

VANESSA AGLAÊ MARTINS TEODORO

**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 apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

T314e
2012

Teodoro, Vanessa Aglaê Martins, 1978-

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 / Vanessa Aglaê Martins Teodoro. – Viçosa, MG, 2012.

xiv, 122f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Mauro Mansur Furtado.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 102-122

1. Queijo-de-minas. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Nisina.
4. Queijarias - Canastra, Serra da (MG). 5. Microbiologia.
6. Bacteriocinas. 7. Queijo-de-minas - Controle de qualidade.
8. Derivados do leite - Processamento. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 637.3

VANESSA AGLAÊ MARTINS TEODORO

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 apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de alimentos, para obtenção do
título de Doctor *Scientiae*.

APROVADA: 28 de maio de 2012.

Renata Golin Bueno Costa

Maximiliano Soares Pinto

Antônio Fernandes de Carvalho
(Coorientador)

Luís Augusto Nero
(Coorientador)

Mauro Mansur Furtado
(Orientador)

À minha família, que me completa, me alegra, me orgulha, me acolhe, me aconchega, me irrita! Tão iguais e ao mesmo tempo tão diferentes, meus amores, sem os quais eu não seria ninguém. Aos meus pais, base da minha educação e formação da minha personalidade, pelo apoio, pelo amor incondicional e irrestrito. À pequena Júlia, por me fazer compreender esse amor, por me proporcionar momentos de profundo encantamento e felicidade e me dar forças pra vencer o cansaço que ela mesma causou! Ao Handley por estar sempre ao meu lado, me apoiando, me ajudando, me incentivando, pelo amor, por se encaixar tão (im)perfeitamente em minha vida. Aos meus amigos, família que escolhi pra minha vida, que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, em cada fase da minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo Professor Maximiliano Soares Pinto, idealizador do projeto original, por viabilizar a realização do experimento, pela disponibilidade, pela ajuda incondicional, pelos conselhos e dicas e, principalmente, pela amizade.

À amiga Professora Denise Sobral, pela parceria em todas as etapas do doutorado, pela amizade, por ajudar nas análises, nas viagens, por dividir comigo o peso da responsabilidade, as angústias e dificuldades.

Aos amigos Professores Gisela de Magalhães Machado, Junio Cesar Jacinto de Paula, Renata Golin Bueno Costa e Elisângela Michele Miguel por toda ajuda dispensada, seja nas análises, nas viagens, na elaboração da tese ou simplesmente por estarem ao meu lado.

Ao Professor Mauro Mansur Furtado pela oportunidade, confiança, disponibilidade e atenção a mim dispensadas durante o curso de doutorado.

Aos Professores Antônio Fernandes de Carvalho e Luís Augusto Nero pela disponibilidade, pelas dicas e por viabilizarem parte do experimento.

À professora Ana Clarissa dos Santos Pires, pela participação na banca de qualificação, bem como os já citados Professores Maximiliano, Renata e Antônio.

Às bolsistas Sheila Aparecida Teixeira, Aryane Fernandes Gomes da Costa e Suellen Serafim Telles pela imensa e indispensável contribuição durante todo o experimento.

À Alcy, Irani, Augusto e Rita pelo apoio nas análises laboratoriais.

À Gabriela Nogueira Viçosa pela imensa boa vontade e fundamental ajuda nas análises de PCR.

À Hiasmyne Silva Medeiros pela ajuda nas análises de textura.

À Professora Maria Cristina Dantas Vanetti por viabilizar as análises de enterotoxinas.

Ao Paulo Oliveira pelas análises estatísticas dos dados e auxílio na interpretação dos mesmos.

Ao Zé Lourenço, pela agradável companhia nas viagens à Canastra.

A todos os amigos e colegas de trabalho da EPAMIG que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto.

A todas as pessoas e instituições que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

À Emater de Medeiros - MG, especialmente ao Alberto Schwaiger Paciulli, pela disponibilidade, por intermediar o contato com os produtores.

Aos produtores de Queijos Minas artesanais Canastra que participaram deste projeto, pela hospitalidade, por abrirem as portas de suas queijarias para realização do experimento.

Ao Professor Jonas Guimarães e Silva, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Minas Gerais – Bambuí, MG, por viabilizar a realização das análises microbiológicas na região da Serra da Canastra.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

À EPAMIG e ao ILCT, pela oportunidade concedida.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa PCRH.

A todos, minha eterna gratidão.

BIOGRAFIA

Vanessa Aglaê Martins Teodoro, filha de José das Graças Teodoro e Maria das Graças Martins Teodoro, nasceu em João Monlevade, Minas Gerais, no dia 26 de março de 1978.

Em março de 1997, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em maio de 2002.

Em abril de 2002, iniciou o Programa de Pós-graduação, em nível de mestrado, em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em 18 de fevereiro de 2004.

Trabalhou na Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal de Curitiba – PR de julho de 2004 a julho de 2005.

Em julho de 2005, ingressou na EPAMIG como professora e pesquisadora do Instituto de Laticínios “Candido Tostes”, atuando nas áreas de legislação, segurança de alimentos e microbiologia.

Em março de 2009, iniciou o Programa de Pós-graduação, em nível de doutorado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa – MG, concluindo o curso em 28 de maio de 2012.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Queijo Minas Artesanal	4
2.2. Queijo Minas Artesanal Canastra.....	9
2.3. Segurança de alimentos aplicada aos queijos Minas artesanais	14
2.4. <i>Staphylococcus</i> enterotoxigênicos	17
2.4.1. Produção de enterotoxinas e intoxicação alimentar	17
2.4.2. Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> enterotoxigênico e de suas toxinas ...	22
2.4.3. <i>Staphylococcus</i> enterotoxigênico em leite e derivados.....	24
2.5. Aplicação de nisina em alimentos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Área de estudo.....	37
3.2. Etapas do estudo	37
3.2.1. Etapa 1: Avaliação preliminar de queijos Minas artesanais Canastra, isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> e identificação de genes que codificam para produção de enterotoxinas clássicas.....	38
3.2.1.1. Seleção das propriedades.....	38
3.2.1.2. Coletas de amostras	38
3.2.1.3. Análises microbiológicas dos queijos.....	38
3.2.1.4. Obtenção dos isolados de <i>Staphylococcus</i> sp.	39
3.2.1.5. Análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	39
3.2.1.6. Análises físico-químicas dos queijos.....	41
3.2.2. Etapa 2: Efeito antagônico in vitro da adição de nisina sobre a multiplicação de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
3.2.3. Etapa 3: Estudo <i>in loco</i> da adição de nisina ao processo de fabricação do queijo Minas artesanal Canastra	43

3.2.3.1. Adição de nisina ao processo de fabricação dos queijos Minas artesanal Canastra e coletas de amostras.....	43
3.2.3.2. Análises microbiológicas do leite, da massa e do queijo.....	44
3.2.3.3. Obtenção dos isolados de <i>Staphylococcus</i> sp.	45
3.2.3.4. Análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	45
3.2.3.5. Análise de enterotoxinas dos queijos	46
3.2.3.6. Análises físico-químicas dos queijos.....	46
3.2.3.7. Análise de perfil de textura (TPA) dos queijos	46
3.3. Delineamento estatístico	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Etapa 1: Avaliação preliminar de queijos Minas artesanais Canastra, isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> e identificação de genes que codificam para produção de enterotoxinas clássicas.....	48
4.1.1. Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i> dos queijos.....	48
4.1.2. Análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das culturas de <i>Staphylococcus aureus</i>	51
4.1.3. Características físico-químicas dos queijos	53
4.2. Etapa 2: Efeito antagônico <i>in vitro</i> da adição de nisina sobre a multiplicação de <i>Staphylococcus aureus</i>	55
4.3. Etapa 3: Estudo <i>in loco</i> da adição de nisina ao processo de fabricação do queijo Minas artesanal Canastra	58
4.3.1. Efeito do uso de nisina na composição físico-química de queijo Minas artesanal Canastra.....	58
4.3.1.1. Composição centesimal dos queijos	58
4.3.1.2. pH dos queijos.....	63
4.3.1.3. Atividade de água dos queijos	64
4.3.1.4. Índices de proteólise dos queijos	66
4.3.2. Efeito do uso de nisina nas características mecânicas (TPA) de queijo Minas artesanal Canastra	70
4.3.3. Efeito do uso de nisina nas características microbiológicas de queijo Minas artesanal Canastra	75
4.3.3.1. Contagens de Bactérias Láticas do leite, da massa e dos queijos	75

4.3.3.2. Contagem de Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos dos queijos	78
4.3.3.3. Contagens de <i>Enterobacteriaceae</i> , Coliformes e <i>E. coli</i> dos queijos	80
4.3.4. Efeito do uso de nisina nas contagens de <i>Staphylococcus aureus</i> do leite, da massa e do queijo Minas artesanal Canastra	87
4.3.5. Análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das culturas de <i>Staphylococcus aureus</i>	92
4.3.6. Pesquisa de enterotoxinas em queijo Minas artesanal Canastra	96
4. CONCLUSÃO.....	98
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
a_w	- Atividade de água
BAL	- Bactérias ácido lácticas
BHI	- Ágar Infusão de Cérebro e Coração
CO ₂	- Dióxido de carbono
CV	- Coeficiente de variação
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DP	- Desvio-padrão
g	- Grama
GES	- Gordura no extrato seco total
GRAS	- Geralmente Reconhecido como Seguro
ELFA	- <i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>
EDTA	- Ácido Etileno Diaminico Tetracético
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EMATER	- Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais
EPAMIG	- Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
FAO	- <i>Food and Agriculture Organization</i>
<i>femA</i>	- Gene codificador do fator <i>femA</i>
FRI	- <i>Food Research Institute</i>
IEPHA	- Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e artístico de Minas Gerais
IMA	- Instituto Mineiro de Agropecuária
INPI	- Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPHAN	- Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
ILCT	- Instituto de Laticínios Cândido Tostes
kDa	- Kilodalton
LDR	- Leite desnatado reconstituído
LI	- Limite inferior
LS	- Limite superior

m/m	- Massa/massa
m/v	- Massa/volume
mL	- Mililitro
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRS	- <i>deMan Rogosa & Sharpe</i>
N	- Newton
ND	- Não disponível
NS _{pH 4,6}	- Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (m/m)
NS _{TCA 12 %}	- Nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético a 12% (m/m)
NT	- Nitrogênio total
NSLAB	- <i>Non-Starter Lactic Acid Bacteria</i> ou Bacterias lácticas não originadas do fermento
pb	- Pares de base
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
pH	- Potencial hidrogeniônico
R ²	- Coeficiente de correlação
RMF	- Resíduo Mineral Fixo
SEA, SEB, SEC, SED, SEE	- Enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D e E
<i>sea, seb, sec, sed, see</i>	- Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D e E
SIF	- Serviço de Inspeção Federal
SISBI - POA	- Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
SUASA	- Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária
TCA	- Ácido tricloroacético
TPA	- Análise do perfil de textura
UI	- Unidades Internacionais
UFC	- Unidade formadora de colônia
UFV	- Universidade Federal de Viçosa
°C	- Graus Celsius
% de NS _{pH4,6} /NT	- Extensão de proteólise de maturação
% de NS _{TCA12%} /NT	- Profundidade de proteólise de maturação

RESUMO

TEODORO, Vanessa Aglaê Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2012. **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.** Orientador: Mauro Mansur Furtado. Coorientadores: Antônio Fernandes de Carvalho e Luís Augusto Nero.

A aplicação de nisina em alimentos tem sido amplamente pesquisada nos últimos anos, inclusive em produtos lácteos. Os queijos Minas artesanais possuem importância cultural, econômica, social e histórica. Apesar dos avanços alcançados em termos legais e de produção, ainda há muitos entraves que resultam em produtos sem padronização, de baixa qualidade e que podem oferecer risco à população. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito antagônico da adição de 0, 100 e 500 UI.mL⁻¹ de nisina ao processo de fabricação de queijo Minas artesanal Canastra sobre *S. aureus*, durante 60 dias de maturação. Também foram avaliados os aspectos microbiológicos quanto às contagens de bactérias lácticas, mesófilos aeróbios estritos e facultativos, enterobactérias, coliformes e *E. coli*, além da produção de enterotoxinas estafilocócicas nos queijos e a presença de genes que codificam para sua produção em isolados de *S. aureus*; características mecânicas de firmeza, fraturabilidade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade adesividade e coesividade; e propriedades físico-químicas quanto à umidade, gordura, proteínas, cloretos, resíduo mineral fixo, pH, atividade de água e índices de proteólise (NS_{pH4,6}/NT e NS_{TCA12%}/NT) de maturação. A nisina foi eficaz na redução da população de *S. aureus* entre sua inoculação no leite até o momento da obtenção da massa quando se utilizou a concentração de 100 UI.mL⁻¹ e até o sétimo dia de maturação dos queijos, na dose de 500 UI.mL⁻¹. Os queijos tratados com nisina atingiram menores contagens máximas de *S. aureus*. Não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre os queijos tratados com nisina e o controle quanto às contagens de bactérias lácticas, índices de maturação e parâmetros de perfil de textura, exceto com relação à coesividade que foi maior ($P < 0,05$)

nos queijos tratados com 500 UI.mL⁻¹. Também não houve diferença ($P \geq 0,05$) nos teores de umidade, gordura, proteína, cloretos, resíduo mineral fixo e na atividade de água entre os tratamentos adicionados de nisina e o queijo-controle. O pH dos queijos tratados com 500 UI.mL⁻¹ apresentou-se maior que nos demais tratamentos ($P < 0,05$). Para as contagens de mesófilos aeróbios não houve diferença entre os tratamentos ($P \geq 0,05$), no entanto, enterobactérias, coliformes 30 °C e *E. coli* apresentaram maiores contagens nos queijos tratados com nisina ($P < 0,05$). Os isolados de *S. aureus* dos queijos Minas artesanais Canastra apresentaram genes que codificavam para enterotoxinas A, B, C e E. Não foram encontrados genes para enterotoxina D. A análise de amostras de queijos indicou ausência de enterotoxinas estafilocócicas.

ABSTRACT

TEODORO, Vanessa Aglaê Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2012. **Effect of nisin on the multiplication of *Staphylococcus aureus* and the physico-chemical, rheological and microbiological characteristics of traditional Minas Canastra cheese - MG.** Advisor: Mauro Mansur Furtado. Co-Advisors: Antônio Fernandes de Carvalho and Luís Augusto Nero.

The use of nisin in foods has been extensively investigated in recent years, including dairy products. The traditional Minas cheeses are important cultural, economic, social and historical, however, despite advances in legislation and production, there are products not standardized, low quality and no safety for the population. This work aimed to evaluate the antagonistic effect of adding 0, 100 and 500 IU.mL⁻¹ nisin added to Traditional Minas Canastra cheese production against *S. aureus* during 60 days of ripening. We also evaluated the lactic acid bacteria, aerobic mesophilic, *Enterobacteriaceae*, total coliforms and *E. coli* counts, determination of the staphylococcal enterotoxins in cheese and sea, seb, sec, sed and see enterotoxins genes in *S. aureus* isolates; as well its influence on fracturability, elasticity, gumminess, chewiness, adhesiveness and cohesiveness and physicochemical properties (moisture, fat content, protein, salt, ash, pH, a_w, ripening indices). The nisin was effective in the reducing *S. aureus* population between inoculation up to the obtaining of the curd in treatment with 500 IU.mL⁻¹ and until the seventh day of ripening in cheese treated with 500 IU.mL⁻¹. The cheeses treated with nisin showed lower levels of *S. aureus*. It was not observed difference ($P \geq 0,05$) between nisin treatments and the control samples in lactic acid bacteria counts, ripening index and texture profile, except for cohesiveness that was higher ($P < 0,05$) in cheeses treated with 500 IU.mL⁻¹. It was not observed difference ($P \geq 0,05$) in moisture, fat, protein, salt, ash and a_w between nisin treatments and the control samples. The cheese treated with 500 IU.mL⁻¹ of nisin showed higher pH levels ($P < 0,05$) in comparison with those treated with 100 IU.mL⁻¹ of nisin and the control samples. It was not observed difference

($P \geq 0,05$) in mesophilic aerobic count, however *Enterobacteriaceae*, total coliforms and *E. coli* counts showed higher levels in cheeses treated with nisin ($P < 0,05$). All *S. aureus* isolates from Traditional Minas Canastra cheese were positive for sea, seb, sec and see enterotoxin genes and negative for sed gene. Staphylococcal enterotoxins were not found in Traditional Minas cheese Canastra samples.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem sido crescente a procura por alimentos que mantenham suas características mais próximas do natural, pouco processados, com o mínimo de aditivos ou que não tenham sido submetidos a tratamentos que reduzam seu valor nutricional. O interesse dos consumidores por esse tipo de produto tem incentivado indústrias e pesquisadores a buscarem tecnologias de processamento que atendam a esta demanda.

Além das tecnologias tradicionalmente empregadas para conservação dos alimentos, outras têm sido desenvolvidas como os tratamentos sob alta pressão hidrostática, pulsos elétricos, embalagens ativas e antimicrobianos naturais. Nos últimos 25 anos, foram realizadas muitas pesquisas sobre bacteriocinas com o objetivo principal de melhorar a qualidade microbiológica e a segurança de alimentos.

A nisina, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, é a mais estudada e a única bacteriocina que possui autorização para uso em alimentos. Embora alguns autores apontem limitações em sua utilização, relacionadas ao seu espectro de ação contra Gram negativos, fungos filamentosos e leveduras, vários trabalhos têm testado sua atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos nesses estudos sugerem que a nisina possui potencial para utilização em alimentos, principalmente, quando associada a outros processos de conservação. Apesar disso, ainda há muito a ser pesquisado acerca da eficácia do uso de bacteriocinas em leite e derivados, em especial em queijos artesanais.

Minas Gerais é o maior produtor de queijos artesanais no Brasil. Os queijos Minas artesanais são reconhecidos pela sua importância cultural, histórica, social e econômica. Muito tem sido feito nos últimos anos para melhorar a sua qualidade como treinamento dos produtores, melhorias na estrutura física das queijarias, regulamentação da produção e pesquisas com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre o assunto. Entretanto, ainda há vários entraves na produção do queijo Minas artesanal, gerando produtos sem padronização e de baixa qualidade. Há inúmeros relatos que

comprovam que os queijos artesanais são passíveis de conter uma ampla variedade de micro-organismos que podem interferir em sua vida de prateleira, nas características sensoriais e, principalmente, causar danos aos consumidores.

Staphylococcus aureus é o principal patógeno relacionado como causa de mastite e à manipulação inadequada, encontrado em altas contagens em queijos Minas artesanais. Esse micro-organismo tem sido descrito como problema também em outros países, mesmo quando há aplicação de boas práticas de fabricação, fazendo com que fossem exigidas análises de enterotoxinas quando suas contagens excedessem a 10^5 UFC.g⁻¹. Apesar de algumas pesquisas relatarem ausência de enterotoxinas em queijos Minas artesanais, não é possível garantir a inocuidade desses queijos e que essas toxinas permanecerão ausentes até o consumo, não acarretando em risco de intoxicação alimentar.

O objetivo geral do trabalho foi investigar o efeito da adição de diferentes níveis de nisina ao leite cru utilizado na fabricação do queijo Minas Artesanal Canastra. Buscou-se testar a aplicabilidade desse antimicrobiano sem, contudo, modificar a tecnologia de processamento do queijo Minas artesanal Canastra.

Os objetivos específicos foram:

- Testar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de nisina adicionada ao leite inoculado com *S. aureus* isolados da região da Serra da Canastra;
- Investigar o efeito de diferentes concentrações de nisina sobre o comportamento de *S. aureus* na massa e nos queijos Minas artesanais Canastra ao longo da maturação;
- Caracterizar os isolados de *S. aureus* dos queijos Minas artesanais da Serra da Canastra quanto à presença de genes que codificam para a produção de enterotoxinas clássicas (*sea - see*);
- Averiguar a produção de enterotoxinas clássicas (SEA - SEE) nos queijos Minas artesanais da Serra da Canastra;

- Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nisina sobre o desenvolvimento das bactérias lácticas na massa e nos queijos Minas artesanais Canastra ao longo de 60 dias de maturação;
- Investigar a microbiota contaminante do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra e os possíveis efeitos da nisina sobre a multiplicação desses micro-organismos, por meio de contagens de mesófilos aeróbios estritos e facultativos, enterobactérias, coliformes e *E. coli*;
- Averiguar a possível influência de diferentes concentrações de nisina sobre as características físico-químicas do queijo Minas artesanal Canastra durante o período de maturação;
- Investigar o perfil de textura a fim de verificar a influência da nisina sobre as características mecânicas dos queijos Minas artesanais da Serra da Canastra ao longo de 60 dias de maturação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

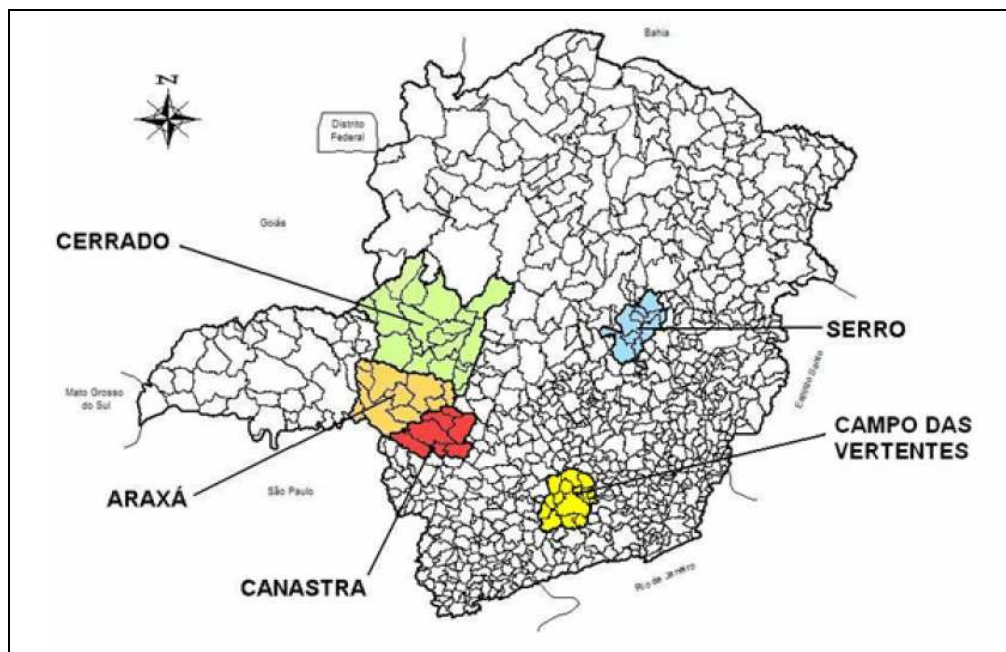
2.1. Queijo Minas Artesanal

O queijo Minas Artesanal é, provavelmente, o mais antigo e tradicional queijo brasileiro. Minas Gerais se destaca como maior e mais importante produtor de queijos artesanais do Brasil. São 9.445 produtores pertencentes às cinco regiões oficialmente reconhecidas: Serra da Canastra, Serro, Cerrado, Araxá e Campo das Vertentes, que produzem anualmente 29.005 mil toneladas de queijo, gerando 26.792 empregos diretos (EMATER, 2012).

O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) é responsável pelo cadastro das unidades produtoras no Programa Queijo Minas Artesanal e, até o ano de 2010, existiam 155 queijarias cadastradas, sendo 79 na região do Serro, 35 no Cerrado, 23 na Canastra, 17 em Araxá e 01 no Campo das Vertentes (IMA, 2010).

