; ANDRADE, J. R. C.; TIBANA, A. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 321-328, 2000.

GRISI, T. C. S. L.; GORLACH-LIRA, K. Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and in the meat of land crab (*ucides cordatus*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p.151-156, 2005.

HAMAMA, A.; HANKOURI, N. E.; AYADI, M. E. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 933-938, 2002.

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

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=2241>. Acesso em: 04 jun. 2012.

IEPHA. Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais. **Histórico**. Disponível em: <http://www.iepha.mg.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=28&Itemid=59>. Acesso em: 07 abril 2011.

JENSEN, R. G.; KROGER, M. The importance of milk and milk products in the diet. In: MILLER, G. D.; JARVIS, J. K.; McBEAN, L. D. **Handbook of Dairy Foods and Nutrition**. 2. ed. Boca Raton, p. 1–64, 2000.

JIN, T.; ZHANG, H. Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 3, p. 127-134, 2008.

KYKKIDOU, S.; POURNIS, N.; KOSTOULA, O. K.; SAVVAIDI, I. N. Effects of treatment with nisin on the microbial flora and sensory properties of a Greek soft acid-curd cheese stored aerobically at 4°C. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1254–1258, 2007.

KOMATSU, R. S.; RODRIGUES, M. A. M.; LORENO, W. B. N.; SANTOS, K. A. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas frescal produzidos em Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 316-321, 2010.

LIMA FILHO, R. R. **Aumenta o consumo de queijo no Brasil**. 2010. Disponível em: <<http://www.scotconsultoria.com.br/leite/mercado-leite/161/aumenta-o-consumo-de-queijo-no-brasil.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

LOPES, M. A.; CARMO, E. A.; LIMA, A. L. R.; CARVALHO, F. M. Análise de rentabilidade de uma empresa com opção de comercialização de queijo ou leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 642-647, 2006.

MANSOUR, M.; AMRI, D.; BOUTTEFROY, A.; LINDER, M.; MILLIERE, J. B. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 311-324, 1999.

MELO, N. R. **Avaliação de embalagem ativa por incorporação de nisina na inibição de *Staphylococcus* sp.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 73 f. 2003.

MENDES, A. C. R. O valor nutricional do queijo: composição química, aspectos sensoriais e dietéticos de interesse para o consumidor. **Leite e Derivados**, v. 4, p. 54-61, 1997.

MENESES, J. N. C. **Queijo artesanal de Minas – Patrimônio Cultural do Brasil**. Dossiê interpretativo. Belo Horizonte, v.1, 2006.

MITRA, S.; MUKHOPADHYAY, B. C.; BISWAS, S. R. Potential application of the nisin Z preparation of *Lactococcus lactis* W8 in preservation of milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 98–105, 2011.

MORAES, D. A. **Otimização da produção de nisina em meio sintético**. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica), Universidade de São Paulo, São Paulo. 185 f. 2002.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008a.

NASCIMENTO, M. S.; FINATTI, D. P.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Atividade antimicrobiana de *Lactococcus lactis subsp. Lactis* ATCC 11454 produtor de nisina sobre patógenos gram-positivos. **Brazilian Journal Food Technological**, v. 11, n. 4, p. 322-328, 2008b.

PASSOS, A. D.; FERREIRA, G. K. L. F.; JULIANI, G. L.; SANTANA, E. H. W.; ARAGON-ALEGRO, L. C. Avaliação microbiológica de queijos minas frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina – PR. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 369, p. 48-54, 2009.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M. Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Revista Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PIMENTEL FILHO, N. J. **Atividade das bacteriocinas bovina HC5 e nisina sobre *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 70 f. 2010.

PINHEIRO, M. M.; SCHUCH, N. J.; GENARO, P. S.; CICONELLI, R. M.; FERRAZ, M. B.; MARTINI, L. A. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Nutrition Journal**, v. 8, p. 1-8, 2009.

PINTO, M. S. **Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria* sp e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal do Serro**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 71 f. 2008.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 340–352, 2005.

PINTO, M. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; MARTINS, J. M.; TEODORO, V. A. M.; PIRES, A. C. S.; FONTES, L. B. A.; VARGAS, P. I. R. Segurança alimentar do queijo Minas artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 4, p. 342-347, 2009.

PINTO, M. S.; CARVALHO, A. F.; PIRES, A. C. S.; SOUZA, A. A. C.; SILVA, P. H. F.; SOBRAL, D.; PAULA, J. C. J.; SANTOS, A. L. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 90-96, 2011.

POLI, A.; GUGLIELMINI, E.; SEMBENI, S.; SPIAZZI, M.; DELLAGLIO, F.; ROSSI, F.; TORRIANI, S. Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a Protected Designation of Origin Italian cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 529-534, 2007.