Os queijos Minas artesanais possuem importância econômica e social, fundamental para uma grande parcela da população mineira, pois em determinadas regiões, sua produção e comercialização constituem-se na única fonte de renda para muitas famílias, configurando a base da economia de vários municípios (SILVA, 2007).

A Figura 1 mostra as Regiões produtoras de queijo Minas artesanal no Estado de Minas Gerais.



Fonte: EMATER (2012).

Figura 1 - Regiões produtoras de queijos Minas artesanais.

A fabricação e a venda informal de queijos artesanais no mercado mineiro e, ainda que ilegal, em outros Estados despertaram o interesse na legalização do queijo Minas artesanal no final da década de 1990 (PINTO, 2008). O Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais (IEPHA), registrou o modo de fazer do queijo artesanal do Serro como “Patrimônio Imaterial de Minas Gerais”, por meio do decreto nº 42.505 de 15 de abril de 2002 (MINAS GERAIS, 2002a). Em 2008, o Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) reconheceu o modo de fazer do queijo Minas artesanal nas regiões do Serro, Cerrado e da serra da Canastra como patrimônio imaterial.

A lei nº 14.185 de 2002 (MINAS GERAIS, 2002b) define queijo Minas artesanal, como aquele elaborado conforme tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido, a partir de leite integral, fresco e cru. Devem, ainda, ser fabricados exclusivamente com leite obtido na própria fazenda e apresentar consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas.

O decreto nº 42.645 de 2002 (MINAS GERAIS, 2002c), que aprova o regulamento da Lei nº 14.185/2002, estabelece os padrões físico-químicos e microbiológicos para os queijos Minas artesanais. Tais parâmetros, inicialmente idênticos aos da legislação federal para queijos de alta umidade, foram modificados em 2008 pelo Decreto nº 44.864 (MINAS GERAIS, 2008), encontrando-se, atualmente, idênticos aos estabelecidos para queijos de média umidade.

As classificações quanto ao teor de umidade e gordura no extrato seco (GES) de queijos, segundo legislação federal, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação dos queijos quanto ao teor de GES e umidade.

Umidade (%)		GES (%)	
Baixa umidade	< 35,9	Extragordo	> 60
Média umidade	36,0 e 45,9	Gordo	45,0 e 59,9
Alta umidade	46,0 e 54,9	Semigordo	25,0 e 44,9
Muito alta umidade	> 55,0	Magro	10 e 24,9
		Desnatado	< 10

Fonte: BRASIL (1996).

A Tabela 2 apresenta os padrões microbiológicos exigidos pelas legislações estadual e federal para queijos artesanais e industriais, respectivamente.

Tabela 2 – Parâmetros microbiológicos das legislações estadual e federal para queijos artesanais e industriais, respectivamente.

Parâmetros	Decreto Estadual	Legislação Federal (Queijos)	
	Decreto nº 42.645	Alta Umidade	Média Umidade
Coliformes 30° C	n = 5 c = 2 m = 1.000 M = 5.000	n = 5 c = 2 m = 5.000 M = 10.000	n = 5 c = 2 m = 1.000 M = 5.000
Coliformes 45° C	n = 5 c = 2 m = 100 M = 500	n = 5 c = 2 m = 1.000 M = 5.000	n = 5 c = 2 m = 100 M = 500
<i>Staphylococcus</i> Coagulase +	n = 5 c = 2 m = 100 M = 1.000	n = 5 c = 2 m = 100 M = 1.000	n = 5 c = 2 m = 100 M = 1.000
<i>Listeria</i> sp	n = 5 c = 0 m = 0	n = 5 c = 0 m = 0	n = 5 c = 0 m = 0
<i>Salmonella</i> sp	n = 5 c = 0 m = 0	n = 5 c = 0 m = 0	n = 5 c = 0 m = 0

Fonte: BRASIL (1996); MINAS GERAIS (2002c); MINAS GERAIS (2008).

Muitos estudos têm sido realizados demonstrando grande diversidade nas características microbiológicas e físico-químicas dos queijos Minas artesanais. Alguns dados sobre as características físico-químicas desses queijos estão indicados na Tabela 3.

Tabela 3 – Características físico-químicas de queijos Minas artesanais.

Região Produtora	pH	Umidade (% m/m)	Cloretos (% m/m)	Gordura (% m/m)	Proteína (% m/m)	Referência
Serro/Canastra	5,60	48,0	3,05	25,00	28,00	VARGAS et al. (1998)
Serro	4,98	50,8	4,4	29,22	18,75	MACHADO (2002)
Araxá	4,85	45,05	2,06	28,30	24,40	ARAÚJO et al. (2004)
Serro	4,75	48,22	1,62	28,21	22,40	PINTO (2004)
Serro	4,8-5,0	40,0	1,6	29,0-32,0	21,5-24,2	MARTINS (2006)
Canastra	5,0	45,0	1,43-1,5	26,8-30,2	24,70	DORES (2007)
Serro	4,9-5,1	43,3-48,7	1,14-1,5	28,7-33,2	22,6-24,9	PINTO (2008)
Canastra	4,94	43,41	0,99	27,53	22,61	PAIVA (2012)

Os queijos Minas artesanais, de acordo com os dados indicados em diversos trabalhos, têm sido classificados como de alta e média umidade, embora por lei, devam apresentar até 45,9 % (m/m) de umidade, ou seja, média umidade (MINAS GERAIS, 2008). Além disso, as pesquisas têm

demonstrado que, em geral, os queijos artesanais não se enquadram na legislação em relação aos parâmetros microbiológicos, inclusive pela presença de *Salmonella* e *Listeria* spp. (Tabela 4).

Tabela 4 – Características microbiológicas de queijos Minas artesanais.

Região Produtora	<i>Staph. coag+</i> (log UFC.g ⁻¹)	<i>E. coli</i> (log UFC.g ⁻¹)	Coliformes (log UFC.g ⁻¹)	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i> spp	Referência
Araxá	<1,0 – 7,97	<1,0 – 6,2	<1,0 – 6,50	Presente	Ausente	ARAÚJO et al. (2004)
Serro	4,47 – 7,97	1,7 – 2,8	4,49 – 5,31	Ausente	Ausente	PINTO (2004)
Canastra	> 4,00	3,0 – 5,0	1,3 – 5,87	Ausente	Presente	ORNELAS (2005)
Canastra	5,91	> 3,69	> 3,69	ND	Ausente	BORELLI et al. (2006)
Serro	2,04-3,4	1,97-2,5	3,22-3,47	Presente	Ausente	MARTINS (2006)
Canastra	3,5-4,29	3,3	3,78	Ausente	Ausente	DORES (2007)
Serro	3,66-4,04	2,4-3,29	3,39-3,79	Ausente	Ausente	PINTO (2008)
Canastra	2,39-5,06	ND	1,0-1,97	Ausente	Ausente	PAIVA (2012)

ND = Não disponível

Staph. coag+ = *Staphylococcus coagulase* positiva

A produção de queijo com leite cru com tempo de maturação inferior a 60 dias requer controle de patógenos e outros micro-organismos indesejáveis nos animais, no leite durante a ordenha, na estocagem e transporte (ICMSF, 1996). Por este motivo, até pouco tempo, a comercialização desses queijos era proibida no Brasil (BRASIL, 1996), devido ao risco potencial que representam à saúde do consumidor, oriundos das condições precárias de processamento nas fazendas produtoras, além do clima desfavorável para o manuseio do leite cru sob temperatura ambiente. No entanto, no ano de 2011, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa nº 57 (BRASIL, 2011), permitiu a redução desse período de maturação para queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru, quando estudos técnico-científicos comprovarem que não haverá comprometimento da qualidade e inocuidade. Isso se aplica somente às queijarias situadas em regiões de indicação geográfica certificada ou tradicionalmente reconhecida e em propriedades certificadas oficialmente como livres de tuberculose e

brucelose. Além disso, as propriedades rurais onde estão localizadas as queijarias deverão implementar programas de controle de mastite e boas práticas de produção e fabricação, além de garantir a potabilidade da água de abastecimento.

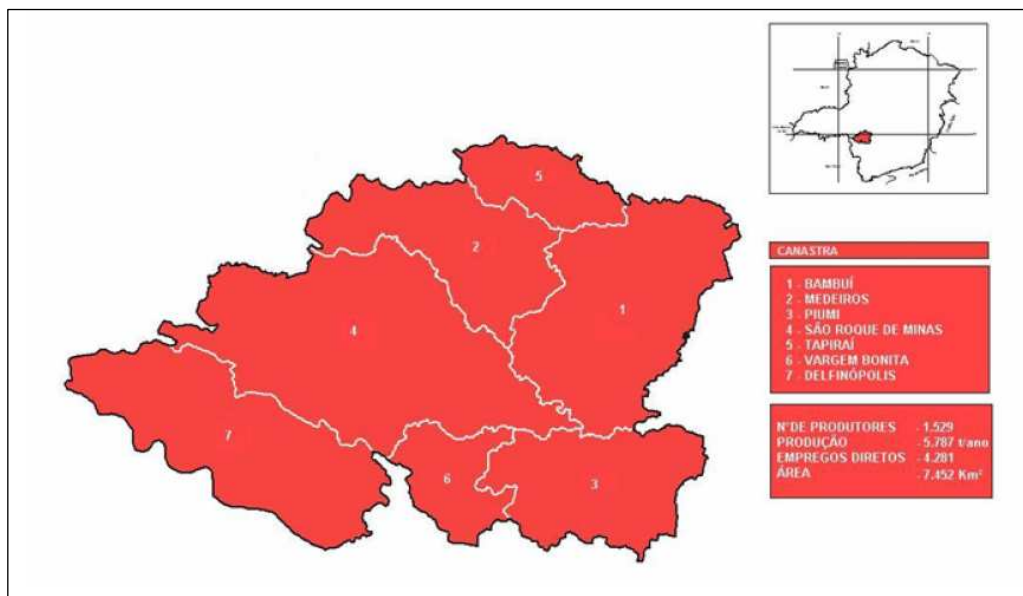
O queijo Minas artesanal, não raramente, é comercializado com maturação inferior a 60 dias. A alteração da legislação pelo MAPA constitui um avanço na medida em que permite que o produtor possa legalizar seu produto, desde que atenda à legislação. Outro fator importante será a oportunidade de comercialização desse queijo em outros Estados, seja pelo registro da queijaria no Serviço de Inspeção Federal (SIF) ou pela sua inclusão no Sistema Brasileiro de Inspeção de Produto de Origem Animal (SISBI-POA) do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA).

Apesar do reconhecimento da importância dos queijos Minas artesanais, das diversas pesquisas nesta área e dos inúmeros avanços obtidos nos últimos anos, ainda há muitos gargalos em sua produção e normatização. Conforme exposto, verifica-se comumente que apresentam variação na sua composição físico-química, além dos parâmetros microbiológicos, comprovando, assim, a falta de padronização dos produtos disponíveis para o consumidor.

2.2. Queijo Minas Artesanal Canastra

A Serra da Canastra abrange uma área de 6.453 km² (EMATER, 2003) e localiza-se no sudoeste de Minas Gerais, em uma posição privilegiada, próxima a grandes centros consumidores (EMATER, 2004).

A Figura 2 mostra a Região produtora de queijo Minas artesanal Canastra.



Fonte: EMATER (2012).

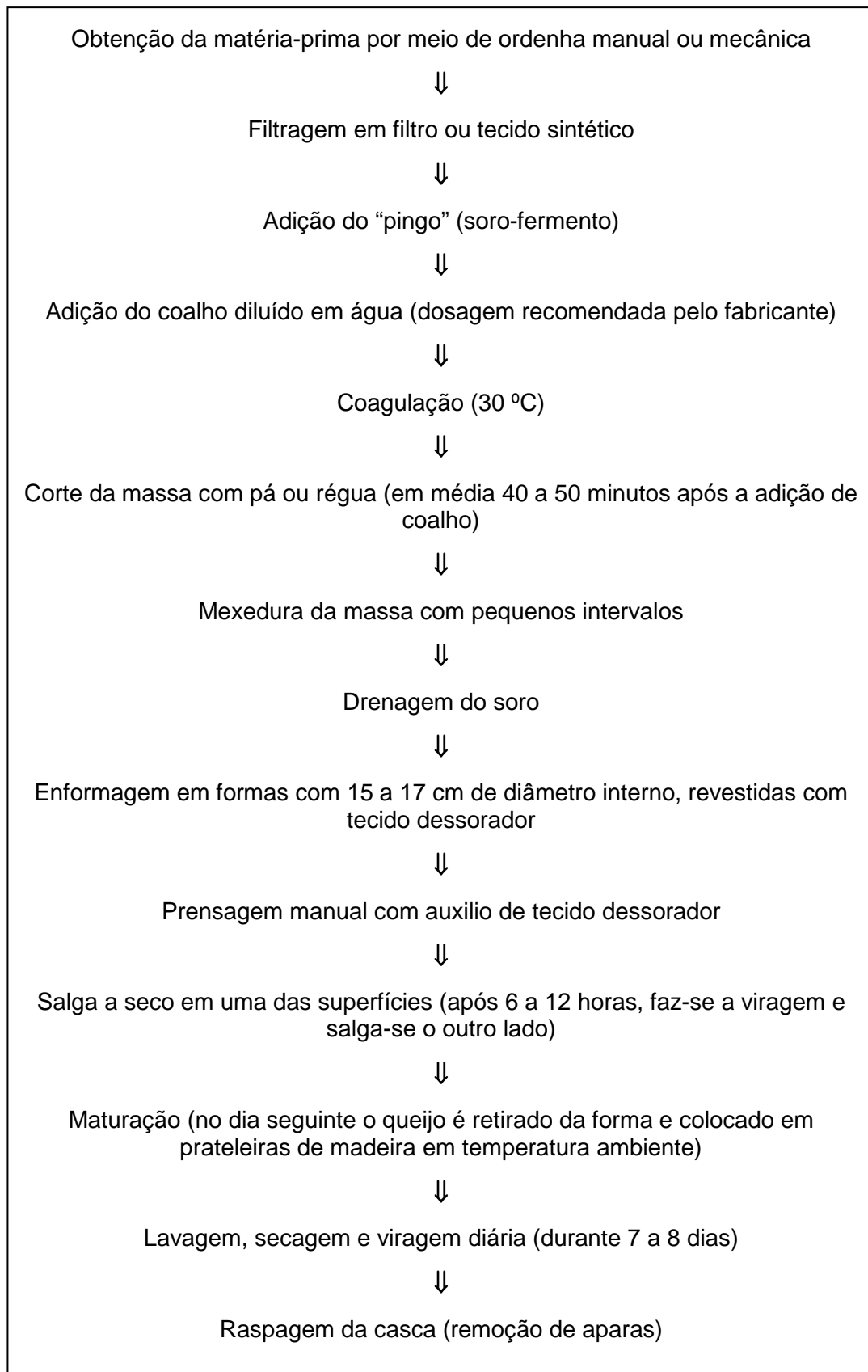
Figura 2 - Região produtora de queijo Minas artesanal Canastra.

A microrregião da Canastra, caracterizada como região produtora de queijo Minas artesanal, é composta pelos municípios de Bambuí, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí, Vargem Bonita e Delfinópolis. São 1.529 produtores que produzem 5.787 toneladas de queijos por ano, gerando 4.281 empregos diretos. O principal produtor é o município de São Roque de Minas, onde nasce o rio São Francisco (EMATER, 2004).

A fabricação e consumo do queijo na região da Canastra se confundem com a história do povoamento local, iniciado com a busca de minerais e pedras preciosas (EMATER, 2004). Sua produção é um fator cultural de significativa importância sócio-econômica para grande parte das famílias rurais (EMATER, 2003).

As características físicas como o relevo e a altitude, bem como os fatores edafoclimáticos são favoráveis à produção de queijo, possivelmente devido a um ambiente propício para o desenvolvimento de bactérias endógenas, responsáveis pelo sabor característico. Essa microbiota encontra-se presente no pinga, um soro salgado e fermentado, coletado no final da etapa de salga, adicionado ao leite durante a fabricação do queijo (EMATER, 2004).

Assim como nas demais regiões, não há padronização da produção dos queijos, sendo aceitáveis variações no processo de fabricação dentro da região da Canastra. A Figura 3 apresenta o fluxograma geral das etapas de fabricação do queijo Minas artesanal Canastra. Também existem particularidades relacionadas a cada região produtora, por exemplo, na Serra da Canastra, a utilização de um tecido, durante a prensagem manual da massa, faz com que apresente menor teor de umidade, diferenciando-o do queijo produzido na região do Serro (EMATER, 2003).



Fonte: Adaptado de EMATER (2004).

Figura 3 – Etapas de fabricação do Queijo Minas Artesanal Canastra.

As principais características do Queijo Minas Artesanal Canastra estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Características de Queijo Minas Artesanal Canastra.

Fonte: EMATER (2004).

A Região da Serra da Canastra é a mais conhecida entre as produtoras de queijos Minas artesanais (EMATER, 2004). Em 2011, o queijo Minas artesanal Canastra recebeu do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), o Certificado de Indicação Geográfica, atestando que possui identidade própria, característica da Serra da Canastra.

A elaboração de legislação específica para o segmento contribuiu para que os problemas de segurança associados ao queijo artesanal fossem amplamente discutidos pela sociedade (PAIVA, 2012). Apesar disso, ainda há muitos entraves na produção do queijo Minas artesanal, gerando produtos sem padronização e de baixa qualidade.

2.3. Segurança de alimentos aplicada aos queijos Minas artesanais

Leite e derivados são alimentos ricos nutricionalmente e, em particular os queijos artesanais, representam um sério problema de saúde pública em muitos países, pois constituem veículo em potencial de diversos patógenos. Dependendo do grau de proteólise, pH, atividade de água (a_w), teor de sal, umidade, potencial de oxi-redução e temperatura de maturação (BERESFORD et al., 2001) podem apresentar condições favoráveis para a multiplicação de micro-organismos patogênicos e deterioradores. Essas condições podem se agravar quando os mesmos são processados com leite cru, sem o emprego de tecnologia adequada e das boas práticas podendo ocasionar surtos de infecção ou intoxicação (PINTO, 2004).

Um alimento é considerado seguro quando não oferece risco devido à presença de perigos, definidos como uma contaminação inaceitável de natureza biológica, química ou física, que possam causar dano à saúde ou à integridade do consumidor (ROBBS e CAMPELO, 2002). A segurança é proporcionada quando há controle de todas as atividades relacionadas à produção, em todas as etapas de processamento, incluindo a obtenção da matéria-prima, estocagem, transporte e comercialização do produto acabado.

O controle da contaminação por patógenos é extremamente importante, pois são responsáveis por surtos de doenças de origem alimentar em vários países, alguns com altas taxas de mortalidade (DE BUYSER et al., 2001). A legislação brasileira estabelece padrão para alguns desses micro-organismos patogênicos para diferentes tipos de queijos, porém, estes apresentam características e condições variadas, o que torna necessária a adoção de medidas de segurança ainda mais rigorosas para o controle desses produtos (PINTO, 2004).

O período mínimo de 60 dias de maturação para queijo fabricado com leite cru ou submetido a tratamento térmico inferior ao da pasteurização tem se mostrado ineficaz, uma vez que há evidências da sobrevivência de *Listeria innocua* (PINTO et al., 2009), *Brucella abortus* e *Salmonella* Tiphys em queijos maturados nessas condições (JOHNSON et al., 1990a,b). Há que se considerar ainda, que a maturação desses queijos em baixas

temperaturas pode favorecer o desenvolvimento de patógenos, devido à redução de bactérias lácticas mesofílicas (CARIDI et al., 2003).

JOHNSON et al. (1990a) consideraram *Salmonella*, *Listeria* e *Escherichia coli* como patógenos de alto risco, por serem capazes de sobreviver e multiplicar em determinados tipos de queijos. Os queijos Minas artesanais, por serem elaborados com leite cru, são susceptíveis à multiplicação desses patógenos (DE BUYSER et al., 2001; PINTO, 2008). Desta forma, é necessário o controle da qualidade do leite, da salga, das condições de maturação, da utilização de culturas lácticas, além da qualificação dos colaboradores e do emprego das boas práticas de fabricação.

A análise de alimentos, ingredientes e matérias-primas para a presença de micro-organismos indicadores de contaminação, tais como coliformes ou enterobactérias tem como objetivo atestar a higiene sanitária e tecnológica (TORNADIJO et al., 2001). Sua presença demonstra falha durante ou após o processo de fabricação (BLOOD e CURTIS, 1995).

A maioria das bactérias contaminantes, incluindo patógenos humanos pertence à família *Enterobacteriaceae* (TORNADIJO et al., 2001). Apesar disso, resultados positivos para enterobactérias por si só, não afirmam a presença de micro-organismos patogênicos, mas indica que existe risco em potencial para a saúde pública (ARENAS et al., 2004). As fontes comuns de contaminação de alimentos por esse grupo, que incluem os coliformes, são as fezes humanas ou de animais, manipuladores, água, utensílios e equipamentos (YILMA et al., 2007), inclusive devido à formação de biofilmes.

A família *Enterobacteriaceae* é composta por bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos (BRENNER, 1984). São amplamente distribuídas no solo, água, vegetação e no trato intestinal de animais. Os principais gêneros que compõem essa família são *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* e *Yersinia* (BLOOD e CURTIS, 1995). Alguns são comumente encontrados em leite e queijo (TORNADIJO et al., 2001) e podem afetar a proteólise durante a maturação (MORALES et al., 2003), sendo responsáveis por defeitos de textura e sabor (TAMAGNINI et al., 2008).

Enterobactérias em leite e em queijo indicam práticas inadequadas de higiene na ordenha, de tempo e temperatura de refrigeração do leite, de transporte e de fabricação (TORNADIJO et al., 2001). Altas contagens de *E. coli* e coliformes totais também indicam falta de higiene, constituindo-se assim, parâmetros de qualidade higiênica de alimentos (YUCEL e ULUSOY, 2006).

E. coli possui como habitat natural o intestino de seres humanos e animais de sangue quente. Assim, sua presença em alimentos indica a possibilidade da presença de patógenos entéricos na área de processamento (BLOOD e CURTIS, 1995).

No Brasil, uma grande parte do leite ainda é produzida em condições sanitárias e de higiene inadequadas o que contribui para a baixa qualidade da matéria-prima e, conseqüentemente, dos queijos. Segundo Borges et al. (2008a) muitos surtos de doenças veiculadas por alimentos investigados em nosso país envolvendo produtos lácteos foram associados, principalmente, ao consumo de queijos do tipo Minas frescal, Minas padrão e de queijo de coalho.

O sistema de notificação no Brasil ainda é bastante incipiente e os registros não representam a realidade nacional. Isso ocorre porque a probabilidade de um surto ser reconhecido como tal e notificado pelas autoridades competentes depende, entre outros fatores, da comunicação dos consumidores, do relato dos médicos, das atividades de vigilância sanitária das secretarias municipais e estaduais de saúde. Além disso, segundo Meng e Doyle (1998), a epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos tem mudado rapidamente nas últimas décadas, devido, principalmente, às alterações nos hábitos de consumo da população e à presença de patógenos considerados, por muitos autores, como emergentes.

Staphylococcus spp. produtores de enterotoxinas estão entre os principais agentes de enfermidades veiculadas por alimentos, principalmente, os de origem animal, como leite e derivados (JAY et al., 2005). Apesar de outras espécies serem descritas como produtoras de toxinas, *S. aureus* é considerada a de maior importância por ser a mais frequentemente isolada em alimentos e em surtos de toxinfecções

alimentares (NORMANNO et al., 2007; PELES et al., 2007). Em muitos países, é considerado a segunda ou a terceira causa mais comum de surtos de intoxicação alimentar (VERAS et al., 2008).

2.4. *Staphylococcus* enterotoxigênicos

O gênero *Staphylococcus* inclui, aproximadamente, 40 espécies produtoras ou não de coagulase e termonuclease (KWOK e CHOW, 2003; JAY et al., 2005). A produção dessas enzimas está, geralmente, associada à capacidade do micro-organismo de produzir toxinas (KWOK e CHOW, 2003), muito embora algumas espécies que não as produzam também sejam descritas como enterotoxigênicas (PEREIRA et al., 1996; JAY et al., 2005; STAMFORD et al., 2006; BORELLI et al., 2006). Determinadas estirpes coagulase negativas como *S. gallinarum*, *S. simulans*, *S. equirum*, *S. lentus*, *S. capitis*, *S. xylosus*, *S. cohnii* subsp *cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. warneri* e *S. chromogenes* (RODRIGUEZ et al., 1996; VERNOSY-ROZAND et al., 1996) também são capazes de produzir toxinas.

S. aureus são bactérias Gram positivas, cocos, imóveis, pertencentes à família *Micrococcaceae*. São anaeróbias facultativas, produtoras de catalase e não esporuladas que apresentam pH favorável entre 4,0 e 9,8, com ótimo entre 6,0 e 7,0. A temperatura ótima de multiplicação encontra-se entre 35 e 37 °C, com faixa que varia entre 7 e 48 °C, sendo que a produção de toxinas ocorre entre 10 e 46 °C, com ótimo entre 40 e 45 °C. São capazes de se desenvolver em valores de atividade de água entre 0,83 e 0,99 em condições aeróbias, com produção de toxinas a partir de 0,86, embora haja relatos de produção em 0,84 (CUNHA NETO et al., 2002; JAY et al., 2005).

2.4.1. Produção de enterotoxinas e intoxicação alimentar

Staphylococcus spp. têm sido extensivamente estudados pela produção de inúmeros fatores de virulência que aumentam sua patogenicidade, dentre os quais, as enterotoxinas estafilocócicas

(AKINEDEN et al., 2008; ERTAS et al., 2010), produzidas por algumas espécies presentes nos alimentos, responsáveis pelas intoxicações alimentares.

As enterotoxinas são caracterizadas como proteínas extracelulares, hidrossolúveis, de cadeia simples, com baixa massa molar (26 a 30 kDa), resistentes ao tratamento térmico e à inativação por enzimas proteolíticas do sistema digestório como a pepsina, permanecendo ativas após a ingestão ou processos de pasteurização e ultrapasteurização (BALABAN e RASOOLY, 2000; CREMONESI et al., 2007; PELISSER et al., 2009; ERTAS et al., 2010).

S. aureus pode apresentar múltiplas enterotoxinas (CUNHA e CUNHA, 2007) com massas molares, propriedades biológicas e físico-químicas semelhantes (LIMA, 2005). Atualmente, são conhecidas 20 variedades, classificadas com base em suas diferenças sorológicas, divididas em enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC_{1, 2, 3}, SED, SEE), novas (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ e SEU) (BALABAN e RASOOLY, 2000; JARRAUD et al., 2001; CARMO et al., 2002; OMOE et al., 2002; LETERTRE et al. 2003; OMOE et al., 2003; BLAIOTTA et al., 2004; OMOE et al., 2005, ARAGON-ALEGRO et al. 2007, PELISSER et al. 2009; ERTAS et al., 2010) e a toxina responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST-1) (FORSYTHE, 2002).

Há poucos relatos sobre a detecção das novas enterotoxinas em *S. aureus* isolados de alimentos (AKINEDEN et al., 2008; ROSEC e GIGAUD, 2002; BLAIOTTA et al., 2004) quando comparados aos numerosos casos sobre a ocorrência das enterotoxinas clássicas (DE LUCA et al. 1997; ROSEC et al., 1997; AKINEDEN et al., 2008; ROSEC e GIGAUD, 2002; CHAPAVAL, 2003), sendo comumente referidas como a causa de intoxicações estafilocócicas. Entretanto, aproximadamente 5% dos casos, em que toxinas clássicas não são detectadas, têm sido atribuídos à produção de novas enterotoxinas (CREMONESI et al. 2005; AYDIN et al. 2011).

A prevalência de enterotoxinas clássicas não é consenso entre os autores. A maioria cita SEA como mais frequente em alimentos e, conseqüentemente, mais associadas com intoxicação alimentar (BALABAN

e RASOOLY, 2000; ATANASSOVA et al., 2001; NÁJERA-SANCHEZ et al., 2003; ARAGON-ALEGRO et al., 2007; AKINEDEN et al., 2008; PELISSER et al., 2009). Há também relatos de que SED seja a mais frequente (PELISSER et al., 2009), além de SEC (AYDIN et al. 2011). Segundo Pinto et al. (2005a), 59% dos surtos de intoxicação são causados por SEA e SEE.

SEA e SEB são produzidas, predominantemente, por estirpes de origem humana (IKEDA et al., 2005; FREITAS et al., 2009), enquanto SEC são, em sua maioria, de origem animal (AKINEDEN et al., 2008). A produção de enterotoxinas ocorre durante todo o desenvolvimento bacteriano, mas, principalmente, durante a fase exponencial (BORGES et al. 2008a). SEA e SED são produzidas, preferencialmente, durante a fase logarítmica e SEB e SEC durante seu final e o início da fase estacionária de crescimento (OMOE et al. 2003; JAY et al. 2005).

Há muitos fatores que afetam a produção de enterotoxinas em alimentos, tais como a contagem de células, o pH, a a_w (JAY et al. 2005; OMOE et al. 2003), a concentração de sal, a temperatura e a presença de microbiota competitiva (BALABAN e RASOOLY, 2000; CREMONESI et al., 2007; PELISSER et al., 2009; ERTAS et al., 2010). SEA e SED podem ser produzidas em uma ampla faixa de condições de desenvolvimento como atividade de água, pH e potencial de oxi-redução (ICMSF, 1996).

Níveis de enterotoxinas estafilocócicas necessários para ocasionar a intoxicação podem ocorrer quando a população de *S. aureus* encontra-se em número maior que 10^5 micro-organismos por grama ou mililitro do alimento (FDA, 1992; FORSYTHE, 2002; BHATIA e ZAHOR, 2007; AKINEDEN et al. 2008; PELISSER et al., 2009; DELBES-PAUS et al., 2010; SANTANA et al., 2010; SILVA et al., 2010) e em pH maior que 5,0 (SILVA e GOMES, 2001). Entretanto, algumas estirpes em concentrações bem menores já foram descritas como capazes de produzir quantidades de toxinas suficientes para causar a doença (MEYRAND et al., 1998). Para controle efetivo em alimentos, inclusive queijos, no Brasil é adotada a tolerância máxima de 10^3 unidades formadoras de colônias por mililitro ou grama (UFC.mL⁻¹ ou UFC.g⁻¹) de Estafilococos coagulase positiva, considerando a alta correlação da produção dessa enzima com a produção de enterotoxinas (BRASIL, 2001).

Embora a legislação realize o controle baseado nas contagens de espécies coagulase positiva, muitos estudos relatam a produção de toxinas por estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativa (CRASS e BERGDOLL, 1986; DE LUCA et al., 1997; AARESTRUP et al., 1999). Pesquisas realizadas sob condições laboratoriais, sugerem que eles podem, de fato, ser potenciais causadores de intoxicação alimentar (RODRIGUEZ et al., 1996; VERNOZY-ROZAND et al., 1996), embora ainda haja pouca informação sobre seu real papel na doença (ARAGON-ALEGRO et al., 2007). Pereira (1999) descreveu um surto envolvendo crianças após ingerirem leite achocolatado contendo enterotoxinas produzidas por esses micro-organismos.

Na Europa, em 2006, foi estabelecida a obrigatoriedade de determinar a presença de enterotoxinas em queijos quando as contagens de *S. aureus* encontram-se acima de 10^5 UFC.g⁻¹. A contaminação bacteriana do leite tem sido reduzida significativamente em alguns países europeus por meio da identificação de fontes potenciais de *S. aureus*, controle da mastite e aplicação de práticas de higiene (ALOMAR et al., 2008). No entanto, é muito difícil evitar a presença de determinadas bactérias no leite e, mesmo com baixa contagem inicial, durante as primeiras horas após a fabricação do queijo poderá superar o permitido pela legislação (MEYRAND et al., 1998). Por este motivo, deve-se buscar inibir a contaminação e a multiplicação de *S. aureus* precocemente no processo de produção de queijos (ALOMAR et al., 2008).

S. aureus é a espécie predominantemente envolvida em surtos de intoxicação alimentar em todo mundo (BLAIOTTA et al. 2004; PELISSER et al., 2009; ERTAS et al., 2010), uma vez que esse micro-organismo é comumente encontrado em altas contagens nos alimentos (MORANDI et al., 2007; SANTANA et al., 2010), embora outros estafilococos coagulase positivos, como *S. intermedius* e *S. hyicus*, também sejam enterotoxigênicos (VERNOZY-ROZAND et al. 1996),.

Leite e derivados submetidos ao manuseio e a condições de armazenamento inadequados são frequentemente contaminados (VERAS et al., 2008). Produtos como queijos fabricados a partir de leite cru e leite em pó têm sido relacionados com intoxicação alimentar (NORMANNO et al.

2005; AKINEDEN et al., 2008). Outro fator determinante para a alta contaminação é que *S. aureus* é reconhecido mundialmente como a principal causa de infecções intramamárias em vacas leiteiras (ANDRÉ et al. 2008).

A quantidade de enterotoxina necessária para causar a doença ainda não está bem estabelecida, mas acredita-se que dependa da susceptibilidade do indivíduo, do peso corporal e, principalmente, do estado de saúde da pessoa acometida (BALABAN e RASOOLY, 2000). De forma geral, baixas concentrações, em torno de 20 ng a 1 µg, podem causar enfermidades nos seres humanos (JAY et al., 2005).

O período de incubação pode variar de 30 minutos a 8 horas, porém, na maioria dos casos, os sinais clínicos aparecem entre 2 e 4 horas após a ingestão do alimento contaminado (BALABAN e RASOOLY, 2000; LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; RODRIGUES et al., 2004; JAY et al., 2005; SILVA et al., 2010). Sintomas como náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia (BALABAN e RASOOLY, 2000; LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; RODRIGUES et al., 2004; JAY et al., 2005; LAMAITA et al.; 2005; SILVA et al., 2010; SANTANA et al., 2010) possuem curta duração e variam de acordo com o grau de susceptibilidade de cada indivíduo, com a concentração da enterotoxina no alimento e a quantidade ingerida (FORSYTHE, 2002; RODRIGUES et. al., 2004).

Não existe um tratamento efetivo para a enfermidade, uma vez que os sintomas se desenvolvem rapidamente e ocorrem em um tempo relativamente curto. Porém, em casos de diarreia e vômitos severos recomenda-se a reposição de fluidos para restaurar o equilíbrio eletrolítico. Em geral, a letalidade é baixa, podendo ocorrer mortes ocasionais, principalmente em crianças e idosos (JAY et al., 2005) e, em casos isolados, quando ocorrem complicações, as doses agudas de enterotoxinas podem levar a óbito (BALABAN e RASOOLY, 2000).

O curso rápido e de reduzida gravidade da doença contribuem para que a notificação seja baixa (BORGES et al., 2008a). Apesar disso, as falhas no diagnóstico clínico e laboratorial são, na maioria das vezes, o principal motivo para as subnotificações das intoxicações alimentares no Brasil, sendo necessárias mais informações epidemiológicas a respeito dos surtos envolvendo *S. aureus* (SANTANA et al., 2010).

Entre os anos de 1998 e 2002 foram notificados, no Brasil, 79 casos de intoxicação por *S. aureus* em leite e queijos (SIRVETA, 2012). No entanto, os dados epidemiológicos de surtos de origem alimentar ocorridos no País são escassos, desatualizados e de difícil acesso. Segundo Forsythe (2002), somente cerca de 10% do total de surtos é notificado às autoridades competentes, devido às falhas no sistema de notificação e de fiscalização.

2.4.2. Pesquisa de *Staphylococcus enterotoxigênico* e de suas toxinas

A contagem de *S. aureus* em alimentos pode ser feita com objetivo de verificar o envolvimento em surtos de intoxicação alimentar ou para averiguar se o alimento é fonte potencial desse micro-organismo e, ainda, como indicativo de condições higiênico-sanitárias da produção de alimentos (SILVA et al., 2010).

O diagnóstico de intoxicações estafilocócicas é realizado a partir de exames clínicos e laboratoriais dos envolvidos e da presença de enterotoxinas nos alimentos. Além disso, quando possível o isolamento do micro-organismo por meio de cultura microbiológica, podem ser realizados testes bioquímicos de produção de coagulase ou termonuclease e hemólise em ágar sangue (CREMONESI et al., 2005). Embora algumas características bioquímicas de *Staphylococcus* spp. apresentem correlação com a produção de enterotoxinas, auxiliando na identificação de espécies enterotoxigênicas (JAY et al., 2005), esses testes podem ser insuficientes para avaliação do potencial enterotoxigênico dessas bactérias.

Os métodos atualmente utilizados para a detecção de enterotoxinas em fluidos sobrenadantes de culturas de *Staphylococcus* spp. e em extratos de alimentos baseiam-se em procedimentos imunológicos com sensibilidade e especificidade dependentes de quantidades detectáveis de toxinas, podendo variar significativamente com a pureza do reagente (LETERTRE et al., 2003; CREMONESI et al., 2005). Em alguns casos, a produção de enterotoxina é influenciada pela condições de cultura e pela composição do alimento que podem interferir na detecção (PINTO et al., 2005a).

Kits comerciais de testes para detecção de enterotoxinas são restritos às clássicas SEA – SEE (OMOE et al., 2002; CREMONESI et al., 2005;

MORANDI et al., 2007). A falta de métodos adequados impede o controle da prevalência das demais toxinas (AKINEDEN et al., 2008). Assim, para aperfeiçoar as pesquisas de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, tem-se buscado desenvolver, nos últimos anos, técnicas mais rápidas e sensíveis. Houve um aumento significativo no desenvolvimento de métodos moleculares para a detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos (APRODU et al., 2011).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se revelado uma alternativa rápida, sensível e específica na identificação de *S. aureus* e de seus genes que codificam para produção de enterotoxinas em amostras de alimentos (ROSEC e GIGAUD, 2002; HEIN et al., 2005; PINTO et al., 2005a; CREMONESI et al., 2007; MORANDI et al., 2007; PELES et al., 2007; AKINEDEN et al., 2008; RALL et al., 2008; ZOUHAROVA e RYSANEK, 2008; PELISSER et al., 2009; AHMADI et al., 2010; ERTAS et al., 2010). No entanto, trata-se de um teste que evidencia a presença de um ou mais genes para a produção de enterotoxinas, mas não implica necessariamente, em sua presença no alimento uma vez que não garante sua expressão (CREMONESI et al., 2005; AKINEDEN et al., 2008; RALL et al., 2008).

A microbiologia molecular baseada em métodos como PCR é capaz de identificar não somente micro-organismos viáveis, mesmo quando presentes em pequeno número (AHMADI et al., 2010), mas também aqueles injuriados ou mortos após o tratamento térmico durante o processamento do alimento (ROSEC e GIGAUD, 2002; CREMONESI et al., 2005; AHMADI et al., 2010; SANTANA et al., 2010), além de possibilitar a detecção de bactérias viáveis mas não cultiváveis, que surgem, particularmente, em ambientes com condições adversas de desenvolvimento (APRODU et al., 2011).

A técnica de PCR pode ser usada com grande eficácia para a detecção do gene *coa*, que codifica para presença da enzima coagulase, e do gene *femA* na identificação de *S. aureus* (ARCURI et al., 2006). O gene *femA* tem sido explorado como marcador específico de *S. aureus* em testes baseados em pesquisa de DNA. Esse gene codifica um fator essencial para a resistência à metilina e encontra-se altamente preservado dentro da

espécie de *S. aureus* (MEHROTRA et al., 2000; ARCURI et al., 2006). A amplificação do gene *femA* ou parte dele por PCR constitui ferramenta útil na diferenciação de espécies de *Staphylococcus*, sendo, portanto, uma alternativa rápida e segura para identificação dessa bactéria (MEHROTRA et al., 2000; FREITAS, 2005).

Metodologias convencionais de cultivo para enumeração de *Staphylococcus* spp. em alimentos também são amplamente empregadas. O meio de cultura mais utilizado é o Baird-Parker, que contém substâncias que selecionam e favorecem o desenvolvimento desse grupo (BAIRD e LEE, 1995). Pode ser adicionado de uma emulsão de gema de ovo e de telurito de potássio (WHER e FRANK, 2004), além de fibrinogênio para sua diferenciação (BAIRD e LEE, 1995). O emprego dessa metodologia na rotina laboratorial tem se mostrado bastante limitado devido à grande variedade de colônias com morfologias atípicas e às diversas etapas necessárias para confirmação do resultado final como coloração Gram e testes bioquímicos de catalase, utilização anaeróbica de glicose e manitol, sensibilidade à lisostafina e produção de termonuclease e coagulase (SILVA et al., 2000).

Outros meios de cultura e metodologias foram desenvolvidos para enumeração de *Staphylococcus* spp. (BAIRD e LEE, 1995). O sistema de Petrifilm™ é amplamente utilizado na indústria de alimentos como uma alternativa simplificada e prática em comparação à metodologia convencional de plaqueamento. O filme base desse Petrifilm™ possui o meio Baird-Parker modificado e a confirmação e diferenciação de colônias é realizada por meio de um disco reativo de DNase, que indica a produção da enzima termonuclease (ROSEC et al., 1997; BAIRD e LEE, 1995). Esse sistema foi avaliado em alimentos, sendo considerado adequado para enumeração de *S. aureus* (INGHAM et al., 2003).

2.4.3. *Staphylococcus* enterotoxigênico em leite e derivados

S. aureus encontram-se naturalmente presentes na pele de seres humanos e de animais (PELES et al., 2007). Os principais reservatórios em humanos são as cavidades nasais, sendo também encontrado nos olhos, garganta e trato intestinal (HOBBS e ROBERTS, 1998; JAY et al., 2005).

A prevalência desta bactéria em produtos lácteos pode indicar baixa qualidade do leite utilizado como matéria-prima, que pode ser proveniente de animais com mastite, visto que *S. aureus* é o agente etiológico mais frequente dessa doença (BALABAN e RASOOLY, 2000; KWOK e CHOW, 2003; PINTO et al., 2005b; STAMFORD et al., 2006; PELES et al., 2007; BORGES et al., 2008b; MARTINS et al., 2010). Por esse motivo, animais com infecção estafilocócica nas glândulas mamárias têm sido considerados a principal fonte de estirpes de *S. aureus* para o leite (BORGES et al., 2008a).

A presença de *S. aureus* também pode sugerir um processamento realizado fora dos padrões de boas práticas de fabricação, que ordenhadores e manipuladores não possuem hábitos higiênicos adequados e são, muitas vezes, portadores assintomáticos desse micro-organismo (BALABAN e RASOOLY, 2000; FEITOSA et al., 2003; BORGES et al., 2008b). O ambiente de ordenha possui significativa importância também devido à higienização inadequada de animais (VERAS et al., 2008). Utensílios e equipamentos utilizados na produção de leite e no processamento podem levar à contaminação, inclusive devido à formação de biofilmes (GÖTZ, 2002).

Manipuladores, equipamentos de ordenha, o ambiente e a pele do teto e do úbere de animais leiteiros são possíveis fontes de contaminação para o leite a granel (ERTAS et al., 2010). A contaminação de queijos é atribuída, principalmente, à utilização de leite cru na sua fabricação ou a falhas durante o processamento, principalmente na pasteurização, manipulação inadequada após o processamento ou na distribuição do produto (BORGES et al., 2008b).

Staphylococcus sp. e suas enterotoxinas têm sido detectados com frequência em leite cru, queijos e outros produtos lácteos (ROSEC e GIGAUD, 2002; LAMAITA et al., 2005), constituindo-se, portanto, um problema de saúde pública devido ao risco de causar intoxicação alimentar (SANTANA et al., 2010; BORGES et al., 2005; IKEDA et al., 2005; LAMAITA et al., 2005). No Brasil, *S. aureus* é uma das bactérias mais frequentemente isoladas em leite cru e como causa de mastite bovina. Muitos surtos têm sido associados a essa matéria-prima (ANDRÉ et al. 2008).

S. aureus pode representar risco potencial à saúde do consumidor quando não há pasteurização, nem condições higiênico-sanitárias na manipulação ou padrões adequados do leite e seus derivados (LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; VERAS et al., 2008). Alimentos submetidos ao tratamento térmico podem conter toxinas estafilocócicas, termorresistentes (BHATIA e ZAHOOR, 2007; NADER FILHO et al., 2007; SILVA et al., 2010; SANTANA et al., 2010). Além disso, em casos de tratamento insuficiente, células injuriadas de *S. aureus*, as quais possuem a capacidade de se recuperar em um ambiente propício e retornar ao seu estado fisiológico normal, podem se multiplicar e produzir enterotoxinas (ASSIS, 1990).

A presença de espécies toxigênicas de *S. aureus* no leite não implica, necessariamente, na ocorrência de intoxicações em seres humanos, apesar do risco potencial (AKINEDEN et al., 2008). Vários fatores como pH, população inicial de *S. aureus* e temperatura de armazenamento desempenham um papel importante na produção de enterotoxinas durante a fabricação de queijo e outros produtos lácteos (DE BUYSER et al., 2001). Embora esse micro-organismo não resista à pasteurização e etapas de fermentação e maturação possam impedir seu desenvolvimento em queijos de leite cru, uma vez formadas, as enterotoxinas mantêm sua atividade biológica (AKINEDEN et al., 2008). O risco atribuído aumenta, principalmente, ao se considerar que essa espécie envolvida nas infecções intramamárias de rebanhos leiteiros, possuem elevado potencial enterotoxigênico (NADER FILHO et al., 2007).

Várias pesquisas relatam a incidência deste micro-organismo em leite (BORGES et al., 2005; HEIN et al., 2005; LAMAITA et al., 2005; CHAPAVAL et al., 2006; STAMFORD et al., 2006; BHATIA e ZAHOOR, 2007; AKINEDEN et al., 2008; RALL et al., 2008; JAKOBSEN et al., 2010), queijo de coalho artesanal e industrial (RAPINI et al., 2002; NETO et al., 2004; BRUNO et al., 2005; LIMA et al., 2005), queijo Minas Frescal (SABIONI et al., 1988; LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; MONTEIRO e LEANDRO, 2004) e queijo Minas artesanal (ARAÚJO et al., 2004; FILHO et al., 2005; FONSECA et al., 2005a; FONSECA et al., 2005b; PINTO et al., 2005b) excedendo, em muitos casos, os limites estabelecidos pela legislação vigente.

Em pesquisa realizada com o Queijo Canastra por Dores (2007), as contagens de *S. aureus* estavam acima do indicado pela legislação e somente aos 22 dias de maturação sob temperatura ambiente, atingiram os níveis exigidos. Nesse mesmo trabalho, apesar das contagens elevadas, não foi detectada toxina estafilocócica pelo método VIDAS[®], embora tenha detectado SEA pelo método de detecção de sensibilidade ótima em placas (OSP). Em estudo realizado por Pinto (2004) em queijos Minas artesanal do Serro, apesar de índices de *Staphylococcus* sp. superiores a 10^5 UFC.g⁻¹, também não foi verificada a presença de enterotoxinas.