PONSANO, E. H. G.; PANSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; DELBEM, Á. C. B.; PERRI, S. H. V. Correlação entre as técnicas de NMP e Petrifilm EC na determinação de coliformes em leite pasteurizado e queijo tipo mussarela. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 316, p. 22-26, 2000.

QUEIJOS NO BRASIL. Disponível em: <<http://www.queijosnobrasil.com.br/queijo-e-nutricao.html>>. Acesso em: 02 jul. 2012.

RIBEIRO, E. P.; SIMÕES, L. G.; JURKIEWICZ, C. H. Desenvolvimento de queijo Minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 19-23, 2009.

RIEDEL, G. Transmissão de doenças pelos alimentos. In: RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, cap. 7, p. 73-190, 2005.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo de minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Conscientiae Saúde**, v. 01, p. 9-15, 2002.

ROTARU, G.; MOCANU, D.; ULIESCU, M.; ANDRONOIU, D. Research studies on cheese brine ripening. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 2, p. 30-39, 2008.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, C. F. B.; AMARAL, A.; MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo Minas frescal comercializado no Município de Jaboticabal, SP, no período de julho a dezembro de 2002. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p.171-175, 2006.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; BRAZACA, S. G. C.; YAGASAKI, C. A.; DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. V. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SCHEERER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J. E.; ZWEIFEL, C.; STHEPAN, R. Phenotypic and Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, n. 101, p. 101-107, 2004.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BONELLI, R. R.; NUNES, M. M.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocins: mechanism of action and use in food preservation. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 229-235, 2003.

SILBERNAGEL, K. M.; JECHOREK, R. P.; CARVER, C. N.; HORTER, B. L.; LINDBERG, K. G. 3MTM Petrifilm TM Staph Express Count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected dairy foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 5, p. 963-970, 2003.

SILVA, L. A. V. **Staphylococcus coagulase positiva em queijo Minas frescal**. Dissertação (Higiene veterinária e processamento tecnológico de produtos de origem animal), Universidade Federal Fluminense, Bom Jesus do Itabapoana. 63 f. 2008.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology** v. 81, p. 241–248, 2003.

SILVA, L. F. M.; FERREIRA, K. S. Avaliação de rotulagem nutricional, composição química e valor energético de queijo Minas frescal, queijo minas frescal “light” e ricota. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n.3, p. 437-441, 2010.

SIRVETA - **Sistema de Informacion para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos**. Disponível em: <http://www.panalimentos.org/sirvetaipz/report_eta01.asp>. Acesso em: 01 jun. 2012.

SORIANO, J. M.; FRONT, G.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n. 2, p. 60-67, 2002.

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, n. 1, p. 71-75, 2008.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* ssp. isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas**, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.

TACO – **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4. ed. Campinas: NEPA/UNICAMP, 161 p. 2011.

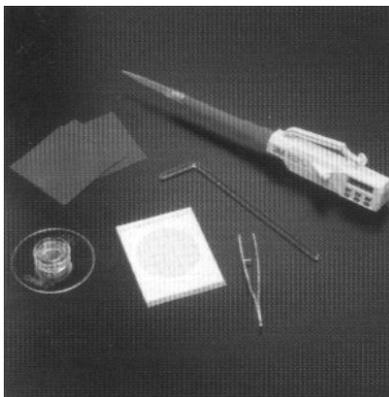
TAKAHASHI, H. T.; MIGLIORANZA, L. H. S.; GÓMEZ, R. J. H. C. Aplicação da nisina em leite cru para inibição de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. **Revista Indústria de Laticínios**, v. 58 p. 78-84, 2003.

TEODORO, V. A. M. **Efeito da nisina na multiplicação de *Staphylococcus aureus* e nas características físico-químicas, reológicas e microbiológicas do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra – MG**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 138 f. 2012.

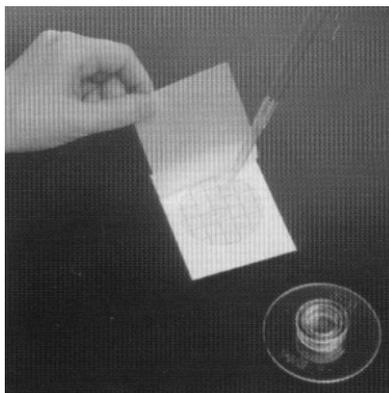
VENEMA, K.; VENEMA, G.; KOK, J. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. **Trends in Microbiology**, v. 3, p. 299-304, 1995.

ANEXO - Procedimento para enumeração de *Staphylococcus aureus*

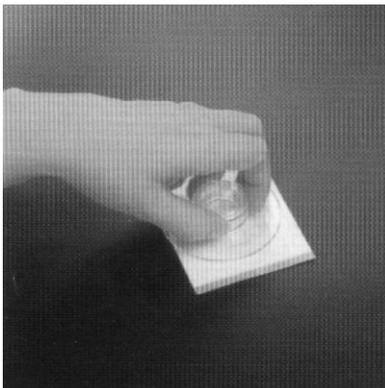
1. Colocar a placa Petrifilm RSA em uma superfície plana.