Borges et al. (2005), ao avaliarem o perfil de contaminação por estafilococos e a ocorrência de enterotoxina na linha de produção de queijo de coalho, constataram que o leite utilizado como matéria-prima apresentou elevada contaminação por estafilococos coagulase positiva, com confirmação de *S. aureus*. Um potencial de produção de enterotoxina foi detectado em 20% dos queijos analisados, no leite cru e no leite pasteurizado, confirmando a contaminação na linha de produção deste queijo, possivelmente associada às falhas na adoção do programa de Boas Práticas de Fabricação.

Loguercio e Aleixo (2001) ao avaliarem as condições higiênico-sanitárias do queijo Minas Frescal produzido artesanalmente, verificaram a presença de *S. aureus* em contagens superiores ao considerado aceitável em quase 97% das amostras, potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar. Fonseca et al. (2005b) detectaram *S. aureus* em 50% das amostras de queijos artesanais em Minas Gerais, em níveis superiores a 10^7 UFC.g⁻¹.

Freitas et al. (2009) investigaram a presença *S. aureus* com genes toxigênicos em amostras isoladas de queijo de coalho e verificaram elevado percentual de isolados contendo diferentes genes, inclusive de *Staphylococcus* coagulase negativa e destacaram a inexistência de limites legais para essas espécies em alimentos produzidos no Brasil.

A presença de *S. aureus* e suas enterotoxinas é uma questão bastante relevante, bem como a higiene dos alimentos, especialmente em relação aos derivados de leite cru como os queijos artesanais. Para Ertas et al. (2010), o leite deve ser pasteurizado antes da produção de queijo, a fim

minimizar os riscos. Ainda segundo esses mesmos autores, boas práticas de higiene são indispensáveis para a produção de alimentos seguros.

Cunha Neto et al. (2002) isolaram *Staphylococcus* enterotoxigênicos em queijo de coalho e 100% dessas estirpes foram positivas para enterotoxinas clássicas. Na avaliação de queijo de coalho comercializado nas praias de Salvador e Maceió, Rapini et al. (2002) observaram que 100% das amostras estavam contaminadas por *Staphylococcus* sp. e por enterotoxinas SEB e SEC.

Lima (2005) avaliou 44 amostras de queijos de coalho artesanais e 36 industriais comercializados no Estado de Ceará e encontrou 100% das amostras artesanais e 95,65% das industriais com contagens de *Staphylococcus* sp.. Das amostras contaminadas, 30 de queijos artesanais e 13 de industriais possuíam *Staphylococcus* coagulase positiva em contagens que variaram de 10^4 a 10^7 UFC.g⁻¹. Apesar das altas contagens, em nenhuma amostra de queijo foram encontradas enterotoxinas estafilocócicas.

Vários fatores interferem na distribuição de *S. aureus* enterotoxigênicos como as variações geográficas (MORANDI et al. 2007), os reservatórios ou origem das estirpes, a sensibilidade dos métodos de detecção, os genes detectados, o número e os tipos de amostras avaliadas (ERTAS et al., 2010).

2.5. Aplicação de nisina em alimentos

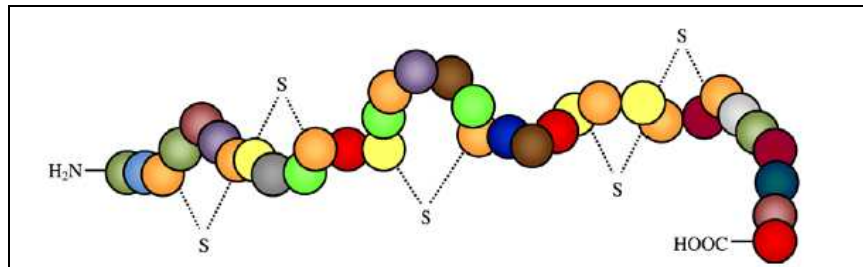
A crescente preocupação do consumidor com a saúde e o aumento do consumo de produtos ditos naturais estão se tornando uma força motriz para a investigação e inovação em muitos campos da indústria de alimentos (CAO-HOANG et al., 2010; DAL BELLO et al., 2010). Nos últimos 25 anos, muitas pesquisas têm sido realizadas sobre bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas com o objetivo principal de melhorar a qualidade microbiana e a segurança dos produtos fermentados (ALEGRÍA et al., 2010).

Bacteriocinas são peptídeos, proteínas ou complexos protéicos biologicamente ativos, produzidos por certos grupos bacterianos que possuem ação bactericida ou bacteriostática (CLEVELAND et al., 2001).

Algumas atuam inibindo o desenvolvimento de bactérias intimamente relacionadas, enquanto outras inibem uma gama muito maior de microorganismos, incluindo patógenos e deterioradores como *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Clostridium tyrobutyricum* (ALEGRÍA et al., 2010).

A nisina é uma bacteriocina produzida por várias estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Descoberta em 1928, tem sido consumida pelos humanos ao longo de sua história, encontrando-se naturalmente em alimentos fermentados, especialmente derivados lácteos (BOWER et al., 2002).

A molécula da nisina, representada na Figura 4, é um peptídeo de 34 aminoácidos que possui massa molar de 3,5 kDa, composta por oito alaninas, quatro ácidos aminobutírico, três glicinas, três isoleucinas, três lisinas, duas leucinas, duas histidinas, duas metioninas, duas deidroalanina, uma serina, uma valina, uma prolina, uma asparagina e uma deidrobutirina (TOLEDO, 2000).



Fonte: WIRAWAN et al. (2006).

Figura 4 – Representação da estrutura química da molécula de nisina. Seus 34 aminoácidos estão representados pelas esferas.

Nisina possui classificação GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), com uso aprovado para a indústria alimentícia (CHOLLET et al., 2009). É um dos antimicrobianos disponíveis comercialmente mais utilizados para biopreservação de alimentos em todo o mundo (CAO-HOANG et al., 2010). Empregada em mais de 50 países em diversos produtos como queijos, queijos processados, vegetais, frutas enlatadas, cremes de confeitaria, leite e derivados, pudins,

carne processada, embutidos, produtos de padaria (MORAES, 2002), ovo líquido, molhos, sopas, conservas, cervejas, sobremesas, pescados, maionese, alimentos infantis (BENKERROUM et al., 2002). No Brasil, seu uso é permitido, com limite máximo de $12,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de produto final para todos os tipos de queijos (BRASIL, 1996) e requeijão (BRASIL, 1997).

Possui amplo espectro de ação contra a maioria das bactérias Gram positivas, inclusive formadoras de esporos e tem se mostrado eficaz contra patógenos importantes em alimentos como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium botulinum*, *L. monocytogenes*, entre outros. Em geral, é inativa contra fungos filamentosos e leveduras (CLEVELAND et al., 2001; BOWER et al., 2002) e contra bactérias Gram negativas devido à presença da membrana externa (ARQUÉS et al., 2011).

Seu principal mecanismo de ação sobre as células sensíveis está relacionado à formação de poros ou canais iônicos na membrana citoplasmática, por meio da interação eletrostática com os fosfolípidos de membrana resultando no extravasamento de material celular e, conseqüentemente, a sua morte (CLEVELAND et al., 2001; ADAMS, 2003). A capacidade de inserção da nisina na membrana citoplasmática para formação de poros depende da composição de fosfolípido, que pode contribuir para as diferenças na sensibilidade entre as espécies (VENEMA et al., 1995).

Algumas estirpes bacterianas são resistentes a bacteriocinas, pois são capazes de produzir uma proteína de imunidade para se proteger, outras passaram por processo de mutação espontânea e foram selecionadas na presença de nisina, dificultando sua utilização como um bioconservante (VENEMA et al., 1995). Alguns relatos têm sugerido falhas nos processos de conservação devido ao desenvolvimento eventual de estirpes resistentes à nisina que possam comprometer seu uso para o controle de patógenos veiculados por alimentos (YOON et al., 2011), tais como *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *C. botulinum* (GARCÍA et al., 2010).

A eficácia do uso de bacteriocinas em alimentos depende da sua difusão em toda matriz do produto. Sua disponibilidade é influenciada por fatores relacionados à composição e propriedades físico-químicas, tais como a_w , teor de sais, de proteínas e gordura, enzimas proteolíticas, pH, aditivos e

temperatura de armazenamento (CHOLLET et al., 2008; CAO-HOANG et al., 2010; ANTOLINOS et al., 2011; ARQUÉS et al., 2011).

Em geral, a nisina é mais ativa em valores mais baixos de pH (ANTOLINOS et al., 2011), pois o aumento da carga líquida de bacteriocinas pode facilitar sua translocação através da parede celular e aumentar a sua atividade antibacteriana (ARQUÉS et al., 2011).

A influência da temperatura sobre sua eficácia ainda é controversa (ANTOLINOS et al., 2011), embora haja relatos de que possui considerável resistência térmica, especialmente em valores de pH ácidos, suportando aquecimento de 115 °C durante 20 minutos com inativação inferior a 5 % em pH 3,0 (ADAMS, 2003). Em geral, possui menor atividade a temperaturas abaixo de 7 °C, presumivelmente porque aumenta a ordenação das cadeias lipídicas da membrana citoplasmática inibindo sua inserção (VENEMA et al., 1995).

Al-Holy et al. (2012) verificaram que o efeito de nisina na concentração de 1.000 e 1.500 UI.mL⁻¹ em queijo branco fresco contra *L. innocua* foi mais acentuado a 10 °C do que a 4 °C, resultando em uma redução de mais de 2 log UFC.g⁻¹.

Também não há consenso quanto à presença de sais, havendo relatos que o NaCl poderia aumentar o efeito antimicrobiano de bacteriocinas ou agir de forma antagônica (ARQUÉS et al., 2011; YOON et al., 2011).

Chollet et al. (2008) não verificaram efeito significativo de diferentes concentrações de NaCl sobre a recuperação da nisina em gel de agarose, por outro lado, houve diferença quando utilizou-se 30 % de gordura, sugerindo que ocorreram interações entre nisina e lipídeos, limitando a quantidade de nisina livre. Isso também foi demonstrado pela redução do efeito antimicrobiano contra *Micrococcus luteus*. Neste caso, a presença de 2 % de NaCl aumentou ligeiramente sua atividade quando comparada ao gel contendo apenas 0,5 % desse sal.

Bhatti et al. (2004) relatou que no leite com 2 % de gordura, pasteurizado e homogeneizado houve uma redução de nisina disponível para agir contra *L. monocytogenes*, reduzindo, assim, sua atividade. Yoon et

al. (2011) também verificaram melhor efeito antilisterial em leite desnatado e semidesnatado (1 % de gordura) do que no integral (8 % de gordura).

Zapico et al. (1999) verificaram que a adição de nisina na concentração de 100 UI.mL⁻¹ ao leite desnatado homogeneizado reduziu as contagens de *L. innocua* em 3,0 log UFC. Por outro lado, no leite integral homogeneizado, a redução foi de 2,9 log UFC. Essa redução foi menor do que aquela verificada para o leite integral não homogeneizado, de 3,8 log UFC.

Tem-se buscado estudar o uso da nisina a fim de ampliar sua aplicação, seja adicionada diretamente ao alimento ou por meio de embalagens ativas, ou ainda, para aplicação como sanitizante na indústria de alimentos, inclusive para remoção de biofilmes (AREVALOS-SÁNCHEZ et al., 2011). A utilização de bacteriocinas para controlar patógenos e deterioradores tem sido relatada em uma variedade de alimentos, incluindo leite e produtos lácteos (ARQUÉS et al., 2011). Muitas pesquisas recentes têm demonstrado seu efeito contra *S. aureus* e outras bactérias Gram positivas (CABO et al., 2009; PATHANIBUL et al., 2009; MALHEIROS et al., 2010; MITRA et al., 2010). Alguns resultados de trabalhos estão citados na Tabela 5.

Tabela 5 – Efeito da adição de nisina sobre contagem de micro-organismos em alimentos.

ALIMENTO	OUTROS TRATAMENTOS	MICRO-ORGANISMO ALVO	REDUÇÃO (log UFC.g ⁻¹ ou mL ⁻¹ ou cm ⁻²)	REFERÊNCIA
Leite Fermentado	--	<i>L. monocytogenes</i>	6	BENKERROUM <i>et al.</i> , 2002
Queijo	--	<i>S. aureus</i>	2	RILLA <i>et al.</i> , 2004
Queijo Coalho	Embalagem	<i>Staphylococcus</i> sp.	2	MELO, 2003
Carcaça bovina	Ácido láctico	Mesófilos aeróbios	2	MARTINEZ <i>et al.</i> , 2002
Salsicha defumada	Ácidos acético, láctico, benzoato de potássio	<i>L. monocytogenes</i>	2,1 a 3,3	GERORNARAS <i>et al.</i> , 2006
Carne Suína	--	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	3,5	NATTRESS <i>et al.</i> , 2001
Carne Mecanicamente Separada	Alta pressão	Mesófilos aeróbios	5,3	YUSTE <i>et al.</i> , 2002
		Psicrotróficos	>7,5	
Linguíça frescal	Óleo essencial de orégano	<i>L. monocytogenes</i>	2	KRUGER, 2006
			4	

Estratégias de biopreservação baseadas na adição de estirpes bacterianas também podem ser usadas para inibir o desenvolvimento de patógenos em queijo (DELBES-PAUS *et al.*, 2010). Bactérias como *L. lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. e *Enterococcus* poderiam contribuir para o controle de *S. aureus* em queijo, não somente pela diminuição do pH, mas também pela produção de bacteriocinas (ARQUÉS *et al.*, 2011) ou H₂O₂ (DELBES-PAUS *et al.*, 2010).

A adição de *L. lactis* foi testada experimentalmente na fabricação de diversas variedades de queijo (RYAN *et al.*, 1996; MARTÍNEZ-CUESTA *et al.*, 2001; O'SULLIVAN *et al.*, 2003; RILLA *et al.*, 2003; GARDE *et al.*, 2006). Além das aplicações tecnológicas de produção de bacteriocina, estirpes de *L. lactis* também foram testadas para o tratamento de mastite em vacas (RYAN *et al.*, 1999).

Rodríguez *et al.* (1998), avaliaram a ação da nisina sobre *L. innocua* em Queijo Manchego. Foram realizados 4 tratamentos distintos com adição de (1) 1 % *L. lactis* subsp *lactis* e coalho, (2) 1 % de fermento mesofílico e

coalho, (3) 1 % *L. lactis* subsp *lactis*, 1 % de fermento mesofílico e coalho e (4) sem fermento e com coalho. Apenas nos queijos adicionados de *L. lactis* (tratamentos 1 e 3) havia nisina detectável, sendo que no queijo adicionado apenas de *L. lactis* (tratamento 1) foi significativamente maior do que quando em conjunto com fermento (tratamento 3) assim como a redução de *L. innocua* foi significativamente maior no tratamento em que se usou somente *L. lactis* ($4,62 \log.g^{-1}$).

Hamama et al. (2002), avaliaram o efeito inibitório de estirpes de *L. lactis* produtoras de nisina sobre o *S. aureus* durante a fabricação de Queijo Jben. Quando a contagem inicial de *S. aureus* foi de 10^3 UFC.mL⁻¹, após 4 dias de fabricação, não mais foi verificada a sua presença. Por outro lado, quando o inóculo de *S. aureus* foi de 10^5 UFC.mL⁻¹, estes permaneceram no produto até o terceiro dia de armazenamento e foi detectada presença de enterotoxina em 24 horas após a inoculação.

Estirpes de *L. lactis* são componentes majoritários de culturas *starter* comerciais utilizadas pela indústria de laticínios para a fabricação e maturação de queijos e leites fermentados. Sua incorporação na fabricação como culturas *starters* ou adjunta pode ser uma alternativa econômica à adição de bacteriocinas purificadas. A utilização de estirpes produtoras de nisina poderia ser de interesse no desenvolvimento de culturas *starters* de proteção para o queijo e outros produtos fermentados. A utilização dessas culturas poderia auxiliar a reforçar a tipicidade e originalidade dos queijos tradicionais (ALEGRÍA et al., 2010). Neste caso, para a produção de queijo com leite cru, é importante a seleção das culturas *starters* utilizadas (ALOMAR et al., 2008).

Embora alguns autores apontem limitações no uso de nisina, relacionadas ao seu espectro de ação contra Gram negativos, fungos filamentosos e leveduras, além de não agir sobre todos os esporos bacterianos ou bactérias Gram positivas (HALIN et al., 1993), estudos sugerem que essas bacteriocinas possuem potencial para utilização em alimentos, principalmente, quando associada a outros processos de conservação (KYKKIDOU, et al., 2007).

A combinação de bacteriocinas com tratamentos térmicos e não-térmicos, tais como alta pressão, campos elétricos pulsados e com outros

antimicrobianos (GARCÍA et al., 2010) que levem à permeabilidade da membrana externa ou cause danos subletais a fim de reduzir a seleção de estirpes resistentes ou aumentar a atividade contra bactérias Gram negativas tem sido relatada (ARQUÉS et al., 2011; YOON et al., 2011).

O efeito de nisina combinado com nitrito, ácidos orgânicos e seus sais, agentes quelantes, etanol, óleos essenciais, lisozima, lactoferrina ou sistema lactoperoxidase contra patógenos tem sido descrito (ARQUÉS et al., 2011).

Bower et al. (2002) verificaram a efetividade da nisina contra bactérias Gram negativas e fungos filamentosos quando utilizada em combinação com agentes quelantes como o EDTA.

A combinação de tratamentos de alta pressão e bacteriocina inibiu o desenvolvimento de *S. aureus* em queijo (ARQUÉS et al., 2011), porém, esses tratamentos podem ser de difícil aplicação em algumas tecnologias, especialmente para produção de queijos artesanais (ALOMAR et al., 2008).

Al-Holy et al. (2012) verificaram que o efeito de nisina em queijo branco fresco contra *L. innocua* foi dependente da dose (500, 100 ou 1.500 UI.mL⁻¹) e eliminou esse micro-organismo apenas após 6 e 8 dias de armazenamento a 10 e 4 °C, respectivamente, quando associada ao tratamento térmico do leite (63 °C por 5 minutos), apresentando efeito sinérgico.

Arqués et al. (2011) avaliaram a atividade inibidora de nisina isoladamente e associada com reuterina contra patógenos no leite incubado a 37 °C. Após 4h de incubação a nisina levou a uma redução de 4,51 log de *L. monocytogenes* e 4,68 log de *S. aureus* quando comparada ao controle. *L. monocytogenes* foi completamente inativada após 4 h em leite com a combinação de nisina e reuterina e *S. aureus* teve suas contagens reduzidas em 2,35 log. Como esperado, a nisina não inibiu os patógenos Gram negativos testados neste trabalho (*E. coli*, *Samonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila* e *Yersinia enterocolitica*).

Em estudo realizado por García et al. (2010), foram testados dois níveis de *S. aureus* no leite pasteurizado (10² UFC. mL⁻¹ e 10⁵ UFC. mL⁻¹). A adição de somente endolisina provocou um pequeno efeito inibitório, enquanto que a nisina foi capaz de inibir o desenvolvimento de *S. aureus* no

leite mantendo constante a contagem inicial. A eliminação completa desse patógeno somente foi obtida na presença de endolisina e nisina, após 6 horas de incubação.

Yoon et al. (2011) verificaram que um óleo essencial extraído de árvores coníferas da família do Pau-Brasil age sinergicamente com nisina inibindo o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em leite integral (8 % de gordura), semidesnatado (1 %) e desnatado, com melhor efeito antilisterial em leite com menor teor de gordura.

Pinto et al. (2011) verificaram o efeito antagônico de nisina sobre *S. aureus* em queijo Minas artesanal do Serro utilizando as doses de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹. Neste trabalho, a bacteriocina foi efetiva na redução da população de *S. aureus* entre sua inoculação no leite até o momento da obtenção da massa.

Um estudo avaliou o uso da nisina como um tratamento antimicrobiano com o objetivo de aumentar a vida de prateleira de Queijo Galotyri. Os queijos foram inoculados com 50 UI.g⁻¹ e 150 UI.g⁻¹ e armazenados em condições aeróbias, a 4°C, por 42 dias. Houve um aumento na vida de prateleira dos queijos de 21 dias no controle para 35 dias nos queijos adicionados de 50 UI.g⁻¹ e 42 dias naqueles adicionados de 150 UI.g⁻¹ (KYKKIDOU et al., 2007).

A literatura relata a importância do controle de *S. aureus* para garantir a segurança dos consumidores, principalmente relacionado à contaminação de leite e derivados. Muitas pesquisas têm sido realizadas com queijo Minas artesanal, devido à sua relevância para a população, sob vários aspectos. Da mesma forma, o uso de nisina tem sido amplamente pesquisado, nas suas diferentes formas de aplicação. Apesar disso, ainda são limitadas as informações acerca do seu emprego em queijos e a literatura ainda pode avançar muito, principalmente com relação ao seu uso na produção de queijos artesanais mais seguros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

A fabricação dos queijos foi realizada em propriedades do Município de Medeiros, situado na Região da Serra da Canastra – MG. As análises microbiológicas do leite e da massa foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Minas Gerais (IFET), em Bambuí – MG. Os queijos foram transportados para o Instituto de Laticínios Cândido Tostes da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (ILCT/EPAMIG) localizado em Juiz de Fora – MG, onde foram maturados em câmara própria, à temperatura ambiente, simulando as condições de seu local de origem. As análises físico-químicas e microbiológicas dos queijos foram feitas nos laboratórios de pesquisa do ILCT/EPAMIG, Juiz de Fora – MG. As análises de perfil de textura (TPA), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e de detecção de enterotoxinas estafilocócicas foram realizadas, respectivamente, no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos, no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia, todos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

3.2. Etapas do estudo

O trabalho foi dividido em três etapas, segundo os objetivos básicos propostos: (1) Seleção das propriedades (2) Definição das doses de nisina e (3) Utilização da nisina na fabricação dos queijos Minas artesanais Canastra.

3.2.1. Etapa 1: Avaliação preliminar de queijos Minas artesanais Canastra, isolamento de *Staphylococcus aureus* e identificação de genes que codificam para produção de enterotoxinas clássicas

3.2.1.1. Seleção das propriedades

Foram selecionadas 05 unidades produtoras de queijo Minas artesanal, cadastradas no IMA, no Município de Medeiros, na Serra da Canastra, com o auxílio da EMATER-MG. Esta etapa foi fundamental para auxiliar na escolha das três propriedades onde o trabalho foi conduzido e o número de propriedades foi assim determinado para maior segurança na condução do experimento. Além disso, nesta fase, foram obtidos os isolados de *S. aureus*, utilizados na próxima etapa de teste *in vitro*.

3.2.1.2. Coletas de amostras

Foram coletadas 05 amostras de cada uma das 05 unidades produtoras da região da Serra da Canastra. Os queijos foram transportados para o ILCT/EPAMIG, em Juiz de Fora – MG, onde foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas de contagens de *S. aureus*.

3.2.1.3. Análises microbiológicas dos queijos

Foram realizadas análises de *S. aureus* utilizando-se Petrifilm™ 3M – *Petrifim Staph Express Count Plate* (STX) (AOAC 2003.08) nos tempos 03, 07, 14, 30 e 60 dias de maturação. Em casos de colônias suspeitas, utilizou-se o disco reativo Petrifilm™ 3M – *Staph Express* para confirmação da espécie. Adotou-se a metodologia descrita pelo fabricante.

O preparo das amostras e as diluições necessárias foram feitas de acordo com o descrito na Instrução Normativa nº 62, de 18 de setembro de 2003 (BRASIL, 2003).

3.2.1.4. Obtenção dos isolados de *Staphylococcus* sp.

Foram selecionadas 05 colônias típicas de *Staphylococcus* sp. diretamente das placas de petrifilm de cada tratamento, em todos os tempos, de cada repetição (produtor) e transferidas para caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – Oxoid Ltd. Basingstoke, England), incubadas a 37 °C por 24 h. Em seguida realizou-se plaqueamento em ágar BHI pela técnica de semeadura em estrias por esgotamento, incubadas a 37 °C por 24 h. Esse processo foi repetido até que fossem obtidas placas com colônias puras

Após o isolamento, para confirmação do gênero, as culturas foram submetidas à prova morfológica de coloração de Gram e testes bioquímicos de catalase (SILVA et al., 2010) e termonuclease utilizando-se disco reativo Petrifilm™ 3M – *Staph Express*, além de teste de resistência à acriflavina (7 µg/mL) por meio de plaqueamento em ágar BHI suplementado (ROBERSON et al., 1992).

As culturas com resultado positivo em todos os testes complementares foram mantidas congeladas a - 80 °C em caldo BHI adicionado de 20 % de glicerol. Antes do uso, foram repicadas e ativadas em caldo BHI a 37 °C, *overnight*.

Os isolados foram submetidos à análise de PCR para confirmação da espécie *S. aureus* e da presença de genes que codificam para produção de enterotoxinas e, posteriormente, utilizados na segunda etapa da pesquisa de teste *in vitro*.

3.2.1.5. Análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram realizadas análises de PCR de 14 isolados obtidos a partir das análises microbiológicas de enumeração de *S. aureus* dos queijos aos 3 dias de maturação, nesta etapa de seleção das propriedades. Optou-se por esse tempo de maturação porque nele todos os queijos, de todas as propriedades apresentaram colônias de *S. aureus* nas placas de petrifilms. Essas culturas foram utilizadas no teste *in vitro* de desafio com nisina.

O objetivo desta análise foi a confirmação da espécie de *S. aureus* e a verificação da presença de genes que codificam para produção de enterotoxinas. Para isso, foram avaliadas quanto à presença do gene *femA*, característico de todas as espécies de *S. aureus*, e dos genes que codificam para a produção de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*).

Inicialmente, foi realizada extração de DNA por meio de kit específico *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), segundo instruções do fabricante. As reações foram realizadas com o mix comercial *GoTaq[®] Green Master Mix* (Promega, Madison, WI, EUA). A amplificação do DNA foi realizada com o seguinte perfil térmico: desnaturação inicial do DNA e ativação da polimerase a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificação (95 °C durante 45 segundos, 46,2 °C por 45 segundos e 72 °C durante 45 segundos), terminando com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em aparelho *Electrophoresis Power Supply*, Locus biotecnologia[®], visualizados em gel de agarose (1,0%, p/v) corado com solução de Gel Red[™] Nucleid Acid Gel Stain (Biotium Inc., Hayward, CA, USA). O registro de imagens foi feito em transiluminador (L-PIX, Locus Biotecnologia[®]).

Todas as análises de PCR foram acompanhadas de controles negativo, utilizando água Milli-Q, e positivo com estirpes padrões com genótipo conhecido: *S. aureus* FRI 100 (*sea*), *S. aureus* ATCC 14458 (*seb* e *femA*), *S. aureus* ATCC 19095 (*sec*), *S. aureus* FRI 472 (*sed*), *S. aureus* FRI 326 (*see*).

Para o gene *femA*, foram utilizados os *primers* descritos por Mehrotra et al. (2000); para os genes *sea*, *seb* e *sec* os *primers* descritos por Rosec e Gigaud (2002) e para os genes *sed* e *see* os descritos por Johnson et al. (1991). A sequência de oligonucleotídeos dos *primers* está descrita na Tabela 6.

Tabela 6 – *Primers* para detecção dos genes que codificam para produção de enterotoxinas em *S. aureus*.

Gene	Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5' - 3')	Produto (pb)	Referência
sea	SEA1	ACG ATC AAT TTT TAC AGC	544	ROSEC E GIGAUD (2002)
	SEA2	TGC ATG TTT TCA GAG TTA ATC		
seb	SEB1	GAA TGA TAT TAA TTC GCA TC	416	ROSEC E GIGAUD (2002)
	SEB2	TCT TTG TCG TAA GAT AAA CTT C		
sec	SEC1	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	257	ROSEC E GIGAUD (2002)
	SEC2	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CCA		
sed	SED1	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	317	JOHNSON et al. (1991)
	SED2	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG		
see	SEE1	ATA GAT AAA GTT AAA ACA AGC AA	170	JOHNSON et al. (1991)
	SEE2	TAA CTT ACC GTG GAC CC		
femA	FEMA1	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG	132	MEHROTRA et al. (2000)
	FEMA2	GAT AAA GAA GAAACC AGC AG		

3.2.1.6. Análises físico-químicas dos queijos

Foram realizadas análises físico-químicas de pH, a_w , umidade, gordura, cloretos, resíduo mineral fixo (RMF), proteínas e índices de proteólise de maturação, além de cálculo do teor de GES dos queijos nos tempos 03, 07, 14, 30 e 60 dias de fabricação.

O preparo das amostras, bem como as análises de pH, gordura, umidade, cloretos e RMF foram conduzidas de acordo com os métodos oficiais, descritos na Instrução Normativa nº 68, de 14 de abril de 2006 (BRASIL, 2006).

Os teores percentuais de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA a 12 % (m/v) foram obtidos pelo método Kjeldahl, conforme descrito por Pereira et al. (2001), para cálculo da relação % de $NS_{pH4,6}/NT$ (índice de extensão de proteólise) e de $NS_{TCA12\%}/NT$ (índice de profundidade de proteólise).

A análise de a_w foi realizada por meio de medidor digital Aqualab modelo CX2T (Decagon Devices, Inc., Washington, USA), conforme metodologia descrita pelo fabricante.

A determinação do pH foi feita utilizando-se equipamento de pH modelo Tecnal, pH Meter Tec-2.

3.2.2. Etapa 2: Efeito antagônico in vitro da adição de nisina sobre a multiplicação de *Staphylococcus aureus*

O teste *in vitro* teve por objetivo desafiar os isolados de *S. aureus* dos queijos artesanais da Serra da Canastra obtidos na primeira etapa do trabalho com 05 concentrações de nisina para definir as doses empregadas no teste *in loco* (Etapa 3). Para isso, os 14 isolados de *S. aureus* da Etapa 1 foram adicionados em *pool* ao leite desnatado reconstituído (LDR) para que fossem obtidas concentrações entre 10^5 e 10^6 UFC.mL⁻¹.

Foi utilizado o preparado comercial em pó contendo Nisina (Chrisin[®] 2,5 % p/p - Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda. – Valinhos - SP - Brasil). A nisina foi pesada e adicionada, conforme indicado pelo fabricante, diretamente ao LDR a 12 %, até as concentrações desejadas de 100, 200, 400 e 500 UI.mL⁻¹, conforme metodologia descrita por Pinto et al. (2011).

Inicialmente, o leite em pó foi reconstituído em 100 mL de água recém autoclavada. Posteriormente, o LDR foi submetido a 100 °C por 20 minutos em vapor fluente. Após o resfriamento, adicionou-se a nisina e 1,5% do *pool* de culturas de *S. aureus*. Os controles foram feitos sem a adição de nisina. O LDR foi, então, fracionado em tubos de ensaio, no volume de 5 mL, incubados a 37 °C e analisados nos tempos 0, 03, 05, 08, 10, 12, 16, 24, 36, 48, 72 e 96 horas.

As análises foram realizadas em duplicata utilizando-se Petrifilm[™] 3M – *Petrifim Staph Express Count Plate* (STX) (AOAC 2003.08), em três repetições.

3.2.3. Etapa 3: Estudo *in loco* da adição de nisina ao processo de fabricação do queijo Minas artesanal Canastra

O teste *in loco* foi conduzido em três repetições, representadas por cada uma das propriedades, utilizando-se duas concentrações de nisina, 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹, além do controle, sem adição de nisina. As concentrações foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos na etapa 2 de teste *in vitro*.

3.2.3.1. Adição de nisina ao processo de fabricação dos queijos Minas artesanal Canastra e coletas de amostras

A partir dos resultados obtidos na Etapa 1, três propriedades que possuíam condições semelhantes, inclusive quanto às características físico-químicas e de contagens de *S. aureus*, além de produção de leite em quantidade suficiente, foram selecionadas para a pesquisa *in loco*.

A fabricação dos queijos foi conduzida conforme estabelecido pelas queijarias selecionadas. A nisina foi pesada e adicionada diretamente ao leite cru durante o processo de fabricação do queijo Minas artesanal, após a adição do pingo e antes da adição de coalho, conforme indicado na Figura 5, na quantidade necessária, calculada segundo as indicações do fabricante para que atingisse as concentrações previamente determinadas no teste *in vitro* (100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹).

Amostras de leite foram colhidas logo após a filtragem, antes da adição do pingo, bem como amostras de massa, após a dessoragem e imediatamente antes da enformagem, conforme indicado na Figura 5, para análises de *S. aureus* e bactérias lácticas (BAL). As amostras foram encaminhadas ao laboratório de microbiologia de alimentos do IFET, Bambuí – MG, onde foram analisadas.

Os queijos foram levados para o ILCT/EPAMIG, Juiz de Fora – MG, onde foram maturados à temperatura ambiente por 60 dias e analisados nos tempos 03, 07, 14, 30, 45 e 60 dias.

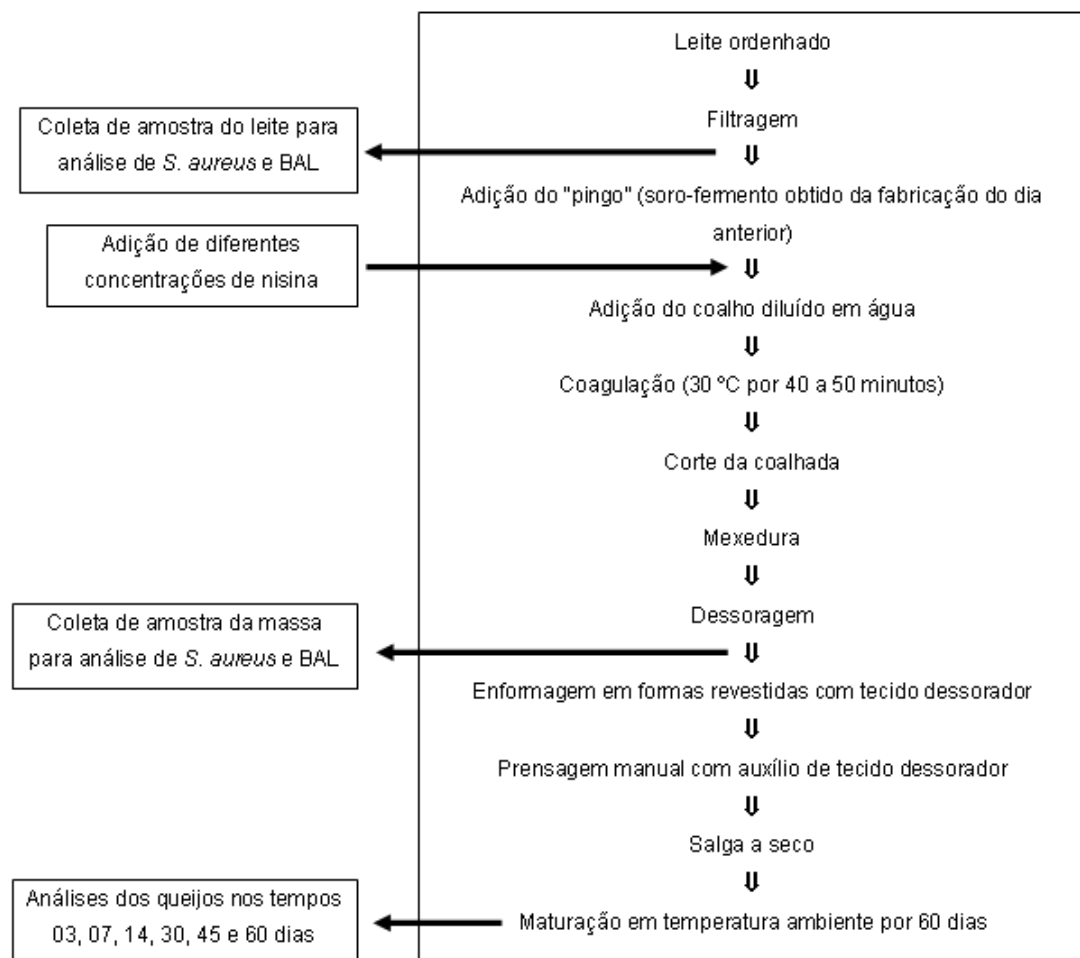


Figura 5 – Fluxograma de fabricação de queijo Minas artesanal Canastra com adição de nisina.

3.2.3.2. Análises microbiológicas do leite, da massa e do queijo

Foram realizadas análises de *S. aureus* e BAL do leite utilizado na fabricação dos queijos, bem como da massa, obtida após coagulação do leite pelo coalho e pelo fermento e dos queijos nos tempos 03, 07, 14, 30, 45 e 60 dias após a fabricação. Para análise de *S. aureus* utilizou-se Petrifilm™ 3M – *Petrifim Staph Express Count Plate* (STX) (AOAC 2003.08) e o disco reativo Petrifilm™ 3M – *Staph Express*, em casos se colônias suspeitas, para confirmação da espécie, segundo a metodologia descrita pelo fabricante.

As contagens de BAL foram conduzidas segundo metodologia descrita por Silva et al. (2010), utilizando-se ágar *deMan Rogosa & Sharpe* (MRS – Oxoid Ltd. Basingstoke, England), incubado em anaerobiose. Foram

selecionadas 5 colônias de cada placa para prova de catalase e coloração de Gram. Culturas Gram positivas (cocos ou bacilos) e catalase negativas foram consideradas BAL. O número de UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹ foi calculado em função do número de colônias confirmadas e da diluição inoculada.

Também foram feitas contagens de mesófilos aeróbios estritos e facultativos, enterobactérias, coliformes totais e *E. coli* de queijos nos tempos de fabricação supracitados utilizando, respectivamente, Petrifilm™ 3M – *Petrifim Aerobic Count Plate* (AC) (AOAC 990.12), Petrifilm™ 3M – *Enterobacteriaceae Count Plate* (EB) (AOAC 2003.01) e Petrifilm™ 3M – *E.coli/Coliformes Count Plate* (EC) (AOAC 991.14), de acordo com os procedimentos determinados pelo fabricante.

O preparo das amostras e as diluições necessárias foram feitas de conforme descrito na Instrução Normativa nº 62, de 18 de setembro de 2003 (BRASIL, 2003).

3.2.3.3. Obtenção dos isolados de *Staphylococcus* sp.

A obtenção de isolados de *Staphylococcus* sp. foi realizada conforme descrito no item 3.2.1.4, da Etapa 1.

3.2.3.4. Análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram realizadas análises de PCR de 25 isolados obtidos a partir das análises microbiológicas de enumeração de *S. aureus* dos queijos aos 14 dias de maturação, nesta etapa de teste *in loco*. Optou-se por esse tempo de maturação porque nele todos os queijos, de todas as propriedades apresentaram colônias de *S. aureus* nas placas de petrifilms.

O objetivo dessas análises foi a confirmação da espécie de *S. aureus* e a verificação da presença de genes que codificam para produção de enterotoxinas. Para isso, foram avaliadas quanto à presença do gene *femA*, presente em todas as espécies de *S. aureus*, e dos genes que codificam para a produção de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*).

As condições de realização da extração de DNA e das análises de PCR são as mesmas descritas anteriormente para a etapa 1, no item 3.2.1.5.

3.2.3.5. Análise de enterotoxinas dos queijos

A pesquisa de enterotoxinas foi realizada em 13 amostras de queijos, com e sem nisina, que demonstraram contagens de *S. aureus* nas análises microbiológicas do teste *in loco*, aos 03 e aos 14 dias de maturação. Foi utilizado o teste qualitativo imunoenzimático VIDAS Staphylococcal Enterotoxin II[®] (SET) (Bio Merieux, França), por meio da técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*), em equipamento específico Mini-VIDAS[®], segundo a metodologia descrita pelo fabricante para avaliação simultânea da presença de enterotoxinas dos tipos SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED e SEE. O protocolo de extração foi realizado por meio de concentração pelo ácido tricloroacético, conforme recomendado para queijos fabricados com leite cru, com intuito de aumentar as concentrações de toxinas em derivados lácteos e eliminar as interferências raramente encontradas nesses produtos.

3.2.3.6. Análises físico-químicas dos queijos

Foram realizadas análises de pH, a_w , umidade, gordura, cloretos, proteínas, índices de proteólise, perfil de textura e cálculo do teor de GES nos tempos 03, 07, 14, 30, 45 e 60 dias de maturação, além de RMF aos 03 dias de fabricação.

As condições de realização das análises físico-químicas estão descritas no item 3.2.1.6., da Etapa 1.

3.2.3.7. Análise de perfil de textura (TPA) dos queijos

A análise de perfil de textura (TPA) foi conduzida em equipamento universal de teste mecânico (Instron – Série 3367 Norwood, Massachusetts, USA). O procedimento utilizado foi o mesmo descrito por Pinto et al. (2011)

para queijo Minas artesanal do Serro, a saber: velocidade de pré-teste, de teste e pós-teste de 1 mm.s^{-1} , com distância de compressão de 40 % da altura da amostra. Foi utilizada uma probe cilíndrica de 55 mm de diâmetro e uma célula de carga de 1 KN, movida perpendicularmente sobre a amostra de queijo de formato cilíndrico com 25 mm de diâmetro e 35mm de altura retiradas aleatoriamente das peças de queijos. A força exercida sobre a probe foi automaticamente captada e os parâmetros firmeza (N), fraturabilidade (N), gomosidade (N), mastigabilidade (N), adesividade (N), elasticidade (mm) e coesividade calculados automaticamente pelo software Blue Hill 2.0 (Instron – Norwood, Massachusetts, USA), a partir da curva de força (N) x tempo (s) gerados durante o teste.

3.3. Delineamento estatístico

O experimento foi conduzido em esquema fatorial, com três repetições, representadas por cada uma das propriedades, três tratamentos (0, 100 e 500 UI.mL⁻¹ de nisina) e 6 tempos de maturação (03, 07, 14, 30, 45 e 60 dias). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa MINITAB, versão 14 (MINITAB™ *STATISTICAL SOFTWARE*, 2003), sendo os resultados submetidos ao Teste de Normalidade de Ryan-Joiner ($P < 0,05$), análise de variância (ANOVA), Teste de Kruskal-Wallis (para dados não paramétricos), comparação de médias pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$) e análise de regressão, de acordo com a necessidade. As contagens de bactérias foram convertidas em \log_{10} para análise estatística dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Etapa 1: Avaliação preliminar de queijos Minas artesanais Canastra, isolamento de *Staphylococcus aureus* e identificação de genes que codificam para produção de enterotoxinas clássicas

4.1.1. Enumeração de *Staphylococcus aureus* dos queijos

Os resultados das contagens de *S. aureus* dos queijos avaliados na primeira etapa do estudo estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores médios dos logaritmos decimais das contagens de *S. aureus* nas 05 unidades produtoras.

Tempo (dias)	Média	LI	LS	DP	CV (%)
03	4,58	3,00	5,78	1,06	23,14
07	3,99	2,30	6,04	1,38	34,58
14	4,37	2,30	6,23	1,43	32,72
30	1,42	<1,00*	3,08	0,93	65,49
60	<1,00*	<1,00*	<1,00*	0,00	0,00

LI = limite inferior; LS = limite superior; DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação

* Não detectado pela técnica empregada

É possível verificar na Tabela 7 que existe uma grande variação nas contagens de *S. aureus* entre as unidades produtoras avaliadas. A população de *S. aureus* em queijos Minas artesanais é influenciada pela contagem inicial do leite que, por sua vez, sofre influência da condição de saúde da glândula mamária do animal e das condições de higiene de sua obtenção. A contaminação durante a manipulação também interfere nessas contagens (BALABAN e RASOOLY, 2000; FEITOSA et al., 2003; KWOK e CHOW, 2003; PINTO et al., 2005b; STAMFORD et al., 2006; PELES et al., 2007; BORGES et al., 2008b; MARTINS et al., 2010), bem como a temperatura de estocagem do leite e as condições tecnológicas. Também podem haver diferenças nos reservatórios ou origem das estirpes (ERTAS et al., 2010), além das próprias alterações físico-químicas dos queijos durante a maturação e a microbiota competidora interferirem no comportamento de *S. aureus* (TORNADIJO et al., 2001).

A Figura 6 mostra a grande variação das contagens de *S. aureus* verificada entre as propriedades nesta primeira etapa.

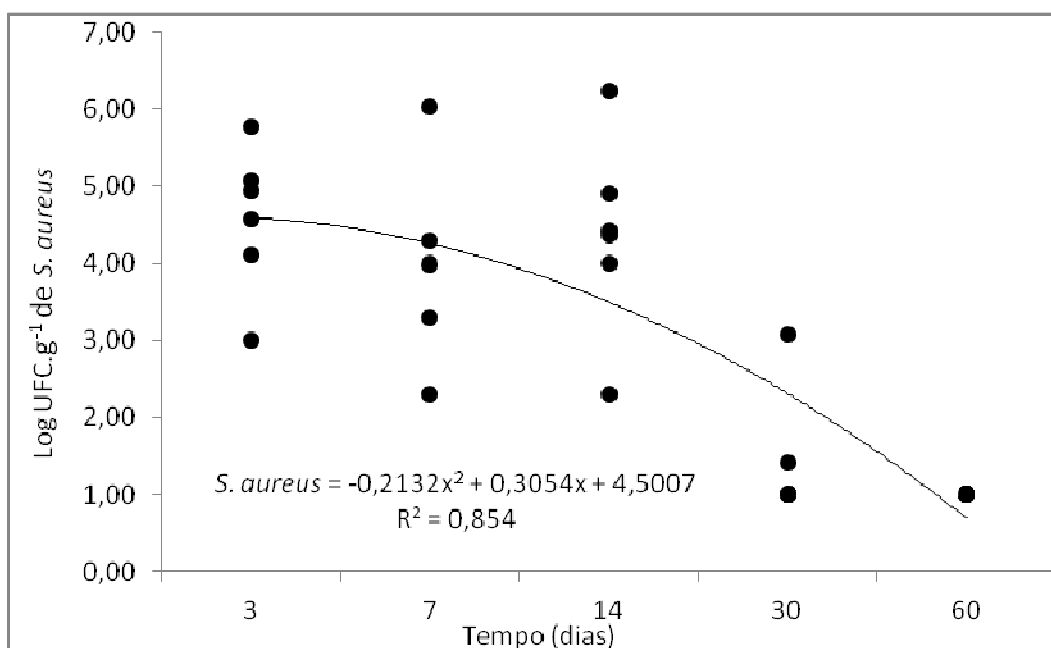


Figura 6 – Comportamento de *S. aureus* durante o período de maturação (60 dias) do queijo Minas artesanal Canastra nas 05 propriedades avaliadas.