2. Levantar o filme superior e colocar 1 mL da amostra ou da amostra diluída no centro do filme inferior.



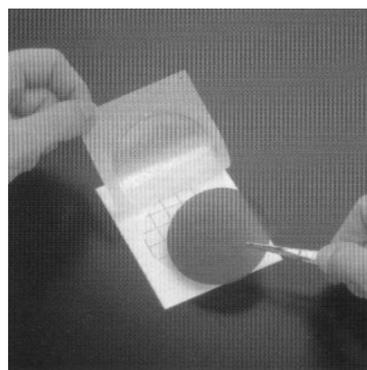
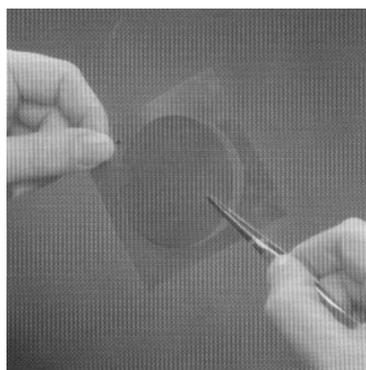
3. Deslizar devagar o filme superior sobre a amostra inoculada para evitar a formação de bolhas.
4. Posicionar o difusor plástico no centro da placa.
5. Pressionar delicadamente o centro do difusor plástico para distribuir uniformemente. Não arrastar o difusor sobre o filme.
6. Remover o difusor e não tocar na placa por pelo menos um minuto para deixar que o gel solidifique.



Tempo e temperatura de incubação

1. As placas de Petrifilm RSA são incubadas na posição horizontal, o lado transparente para cima, em pilhas de até 10 placas. O ambiente na estufa deverá estar umidificado. A perda de umidade de uma placa indica perda de peso, não deve ser superior a 15% durante a incubação.
2. Incubar por $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ou $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Após $24\text{h} \pm 2\text{h}$ de incubação, colônias podem estar presentes, mas não visíveis, nas placas Petrifilm RSA, porque os indicadores estão no Disco Reativo de TNase. Transferir as placas Petrifilm RSA em pilhas de não mais de 10 placas para estufa com temperatura equilibrada, a $62^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, e, incubar por no mínimo 60 minutos e no máximo 4 horas. Nessa etapa, há inativação das nucleases termolábeis, e as nucleases termoestáveis permanecem intactas. Caso colônias viáveis sejam necessárias para identificação posterior, deverão ser incubadas por no mínimo 60 minutos, e no máximo 70 minutos. É importante que se as placas Petrifilm RSA não são incubadas a $62^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 1-4 horas, colônias produtoras de nuclease, incluindo colônias de outros gêneros, poderão dar reação falso-positiva. As placas inoculadas deverão ser incubadas na parte central e não no fundo da estufa, pois temperaturas excessivas podem interferir no desempenho das placas Petrifilm RSA.
4. Após um mínimo de 60 minutos e um máximo de 4 horas, as placas são retiradas da estufa.

- Retirar do pacote uma moldura quadrada contendo o Disco Reativo de TNase, tomando cuidado de não tocar no disco redondo.
- Para prevenir contaminação do Disco Reativo de TNase, segurar com uma das mãos o disco redondo usando uma pinça estéril e retirar a moldura com a outra mão. Descartar a moldura. Levantar o filme superior da placa e colocar um Disco Reativo de TNase na parte rebaixada da placa.



Nota: o desempenho da placa Petrifilm RSA não é afetado pela separação do gel quando se levanta o filme superior. A reação da nuclease termoestável é claramente visível porque o Disco Reativo de TNase é ativo em ambos os lados.

- Abaixar o filme superior.
- Para garantir contato uniforme do Disco Reativo de TNase com o gel e para eliminar bolhas de ar, pressione levemente a área correspondente ao disco reativo. Isso pode ser feito aplicando-se um bastão de vidro em "I". Esse procedimento permitirá o contato completo entre o Disco Reativo de TNase, e o gel eliminará as bolhas pelas bordas do disco.
- Colocar as placas contendo o Disco Reativo de TNase em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ou $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por no mínimo 60 minutos e no máximo 3 horas. Nota: como as bactérias têm comportamentos variáveis, a reação de termonuclease pode ser visível em apenas 30 minutos. A observação

periódica das placas poderá permitir a obtenção de resultados antes de 3 horas.

10. Uma vez retiradas as placas da estufa, a leitura dos resultados deverá ser feita em até 1 hora.