As legislações Estadual (MINAS GERAIS, 2008) e Federal (BRASIL, 1996; BRASIL 2001) determinam contagens máximas de 10^3 UFC.g⁻¹ de Estafilococos coagulase positiva em queijos, referentes à classificação de média umidade, que corresponde a 3 log UFC.g⁻¹. Aos 03 dias, os queijos já atendiam à classificação de média umidade, conforme estabelecido pela legislação (MINAS GERAIS, 2008), porém, as contagens de *S. aureus* ainda permaneciam elevadas, sendo reduzidas somente aos 30 dias de maturação.

Todos os produtores atenderam aos padrões legais ao final dos 60 dias de maturação, prazo mínimo exigido por Brasil (1996) para comercialização de queijo elaborado com leite cru, pois não apresentavam contagens de *S. aureus* em níveis possíveis de serem detectados pela técnica utilizada. Verifica-se que esse prazo poderia ser reduzido para 30 dias, tempo em que todos os queijos atenderam à legislação, se os produtores fossem certificados oficialmente como livres de tuberculose e

brucelose, tivessem implementados programas de controle de mastite e boas práticas de produção e fabricação e garantissem a potabilidade da água utilizada, segundo a Instrução Normativa nº 57 de 2011 (BRASIL, 2011). É importante destacar que foram realizadas somente análises de *S. aureus*, não sendo avaliados os demais parâmetros microbiológicos.

Diferente do verificado neste trabalho, Dores (2007) encontrou contagens de *S. aureus* acima do indicado pela legislação até os 22 dias de maturação de queijo Minas artesanal Canastra, em temperatura ambiente. Esses resultados demonstram que é difícil determinar um prazo para que os queijos artesanais estejam adequados à legislação quanto às contagens de micro-organismos e que talvez não seja prudente fazê-lo, pois pode-se incorrer em erro. Isso se justifica pelo fato de que os queijos se comportam de formas diferentes, dependendo de sua microbiota e das características físico-químicas que, por sua vez, são influenciadas pela matéria-prima, suas condições de obtenção, de fabricação, incluindo as quantidades de ingredientes e maturação.

Somente 02 produtores apresentaram contagens inferiores a 10^5 UFC.g⁻¹ em todo período de maturação, valor acima do qual é considerado crítico para produção de enterotoxinas (FDA, 1992; FORSYTHE, 2002; BHATIA e ZAHOR, 2007; AKINEDEN et al. 2008; PELISSER et al., 2009; DELBES-PAUS et al., 2010; SANTANA et al., 2010; SILVA et al., 2010), embora haja relatos de produção em alimentos com contagens menores (MEYRAND et al., 1998).

Fonseca et al. (2005b) avaliando queijos Minas artesanais detectaram *S. aureus* coagulase positiva em 50% das amostras, em níveis superiores a 10^7 UFC.g⁻¹. Lima (2005) analisando queijos de coalho artesanais verificou 100% das amostras com contagens de *Staphylococcus* sp, sendo que 69% possuíam *Staphylococcus* coagulase positiva em contagens que variaram de 10^4 a 10^7 UFC.g⁻¹.

4.1.2. Análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das culturas de *Staphylococcus aureus*

Um total de 14 isolados de *Staphylococcus* sp. dos queijos Minas artesanal Canastra das 05 propriedades foi testado por meio de PCR para confirmação da espécie *S. aureus*, bem como para presença de genes que codificam a produção de enterotoxinas clássicas. Todos apresentaram, ao microscópio, morfologia, arranjo e coloração característicos da espécie, além de positivos para catalase e termonuclease e resistentes à acriflavina.

A Figura 7 mostra o gel de agarose de produtos amplificados de PCR de estirpes de referência de *S. aureus*, com os *primers* utilizados para confirmação da espécie (*femA*) e da presença ou ausência de genes que codificam para a produção de enterotoxinas (*sea* - *see*).

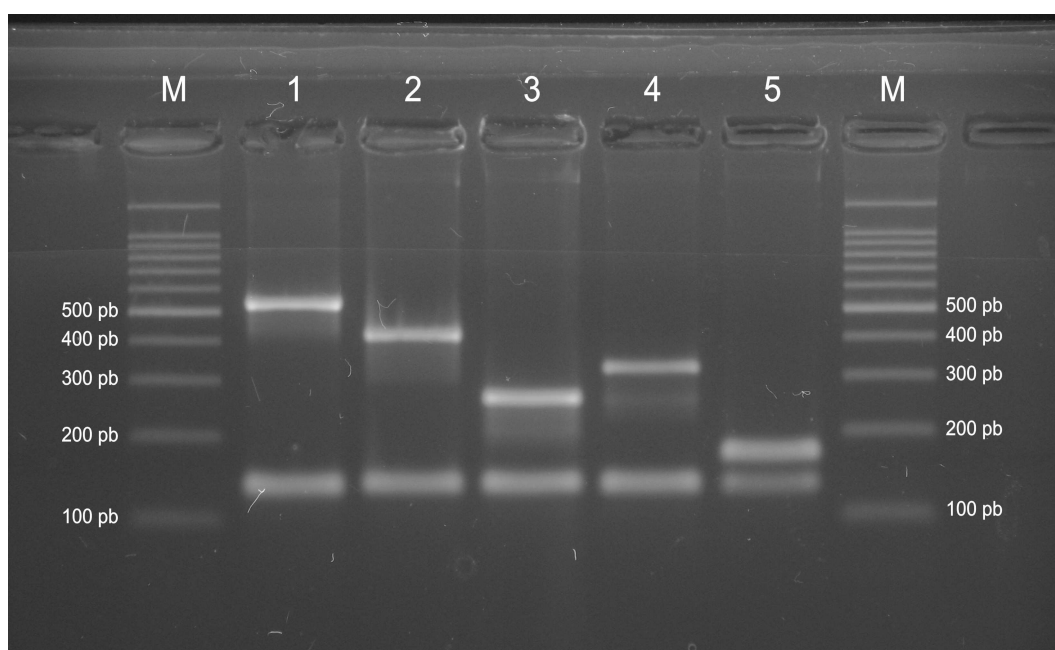


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose de produtos amplificados de PCR de estirpes de referência de *S. aureus*. Todas as estirpes são positivas para o gene *femA* (132 pb). (M) Marcadores escala de 100 pb de DNA (Finnzymes); (1) *S. aureus* FRI 100 (*sea* – 544 pb); (2) *S. aureus* ATCC 14458 (*seb* – 416 pb); (3) *S. aureus* ATCC 19095 (*sec* – 257 pb); (4) *S. aureus* FRI 472 (*sed* – 317 pb); (5) *S. aureus* FRI 326 (*see* – 170 pb).

O gel de agarose de produtos amplificados de PCR de alguns isolados de *S. aureus* desta primeira etapa, com os *primers* utilizados para confirmação da espécie e da presença ou ausência de genes que codificam para a produção de enterotoxinas está apresentado mais adiante na Figura 28.

A Tabela 8 mostra as culturas isoladas e seus genes *femA* e enterotoxigênicos (*sea a see*).

Tabela 8 – Genes detectados nos 14 isolados de *S. aureus* obtidos de queijo Minas artesanal Canastra desta primeira etapa.

Identificação do Isolado	Resultados para os genes					
	<i>femA</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>
2	+	+	-	-	-	+
3	+	+	-	-	-	+
5	+	+	+	-	-	+
7	+	+	-	-	-	+
8	+	+	-	-	-	+
9	+	+	-	-	-	+
11	+	+	-	-	-	-
12	+	+	+	-	-	+
13	+	+	-	-	-	+
14	+	+	-	-	-	-
17	+	+	-	-	-	+
18	+	+	-	-	-	+
41	+	+	-	-	-	+
42	+	+	-	-	-	+

(+) = indica presença dos genes nos isolados

(-) = indica ausência dos genes nos isolados

Todos os isolados apresentaram gene *femA*, indicando que pertenciam à espécie *S. aureus* (MEHROTRA et al., 2000). Nesta etapa, os genes enterotoxigênicos mais frequentes foram aqueles que codificam para produção de SEA e SEE. Todos os isolados foram positivos para genes que codificam para produção de SEA (100%), seguidos pelos genes da enterotoxina SEE, presentes em 12 culturas (86%). Essa mesma porcentagem de isolados possuíam 2 ou 3 genes de enterotoxinas diferentes. Apenas 02 isolados apresentaram gene para SEB e nenhum apresentou genes para SEC e SED.

Vários fatores interferem na distribuição de *S. aureus* enterotoxigênicos como as variações geográficas (MORANDI et al., 2007),

os reservatórios ou origem das estirpes, a sensibilidade dos métodos de detecção, os genes detectados, o número e o tipo de amostras avaliadas (ERTAS et al., 2010).

Os resultados das análises de PCR serão discutidos mais adiante, quando também serão tratados os dados obtidos na 3ª etapa desta pesquisa.

4.1.3. Características físico-químicas dos queijos

Os resultados das análises físico-químicas dos queijos avaliados na primeira etapa do estudo estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores médios dos resultados das análises físico-químicas dos queijos Minas artesanais Canastra coletados em 05 unidades produtoras.

Variáveis	Valores Médios ± DP				
	Tempo (dias)				
	03	07	14	30	60
pH	5,10 ± 0,15	4,96 ± 0,10	5,17 ± 0,08	4,99 ± 0,20	5,21 ± 0,14
Aw	0,96 ± 0,01	0,96 ± 0,01	0,91 ± 0,02	0,90 ± 0,03	0,89 ± 0,02
Umidade (% m/m)	43,74 ± 3,54	37,26 ± 3,38	32,29 ± 3,45	27,49 ± 4,09	24,22 ± 3,00
Gordura (% m/m)	27,6 ± 3,05	30,3 ± 3,23	35,00 ± 3,81	36,80 ± 3,96	37,20 ± 1,30
GES (% m/m)	48,98 ± 3,06	48,23 ± 3,62	51,58 ± 3,26	50,64 ± 3,02	49,13 ± 1,86
Cloretos (% m/m)	1,02 ± 0,53	1,37 ± 0,37	1,60 ± 0,48	1,61 ± 0,62	1,70 ± 0,41
RMF (% m/m)	3,56 ± 0,59	4,28 ± 0,60	4,37 ± 0,50	4,47 ± 0,50	4,83 ± 0,55
Proteína (% m/m)	24,78 ± 1,45	29,93 ± 1,32	32,19 ± 0,66	34,16 ± 0,49	36,12 ± 2,18
NS_{pH4,6}/NT (%)	6,94 ± 0,84	8,76 ± 1,48	13,84 ± 4,08	18,06 ± 4,57	26,27 ± 5,11
NS_{TCA12%}/NT (%)	4,07 ± 0,35	5,75 ± 1,66	10,99 ± 2,25	13,09 ± 3,39	17,28 ± 4,46

DP = Desvio-Padrão

Não há padronização das tecnologias de fabricação dos queijos Minas artesanais Canastra, por esse motivo, segundo Dores (2007), a similaridade desses queijos é baixa, mesmo quando maturados sob as mesmas condições. Isso ocorre devido às diferenças na composição e qualidade do leite, nas dosagens de ingredientes (pingo, sal e coalho), no tempo de coagulação, no corte da massa, dentre outros.

O pH variou pouco durante a maturação dos queijos, situando-se entre 4,96 e 5,21. Reis (1998) e Vargas et al. (1998) encontraram valores de 5,35 e 5,6, respectivamente. Dores (2007) não verificou diferença significativa de pH ao longo dos 60 dias de maturação de queijos artesanais Canastra, valor este situado em torno de 5,0, semelhante ao verificado no presente trabalho.

Os teores de umidade diminuíram durante o período de maturação dos queijos devido à evaporação, visto que os mesmos são maturados sem embalagem, à temperatura ambiente e em câmara ventilada. A legislação Federal (BRASIL, 1996) classifica os queijos segundo seu teor de umidade em muito alta umidade (maior que 55 % m/m), alta umidade (46 % a 54,9 % m/m), média umidade (36 % a 45,9 % m/m) e baixa umidade (até 35,9 % m/m).

Alguns estudos classificaram os queijos Minas artesanais como alta e média umidade (REIS 1998; VARGAS et al., 1998), embora por lei, devam apresentar até 45,9 % (m/m) de umidade, ou seja, média umidade (MINAS GERAIS, 2008). Paiva (2012) registrou teores de umidade abaixo de 35,9 % (m/m) em queijos Minas artesanal Canastra após 30 dias de maturação, sendo, neste caso, classificados como de baixa umidade. No presente trabalho, os teores de umidade dos queijos atenderam às exigências legais da classificação de média umidade e, após 14 dias de maturação, o teor de umidade reduziu para a faixa considerada de baixa umidade.

A a_w também reduziu com o tempo de maturação dos queijos, influenciada pela perda da umidade, com desidratação e concentração de cloretos (NARDES, 2002) e, conseqüentemente, aumento de sólidos não gordurosos (DORES, 2007), além da proteólise com aumento de nitrogênio solúvel, nitrogênio não protéico e de ácidos graxos livres (FURTADO, 1991).

O teor médio de gordura apresentou aumento durante o período de maturação, em função da redução do teor de umidade. A Portaria nº 146 de 1996 (BRASIL, 1996) classifica os queijos segundo o teor de GES em extra gordo ou duplo creme (mínimo de 60% m/m), gordo (45 a 59,9 % m/m), semi-gordo (25 a 44,9 % m/m), magro (10 a 24 % m/m) e desnatado (menor que 10 % m/m). Por outro lado, a Lei 14.185 de 2002 (MINAS GERAIS, 2002b) não estabelece padrões de teor de gordura para queijos artesanais.

Isso ocorre em virtude da utilização de leite integral na fabricação, podendo ocorrer variação entre os produtores, visto que a gordura é um dos componentes que mais sofre alteração, influenciada pela alimentação animal, estação do ano e outros fatores.

Neste trabalho, conforme a classificação estabelecida por Brasil (1996), os queijos analisados nesta primeira etapa podem ser classificados como gordos devido ao teor de GES situado entre 45 a 59,9 % (m/m). Paiva (2012), Dores (2007), Reis (1998) e Vargas et al. (1998) encontraram resultados semelhantes para teores de GES de queijos Minas artesanais Canastra maturados em temperatura ambiente.

O teor de cloretos nos queijos aumentou durante a maturação devido à concentração de sólidos (NARDES, 2002). Não há padronização da quantidade de sal adicionada durante a salga, nem do tempo de duração dessa etapa, desta forma, Reis (1998) e Vargas et al. (1998) encontraram, respectivamente, valores de 2,4 e 3,05 % (m/m), superiores ao verificado neste trabalho (1,02 a 1,70 %).

Os valores médios de proteína total aumentaram durante o período de maturação devido à perda de umidade dos queijos e consequente concentração de sólidos totais. Dores (2007) obteve valores semelhantes de proteína em seu estudo com queijos Minas artesanais Canastra.

A relação de % de $NS_{pH4,6}/NT$ (extensão de proteólise) e de $NS_{TCA\ 12\%}/NT$ (profundidade de proteólise) relacionam-se com o processo de maturação e, conforme esperado, também apresentaram aumento com o decorrer do tempo. A proteólise é importante, pois permite a modificação da textura e o desenvolvimento das propriedades sensoriais ideais e características de cada tipo de queijo (SOUSA et al., 2001).

4.2. Etapa 2: Efeito antagônico *in vitro* da adição de nisina sobre a multiplicação de *Staphylococcus aureus*

O efeito de diferentes concentrações de nisina sobre a contagem de *S. aureus* em LDR está apresentado na Figura 8.

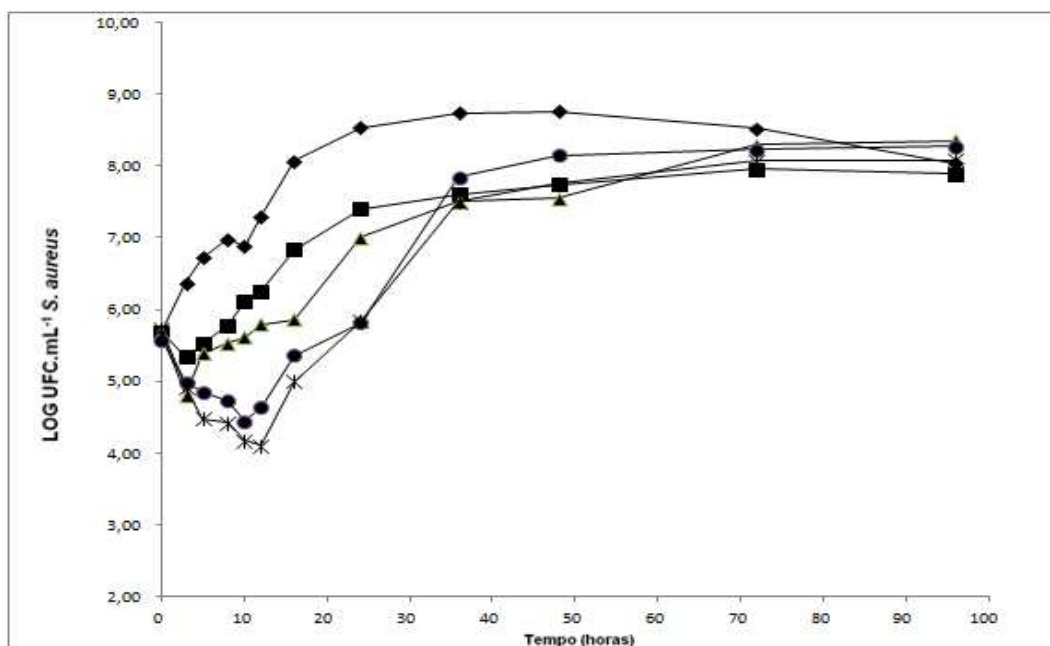


Figura 8 – Efeito de diferentes doses de nisina em LDR 12 % sobre as contagens de *S. aureus*: (◆) 0, (■) 100 UI.mL⁻¹; (▲) 200 UI.mL⁻¹; (●) 400 UI.mL⁻¹; e (x) 500 UI.mL⁻¹.

É possível verificar na Figura 8, por meio das curvas de crescimento de *S. aureus* referentes às doses de 100 e 200 UI.mL⁻¹ de nisina, que esse micro-organismo apresentou fase Log a partir de três horas após a inoculação, diferentemente do controle cuja fase Log foi iniciada imediatamente. As fases Log das curvas de crescimento de *S. aureus* correspondentes às doses de 400 e 500 UI.mL⁻¹ de nisina ocorreram somente após 10 e 12 horas de incubação, respectivamente.

Pode ser observado também que todas as doses de nisina ocasionaram em níveis mais baixos de contagens quando comparado ao grupo-controle. Nisina apresentou efeito bactericida sobre *S. aureus* nas primeiras 10 h e 12 h de incubação quando foram utilizadas as doses 400 e 500 UI.mL⁻¹, respectivamente.

A Tabela 10 mostra as contagens iniciais, finais, mínimas e máximas de *S. aureus*, segundo as diferentes doses de nisinas.

Tabela 10 – Valores logarítmicos médios das contagens iniciais, finais, mínimas e máximas de *S. aureus* em LDR 12 % sem nisina e adicionado de 100, 200, 400 e 500 UI.mL⁻¹ de nisina.

Tratamentos (Nisina)	Contagem Inicial	Contagem Final	Contagem Mínima (tempo)	Contagem Máxima (tempo)
	Log₁₀ UFC.mL⁻¹ <i>S. aureus</i>			
0 UI.mL ⁻¹	5,70	8,10	5,70 (0 hora)	8,75 (48 horas)
100 UI.mL ⁻¹	5,69	7,88	5,34 (3 horas)	7,95 (72 horas)
200 UI.mL ⁻¹	5,68	8,34	4,81 (3 horas)	8,34 (96 horas)
400 UI.mL ⁻¹	5,57	8,81	4,44 (10 horas)	8,81 (96 horas)
500 UI.mL ⁻¹	5,72	8,08	4,10 (12 horas)	8,08 (96 horas)

Pinto (2008) testou diferentes concentrações de nisina (0, 100, 200, 400 e 500 UI.mL⁻¹), adicionadas ao LDR 12 % sobre estirpe de referência de *S. aureus* (ATCC 6538) observando um efeito bactericida quando utilizadas as doses 400 e 500 UI.mL⁻¹ nas primeiras 48 h de incubação. O tempo para que as contagens atingissem o maior nível e as concentrações máximas de *S. aureus* foram inversamente proporcionais à dose de nisina empregada. O autor concluiu que a nisina foi eficiente no controle deste micro-organismo em leite.

Em estudo realizado por García et al. (2010) foram testados dois níveis de *S. aureus* no leite pasteurizado (10² UFC. mL⁻¹ e 10⁵ UFC. mL⁻¹). A adição de nisina foi capaz de inibir a multiplicação de *S. aureus* no leite mantendo a mesma contagem inicial ao final de 8 horas de incubação.

Arqués et al. (2011) avaliaram a atividade inibidora de nisina contra patógenos no leite incubado a 37 °C. Após 4 h de incubação a nisina levou a uma redução de 4,68 log UFC.mL⁻¹ de *S. aureus* quando comparada ao controle. A partir de 24 h, *S. aureus* reiniciou a multiplicação, após a atividade bactericida inicial da nisina, fato atribuído à presença de células resistentes, finalizando com diferença de apenas 0,37 log UFC.mL⁻¹ mais baixa do que o leite controle.

No presente trabalho, a análise estatística indicou que não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre as doses de nisina na concentração de 100 e 200 UI.mL⁻¹ ao longo da incubação, porém, apresentaram-se

diferentes estatisticamente ($P < 0,05$) do controle. O tratamento com 500 UI.mL⁻¹ de nisina apresentou diferença significativa quando comparado aos demais ($P < 0,05$), com maior efeito bactericida. Dessa forma, entre as concentrações de 100 e 200 UI.mL⁻¹ optou-se pela menor, pelo fato de ser mais interessante em termos de custo para o produtor, apesar da possibilidade de haver interferência da matriz do queijo, pois também seria testada uma concentração maior. A segunda dose escolhida foi de 500 UI.mL⁻¹ por ter apresentado maior efeito bactericida, diferindo significativamente da dose de 400 UI.mL⁻¹ ($P < 0,05$).

4.3. Etapa 3: Estudo *in loco* da adição de nisina ao processo de fabricação do queijo Minas artesanal Canastra

4.3.1. Efeito do uso de nisina na composição físico-química de queijo Minas artesanal Canastra

4.3.1.1. Composição centesimal dos queijos

A análise de variância não indicou efeito significativo de tratamento, nem interação entre os fatores tratamentos (doses de nisina) e tempos de maturação ($P \geq 0,05$) para o teor de umidade dos queijos Minas artesanais Canastra, porém, houve efeito significativo de tempo, isoladamente ($P < 0,01$).

A análise de regressão indicou que, conforme esperado, houve efeito significativo de tempo ($P < 0,01$), com tendência de decréscimo ao longo da maturação para todos os tratamentos.

A Figura 9 mostra a evolução do teor de umidade em função dos tempos de maturação para o queijo Minas artesanal Canastra.

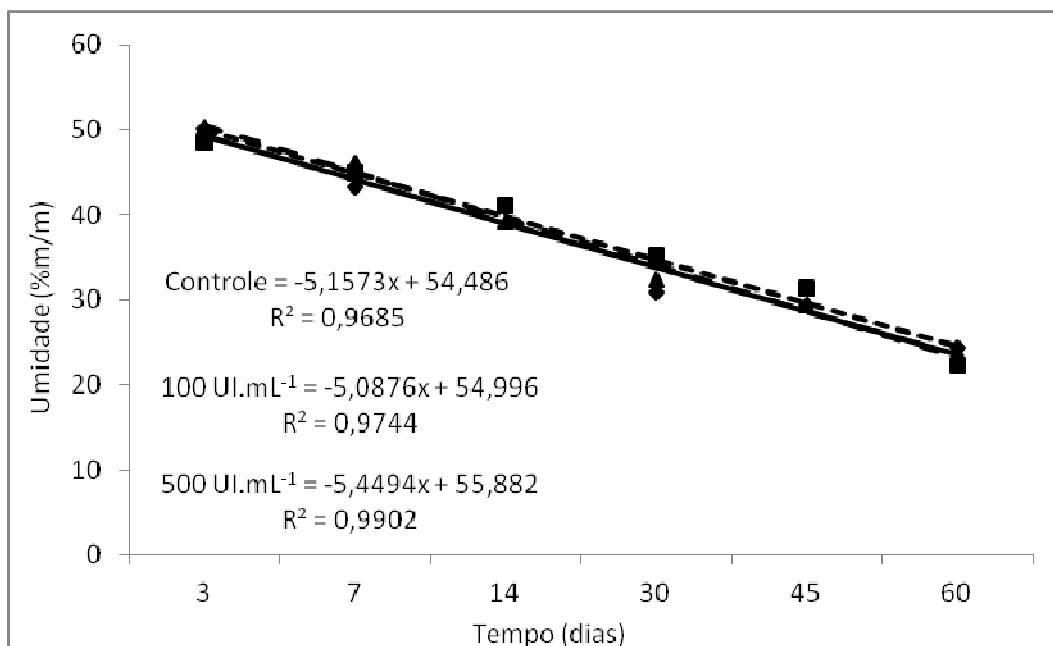


Figura 9 – Evolução do teor de umidade ao longo da maturação (60 dias) de queijos Minas artesanal Canastra, fabricado com diferentes concentrações de nisina: (♦ —) 0; (■ ----) 100 UI.mL⁻¹ e (▲ - - -) 500 UI.mL⁻¹.

Os teores de umidade dos queijos verificados neste trabalho não foram influenciados pelos tratamentos com nisina. A legislação mineira (MINAS GERAIS, 2008) determina que o queijo Minas artesanal Canastra deve apresentar entre 36 % e 45,9 % (m/m) de umidade, ou seja, média umidade. Os queijos atenderam a essa especificação aos 07 dias de maturação e, a partir de 30 dias, apresentaram-se com teor de umidade relativo à classificação de baixa umidade (até 35,9 % m/m), conforme definido por Brasil (1996).

O teor de gordura, de acordo com a análise de variância, não apresentou efeito significativo de tratamento, nem interação entre os fatores tratamentos (doses de nisina) e tempos de maturação ($P \geq 0,05$), porém, houve efeito significativo de tempo, isoladamente ($P < 0,01$).

A análise de regressão indicou que houve efeito significativo de tempo ($P < 0,01$) apresentando tendência de aumento do teor de gordura ao longo do tempo de maturação para todos os tratamentos.

Na Figura 10 encontram-se os resultados da evolução do teor de gordura em função dos tempos de maturação para o queijo Minas artesanal Canastra.

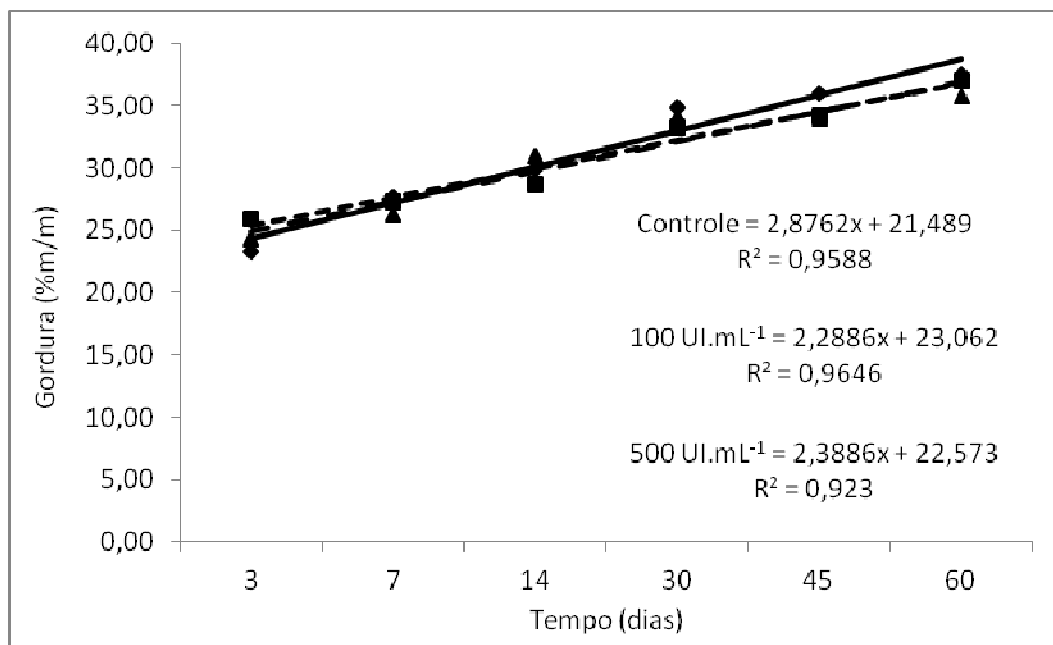


Figura 10 – Evolução do teor de gordura ao longo da maturação (60 dias) de queijos Minas artesanal Canastra, fabricado com diferentes concentrações de nisina: (♦ —) 0; (■ ---) 100 UI.mL⁻¹ e (▲ - - -) 500 UI.mL⁻¹.

Não houve diferença entre os tratamentos indicando que a nisina não interferiu no teor de gordura dos queijos Minas artesanais Canastra. Pinto et al. (2011) também não verificaram influência da adição de nisina (100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹) sobre o teor de gordura em queijos Minas artesanais do Serro.

Para o teor de GES, a análise de variância não detectou efeito significativo de tratamento, tempo ou interação entre os fatores ($P \geq 0,05$). Este fato já era esperado visto que não foram encontrados efeitos de tratamento para umidade e gordura, além disso, o GES tende a não variar em função do tempo.

A classificação quanto ao teor de gordura, assim como na primeira etapa, conforme Brasil (1996), foi de queijo gordo (GES entre 45 e 59,9 % m/m) para todos os tratamentos, com valores médios de 49,34%, 49,48% e

48,97% para os queijos controle e tratados com 100 UI.mL^{-1} e 500 UI.mL^{-1} de nisina, respectivamente. A legislação mineira não define o teor de gordura para queijos Minas artesanal (MINAS GERAIS, 2008).

A análise de variância não detectou diferença significativa de tratamento, tempo ou interação entre esses fatores ($P \geq 0,05$) para os teores de cloretos. No entanto, a análise de regressão indicou que houve efeito significativo de tempo com tendência consistente e significativa ($P < 0,05$) de aumento ao longo do período de maturação, para todos os tratamentos.

A Figura 11 mostra os resultados da evolução do teor de cloretos em função dos tempos de maturação para o queijo Minas artesanal Canastra.

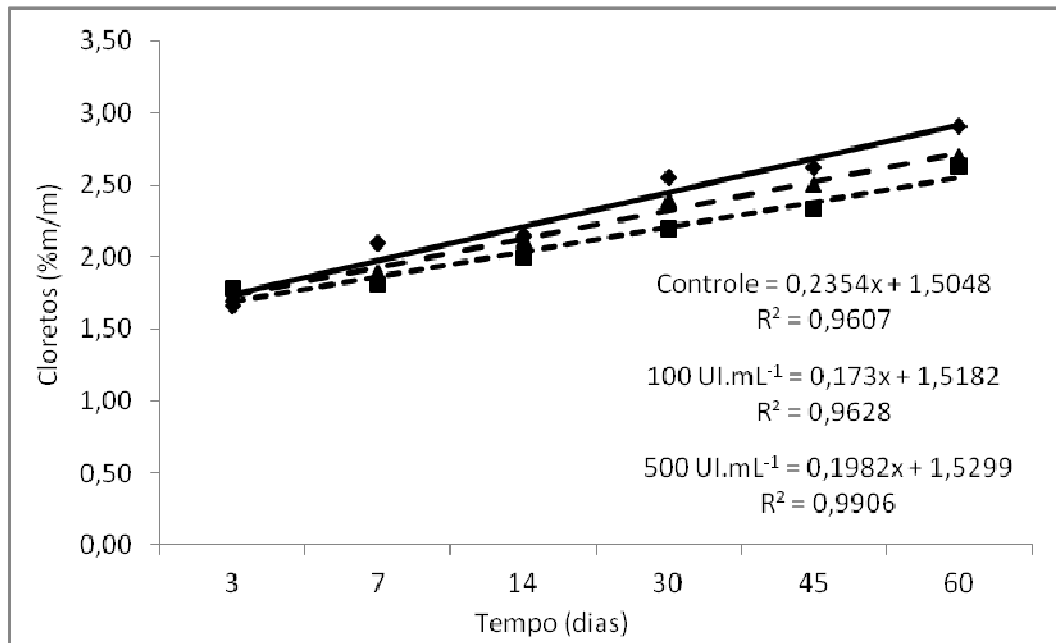


Figura 11 – Evolução do teor de cloretos ao longo da maturação (60 dias) de queijos Minas artesanal Canastra, fabricado com diferentes concentrações de nisina: (◆ —) 0; (■ ---) 100 UI.mL^{-1} e (▲ - - -) 500 UI.mL^{-1} .

O teor de cloretos nos queijos aumentou durante a maturação devido à perda de umidade com consequente concentração de sólidos (NARDES, 2002). Os tratamentos com nisina não influenciaram a quantidade de cloretos dos queijos. A salga é feita manualmente, de forma artesanal, diretamente na superfície do queijo e sem quantidade de sal e tempo definidos. O teor de cloretos também varia com o tipo de salga e com o teor

de umidade, pois, quanto maior a umidade, maior a absorção e difusão de sal na massa (FURTADO, 1991).

A análise de Kruskal-Wallis realizada para o teor protéico dos queijos Minas artesanais Canastra demonstrou que não houve efeito significativo de tratamento ($P \geq 0,05$), ou seja, as diferentes concentrações de nisina não influenciaram no teor de proteína dos queijos. Por outro lado, houve efeito significativo de tempo ($P < 0,05$), tendo a análise de regressão constatado tendência crescente significativa ($P < 0,01$) em função do tempo, conforme demonstrado na Figura 12.

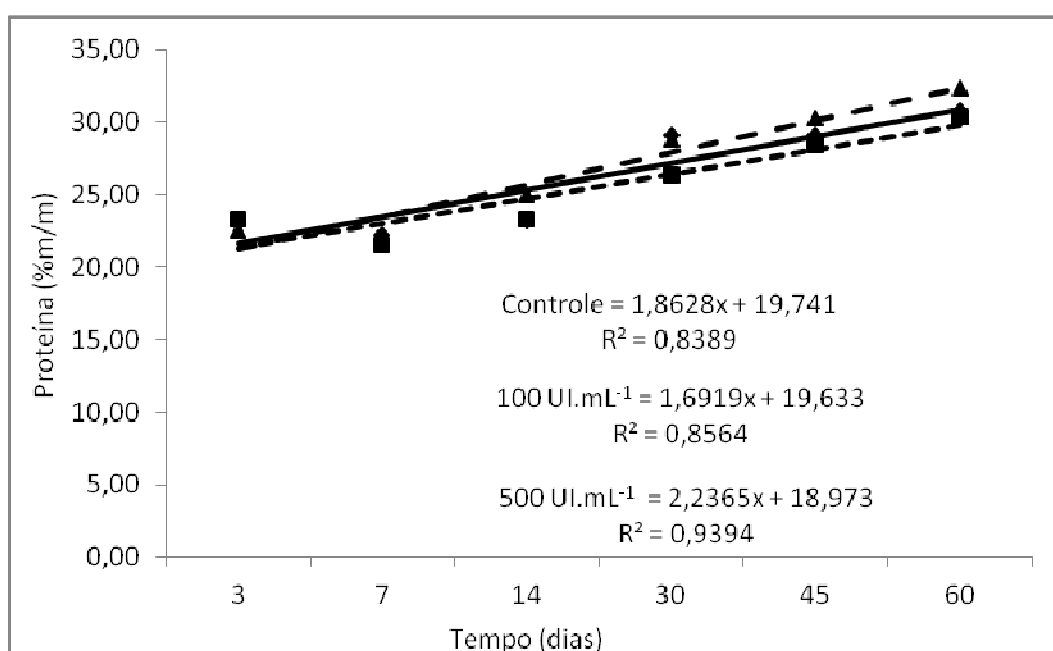


Figura 12 – Evolução do teor de proteína ao longo da maturação (60 dias) de queijos Minas artesanal Canastra, fabricado com diferentes concentrações de nisina: (♦ —) 0; (■ ---) 100 UI.mL⁻¹ e (▲ - - -) 500 UI.mL⁻¹.

A análise de RMF foi realizada somente aos 03 dias de maturação e apresentou como média para os tratamentos controle, 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina, respectivamente, 4,07 % (m/m), 3,90 % (m/m) e 4,06 % (m/m). Não foi verificado efeito significativo de tratamento ($P \geq 0,05$), não havendo influência da adição de nisina sobre esse parâmetro.

4.3.1.2. pH dos queijos

A análise de Kruskal-Wallis realizada para os valores de pH dos queijos Minas artesanais Canastra nos tratamentos estudados demonstrou que não houve efeito significativo de tempo ($P \geq 0,05$). A análise de regressão também não constatou tendência significativa de pH em função do tempo. Porém, para os tratamentos diferenças foram encontradas ($P < 0,05$). Os queijos adicionados de 500 UI.mL⁻¹ de nisina superaram o controle e o tratamento com 100 UI.mL⁻¹, sendo que estes não diferiram entre si ($P \geq 0,05$), conforme apresentado na Figura 13.

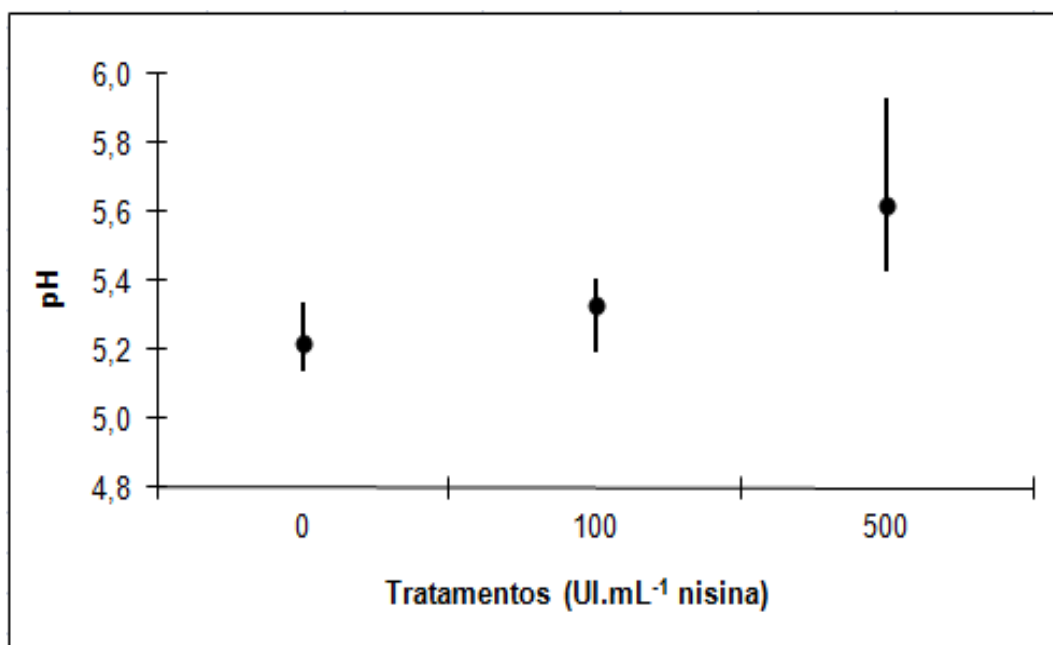


Figura 13 – Intervalos de pH dos queijos Minas artesanais Canastra sem nisina (controle) e adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina para todos os tempos de maturação (60 dias).

Dores (2007) também não verificou diferença significativa de pH ao longo dos 60 dias de maturação de queijos artesanais Canastra, valor este situado em torno de 5,0.

Diferente do ocorrido neste trabalho, Al-Holy et al. (2012) não verificaram variação significativa de pH quando utilizaram doses de nisina de 500, 1.000 e 1.500 UI.mL⁻¹ em queijo branco fresco, no entanto, as análises

foram realizadas somente até os 12 dias de armazenamento sob refrigeração.

Pinto et al. (2011) também não encontraram diferença em função das concentrações de 0, 100 e 500 UI.mL⁻¹ de nisina. Diferença significativa dos valores de pH foram observadas somente em função do tempo (60 dias) de maturação de queijos Minas artesanais do Serro.

O pH pode ser influenciado por reações enzimáticas e metabólicas de micro-organismos que se desenvolvem durante o período de maturação (DORES, 2007). As contagens de BAL na massa adicionada de 500 UI.mL⁻¹ de nisina foram significativamente menores que os demais tratamentos. Este fato pode ter contribuído para a maior média de pH de queijos desse mesmo tratamento.

O queijo Minas artesanal Canastra é fabricado utilizando-se soro-fermento (pingo) que auxilia no processo de acidificação da massa. A função primária da cultura *starter* é a produção de ácido láctico a partir de lactose (FURTADO, 2005). Além disso, as bactérias ácido lácticas não provenientes do fermento (NSLAB) também podem reduzir o pH dos queijos à partir de resíduos de lactose resultante da fermentação ou ainda o citrato, utilizado por algumas espécies (FOX et al., 2000).

Além da variação da microbiota normal do queijo, outros fatores podem contribuir para o aumento do pH como a presença de produtos da proteólise ao final da maturação (FOX et al., 2000). A degradação de proteínas com formação de compostos nitrogenados alcalinos e a desaminação e descarboxilação de aminoácidos colaboram para a elevação gradual do pH durante a maturação (SOUSA et al., 2001).

4.3.1.3. Atividade de água dos queijos

A análise de Kruskal-Wallis realizada para os valores de a_w verificados para os queijos Minas artesanais Canastra demonstrou que não houve efeito significativo de tratamento ($P \geq 0,05$). Porém, para o fator tempo diferenças foram encontradas ($P < 0,05$) e a análise de regressão constatou tendência significativa de redução ($P < 0,01$) da a_w para os diferentes tratamentos em função do tempo de maturação.

Valores de a_w dos queijos de cada tratamento em função do tempo de maturação estão apresentados na Figura 14.

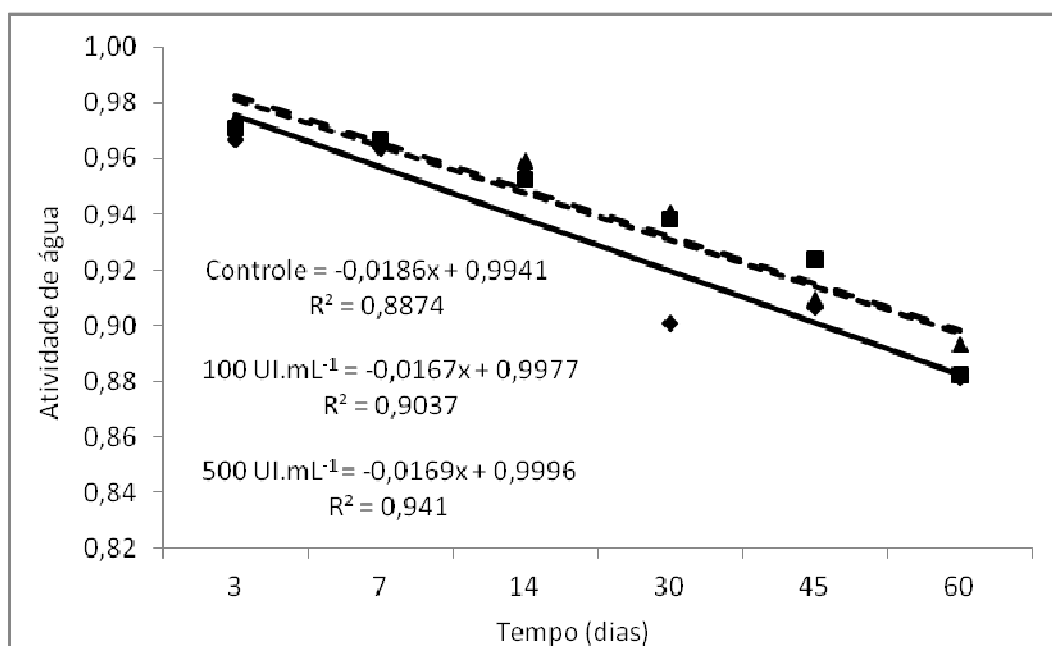


Figura 14 – Evolução da atividade de água de queijos Minas artesanais Canastra ao longo do período de maturação (60 dias), fabricado com diferentes concentrações de nisina: (◆ —) 0; (■ ----) 100 UI.mL⁻¹ e (▲ - - -) 500 UI.mL⁻¹.

Pinto et al. (2011) também não verificaram efeito significativo da adição de nisina em queijo Minas artesanal do Serro sobre a a_w , variando somente em função do tempo (60 dias).

A a_w dos queijos Minas artesanais Canastra diminuiu, em média, de 0,97 no início para 0,89 ao final dos 60 dias de maturação. Essa redução ocorre, principalmente, devido à desidratação dos queijos, expostos às condições da sala de maturação, sem controle de temperatura e umidade relativa do ar (DORES, 2007; PAULA 2010). Quanto maior a temperatura de maturação e menor a umidade relativa do ar, maior será a perda de umidade, maior a concentração de sólidos totais e, conseqüentemente, de cloretos e outros compostos de baixa massa molar (NARDES, 2002; ARENAS et al., 2004).

Os teores de umidade e de sal na massa interferem na a_w dos queijos, de forma inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o teor de

sal, maior será a quantidade de água sorvida, tendendo a menor a_w (ECK, 1987; FURTADO 1991; ARENAS et al. 2004). No presente trabalho, o teor de umidade reduziu e o de cloretos aumentou significativamente durante a maturação, desta forma, certamente influenciaram na redução da a_w .

Outros fatores podem interferir na a_w como os índices de proteólise, quando ocorre o aumento de nitrogênio solúvel e nitrogênio não protéico e de ácidos graxos livres, além do aumento do teor de sólidos não gordurosos e a diminuição do pH (FURTADO, 1991).

4.3.1.4. Índices de proteólise dos queijos

A proteólise constitui o evento bioquímico mais complexo ocorrido durante a maturação ou armazenamento dos queijos que permite a modificação da textura e o desenvolvimento de características ideais de sabor e aroma. É consequência da ação de agentes como coagulante residual, fermentos lácticos, enzimas naturais do leite, microbiota acompanhante, composta por NSLAB e, em muitas variedades, enzimas de fermentos secundários (SOUSA et al., 2001).

A análise de variância dos resultados da relação de % de $NS_{pH\ 4,6}/NT$ (extensão da proteólise) dos queijos Minas artesanais Canastra demonstrou que não houve interação entre tratamento e tempo ($P \geq 0,05$), bem como efeito significativo de tratamento. Por outro lado, há efeito significativo de tempo ($P < 0,01$), com tendência de aumento ao longo do período de maturação ($P < 0,01$), segundo indicado pela análise de regressão, conforme apresentado na Figura 15.

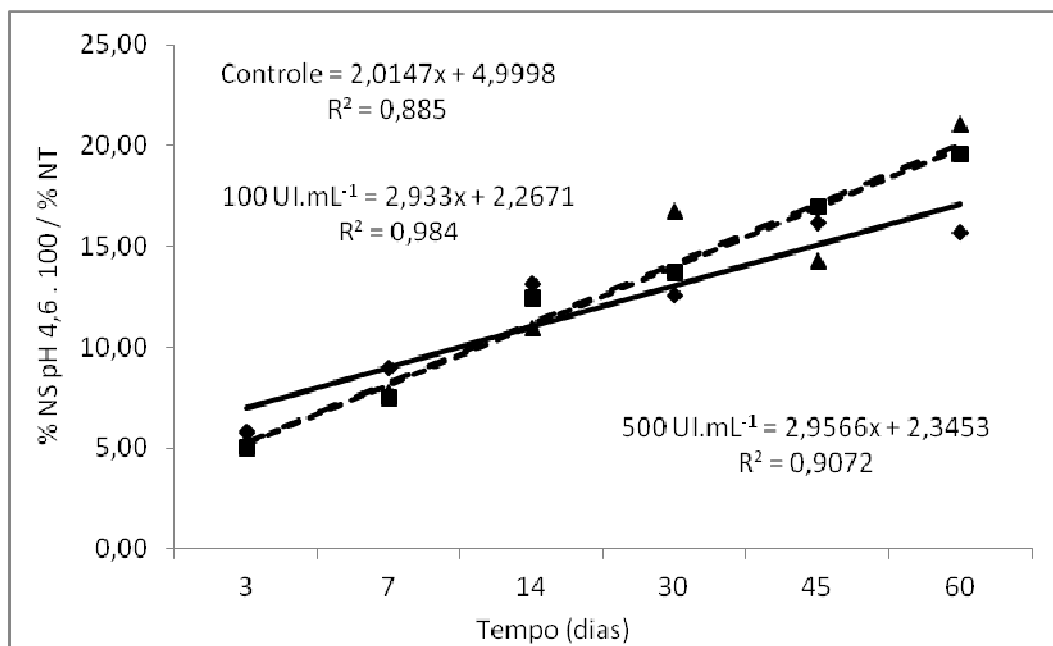


Figura 15 – Evolução da relação de % de $NS_{pH4,6}/NT$ ao longo da maturação (60 dias) de queijos Minas artesanais Canastra, fabricado com diferentes concentrações de nisina: (♦ —) 0; (■ ----) 100 $UI.mL^{-1}$ e (▲ - - -) 500 $UI.mL^{-1}$.

A relação de % de $NS_{pH4,6}/NT$ é um índice de maturação que se caracteriza pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis acumuladas durante o processo, expressas como porcentagens do nitrogênio total (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989). Os tratamentos não influenciaram nos índices de % $NS_{pH4,6}/NT$, indicando que a nisina não afetou o processo de maturação dos queijos. Os valores médios de % $NS_{pH4,6}/NT$, conforme esperado, aumentaram significativamente durante maturação dos queijos. Este comportamento pode ser explicado pelo aumento da degradação da matriz protéica provocado, possivelmente, pela ação da quimosina residual e das enzimas proteolíticas das culturas endógenas.

Em geral, o parâmetro % $NS_{pH4,6}/NT$ está relacionado à proteólise primária, com hidrólise da matriz protéica ocorrida durante a maturação dos queijos, que envolve, primeiramente, a conversão da caseína em grandes peptídeos, devido, principalmente, à ação residual do coalho (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989). As enzimas do coalho são as principais responsáveis pela proteólise inicial (FOX et al., 2000).

Temperaturas mais elevadas favorecem a proteólise primária (FOX, 2000) e a umidade contribui para um maior índice de $\% NS_{pH4,6}/NT$, pois o coagulante encontra-se disperso na fase aquosa, bem como acelera a atuação de proteases como plasmina (PAULA, 2010).

A plasmina possui importante papel na proteólise primária do queijo (FOX e McSWEENEY, 1998), com atividade ótima em pH 7,5, a 37 °C. No entanto, é mais ativa em queijos cozidos, devido à desnaturação de inibidores do plasminogênio e em queijos em que ocorre aumento do pH durante a maturação (McSWEENEY, 2004). Desta forma, em queijos Minas artesanais, pode-se considerar que a plasmina não atua de forma significativa na proteólise.

Para os resultados de $\% NS_{TCA12\%}/NT$ (profundidade da proteólise), a análise de variância demonstrou que não houve interação entre tratamento e tempo, bem como efeito significativo de tratamento ($P \geq 0,05$). Porém, houve efeito significativo de tempo de maturação ($P < 0,01$), segundo indicado pela análise de regressão, onde $\% NS_{TCA12\%}/NT$ apresentou tendência de aumento ($P < 0,01$) ao longo do tempo, conforme apresentado na Figura 16.

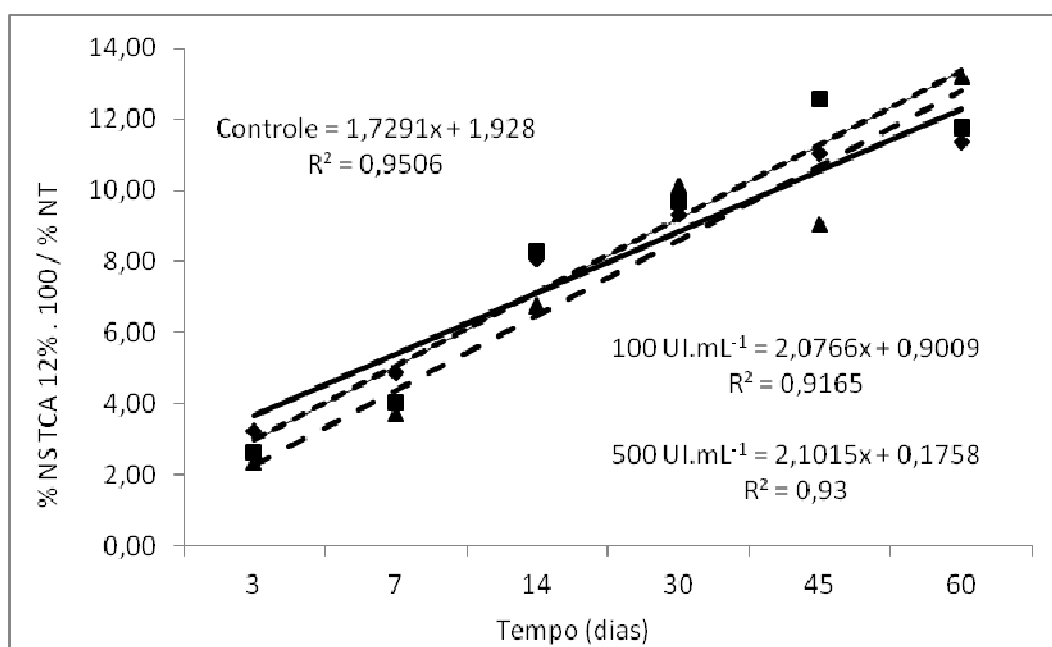


Figura 16 – Evolução da relação de % de $NS_{TCA12\%}/NT$ ao longo da maturação (60 dias) de queijos Minas artesanal Canastra, fabricado com diferentes concentrações de nisina: (♦ —) 0; (■ ----) 100 UI.mL⁻¹ e (▲ - - -) 500 UI.mL⁻¹.

A variável % de $NS_{TCA12\%}/NT$ relaciona-se, principalmente, à atuação das enzimas microbianas e aminopeptidases do leite cru (FOX et al., 2000) e indica uma hidrólise mais profunda das proteínas do queijo. Demonstra o quanto do nitrogênio total está presente principalmente na forma de compostos nitrogenados de baixa massa molar como aminoácidos, peptídeos menores, aminas e outros compostos nitrogenados acumulados durante o processo (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989).

Assim como ocorreu para a relação de % de $NS_{pH4,6}/NT$, os tratamentos não influenciaram os índices de % $NS_{TCA12\%}/NT$, indicando que a nisina não afetou o processo de maturação dos queijos. Os valores médios de % $NS_{TCA12\%}/NT$ aumentaram significativamente durante maturação dos queijos. Esse comportamento é esperado, visto que o aumento ocorre devido à atuação dos micro-organismos presentes nos queijos.

Estudos demonstram que o parâmetro % $NS_{TCA12\%}/NT$ está relacionado, principalmente, à ação de enzimas originadas da cultura *starter* (FOX et al., 2000). As bactérias lácticas contribuem para a proteólise do queijo, após a lise celular, principalmente pela ação de suas enzimas, que hidrolisam peptídeos maiores, com formação de pequenos peptídeos que, em geral, contribuem para melhorar as características sensoriais (McSWEENEY, 2004).

A relação % de $NS_{TCA12\%}/NT$ é influenciada pela temperatura, pois pode favorecer a multiplicação de micro-organismos presentes no pingo e no leite cru (PAIVA, 2012). O queijo contém enzimas provenientes do coagulante, do leite, de bactérias lácticas adicionadas, das NSLAB e de outros possíveis micro-organismos contaminantes presentes no meio (PAULA, 2010).

Diferente do verificado neste trabalho, Pinto et al. (2011) encontraram menores índices de proteólise em queijos Minas artesanal do Serro tratados com 100 e 500 UI.mL⁻¹ de nisina. O menor índice de maturação foi atribuído à ação da nisina sobre as bactérias lácticas.

4.3.2. Efeito do uso de nisina nas características mecânicas (TPA) de queijo Minas artesanal Canastra

A análise de Kruskal-Wallis não indicou efeito significativo ($P \geq 0,05$) em relação aos fatores firmeza, fraturabilidade, mastigabilidade, gomosidade e elasticidade dos queijos obtidos dos diferentes tratamentos (controle, adicionado de 100 UI.mL^{-1} e 500 UI.mL^{-1} de nisina). No entanto, para os tempos de maturação (03, 07, 14, 30, 45 e 60 dias), essa diferença foi significativa ($P < 0,05$). O parâmetro coesividade apresentou efeito significativo de tratamento e tempo ($P < 0,05$). A adesividade não apresentou significância para nenhum dos fatores ($P \geq 0,05$).

O estudo da regressão indicou que houve efeito significativo de tempo de maturação ($P < 0,01$) para os parâmetros de textura, exceto adesividade. Os índices de firmeza, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade aumentaram ao longo do tempo, para os diferentes tratamentos, por outro lado, coesividade e elasticidade apresentaram tendência decrescente durante a maturação.

Na Figura 17 estão os resultados da evolução dos fatores firmeza, fraturabilidade, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade, respectivamente, dos diferentes tratamentos, em função dos tempos de maturação para o queijo Minas artesanal Canastra.

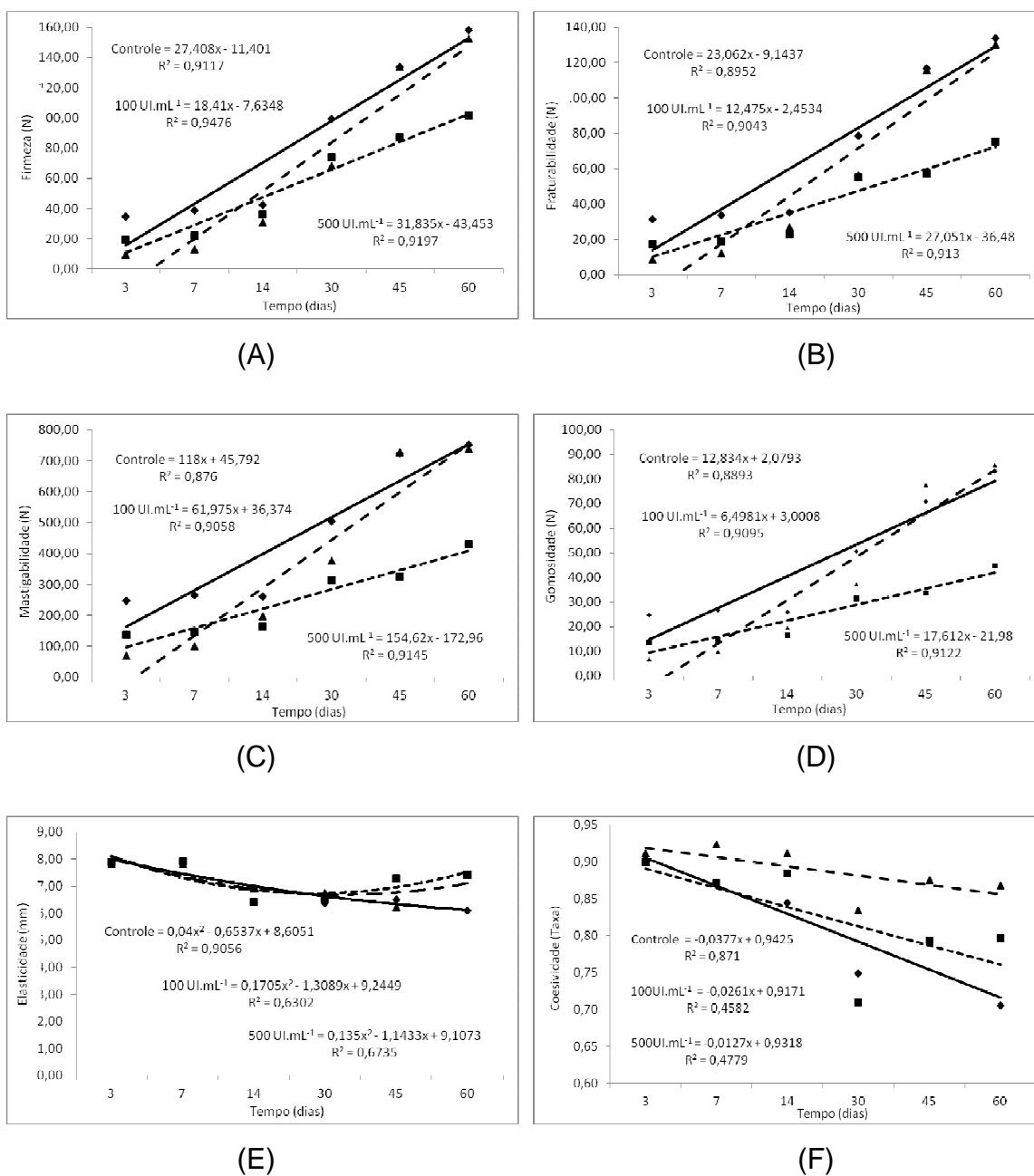


Figura 17 – Perfil de textura ao longo da maturação (60 dias) de queijos Minas artesanal Canastra fabricados com diferentes concentrações de nisina: (♦ —) 0; (■ ---) 100 UI.mL⁻¹; e (▲ - - -) 500 UI.mL⁻¹. (A) Firmeza; (B) Fraturabilidade; (C) Mastigabilidade; (D) Gomosidade; (E) Elasticidade e (F) Coesividade.

A firmeza constitui a força necessária para atingir determinada deformação (DAGOSTIN, 2011). Seu aumento com o decorrer da maturação torna necessária maior força no processo de mastigação (TOBÓN et al.

2005). Esse parâmetro é inversamente proporcional ao teor de umidade, ou seja, menor umidade, maior porcentagem de proteína total com formação de redes mais fortes, resultando em queijos com maior firmeza (DAGOSTIN, 2011).

O parâmetro firmeza e seus derivados, como gomosidade e mastigabilidade, também são influenciados pelo pH que afeta a formação do coágulo, a sinérese da massa e, conseqüentemente, a umidade e a textura do queijo (FOX e MCSWEENEY, 1998; FOX et al., 2000). A mastigabilidade representa a energia necessária para mastigar os alimentos (TOBÓN et al. 2005) e a gomosidade, a energia requerida para se desintegrar um alimento semissólido ao ponto de ser engolido (DAGOSTIN, 2011).

A fraturabilidade constitui a força necessária para quebrar o alimento em pedaços e relaciona-se com o grau de firmeza (SZCZESNIAK, 2002) sendo influenciada pelo pH, umidade, a_w e concentração de sal (BUFFA et al., 2001).

A elasticidade é definida como a tendência do material deformado de recuperar sua forma original quando uma tensão aplicada é removida (FOX e McSWEENEY, 1998). Assim, sua redução indica uma diminuição na capacidade de recuperar sua forma original (DE RENSIS et al., 2009).

A coesividade representa o limite que um material pode ser deformado antes de se quebrar (TOBÓN et al., 2005) e relaciona-se à resistência das ligações internas que compõem a matriz do queijo (DAGOSTIN, 2011). No presente trabalho, ocorreu uma redução da coesividade com o tempo de maturação, sendo que os queijos com 500 UI.mL⁻¹ de nisina apresentaram maiores médias quando comparados aos tratamentos controle e adiconado de 100 UI.mL⁻¹ de nisina que, por sua vez, não diferiram entre si.

A Figura 18 mostra os intervalos de coesividade para os queijos com e sem nisina, em todos os tempos de maturação.

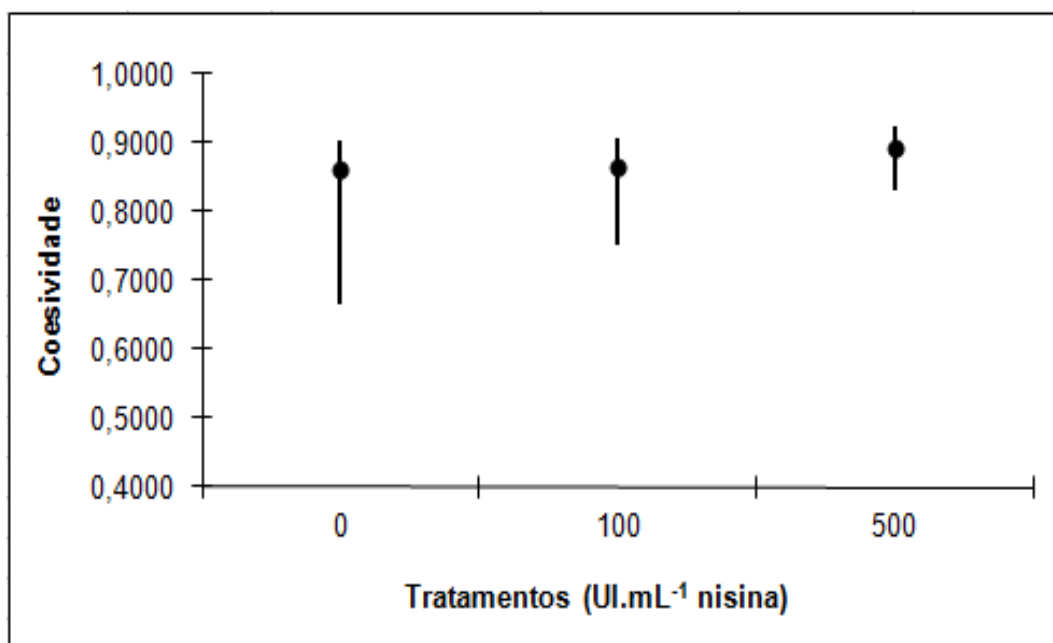


Figura 18 – Intervalos de coesividade para os queijos Minas artesanais Canastra sem nisina (controle) e adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina para todos os tempos de maturação (60 dias).

A maior coesividade dos queijos tratados com 500 UI.mL⁻¹ de nisina relaciona-se, provavelmente, com o maior pH desses queijos ($P < 0,05$). A massa com 500 UI.mL⁻¹ de nisina apresentou menores contagens de BAL, quando comparada aos demais tratamentos, o que pode ter levado ao aumento do pH. Maior pH durante a formação da coalhada resulta em menor desmineralização da massa, com maior retenção de cálcio nas micelas de caseína, que estabelece ligações iônicas entre elas após a coagulação (FOX et al., 2004) e, conseqüentemente, torna a rede protéica mais forte, coesa.

A adesividade representa o trabalho necessário para sobrepor as forças de atração entre a superfície do alimento e a de outros materiais (TOBÓN et al. 2005; DAGOSTIN, 2011). Este fator não variou com o tempo de maturação ou com os tratamentos com e sem nisina.

Diante dos resultados das análises de perfil de textura, pode-se concluir que, exceto pelo parâmetro coesividade, a nisina não provocou alterações nas características mecânicas dos queijos Minas artesanal Canastra. Este fato corrobora os índices de proteólise e as contagens de

BAL que também não foram influenciadas pelos tratamentos com nisina nos queijos.

Pinto et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes em estudo realizado sobre o efeito da nisina em queijo Minas artesanal do Serro. Esses autores observaram aumento da firmeza, fraturabilidade, gomosidade coesividade, mastigabilidade e elasticidade em relação ao tempo ($p < 0,05$). Apenas a adesividade não apresentou variação significativa com o tempo. Neste estudo, a nisina influenciou na elasticidade dos queijos, tendo o tratamento de 500 UI.mL^{-1} de nisina apresentado maiores médias.

A análise de TPA vem sendo extensamente empregada em pesquisas com queijos (DAGOSTIN, 2011). Estes, em geral, são produtos heterogêneos, que diferem na composição, condições tecnológicas e de armazenamento, características sensoriais e atributos físicos (GOMES et al. 2010). Além disso, os resultados dessa análise podem ser influenciados pelo tipo, tamanho e qualidade da amostra, além das configurações de operação do equipamento (DAGOSTIN, 2011). Desta forma, diferenças na textura podem ser encontradas mesmo entre queijos de um mesmo lote (GOMES et al., 2010), principalmente, quando se considera a falta de padronização de queijos Minas artesanais, especialmente quanto ao processo de salga, prensagem, qualidade e quantidade de pingo adicionado.

Embora o perfil de textura seja reconhecido como um atributo sensorial que exerce influência sobre a aceitação pelos consumidores, há poucos dados publicados com queijos Minas artesanais. Por este motivo, Pinto et al. (2011), relatam a importância de pesquisas nesta área para auxiliar na caracterização dos queijos artesanais das diferentes regiões tradicionais do Estado de Minas Gerais e estabelecer padrões rigorosos de qualidade.

4.3.3. Efeito do uso de nisina nas características microbiológicas de queijo Minas artesanal Canastra

4.3.3.1. Contagens de Bactérias Láticas do leite, da massa e dos queijos

A análise de variância indicou que não houve efeito significativo ($P \geq 0,05$) sobre as contagens iniciais de BAL no leite. Esse resultado era esperado visto que se utilizou o mesmo leite para a fabricação dos queijos dos diferentes tratamentos.

Houve efeito significativo de tratamento sobre a concentração de BAL ($P < 0,05$) da massa. A contagem de BAL da massa adicionada de 500 UI.mL⁻¹ de nisina foi significativamente ($P < 0,05$) menor que a do controle, porém, sem diferir do tratamento com 100 UI.mL⁻¹ de nisina ($P \geq 0,05$). As contagens do controle e do tratamento com dose de 100 UI.mL⁻¹ também não diferiram entre si ($P \geq 0,05$). As médias das contagens de BAL da massa estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Valores médios do log₁₀ UFC.g⁻¹ (± desvio-padrão) de Bactérias Láticas para a massa dos queijos Minas artesanais Canastra sem nisina (controle) e adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina.

Tratamento	Log ₁₀ UFC.g ⁻¹ BAL* (± DP)
Controle	6,00 ^a (± 0,99)
100 UI.mL ⁻¹	4,15 ^{ab} (± 0,32)
500 UI.mL ⁻¹	1,90 ^b (± 1,56)

* Letras iguais indicam valores semelhantes pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

DP = desvio-padrão

Para as contagens de BAL dos queijos Minas artesanais Canastra a análise de variância não indicou efeito significativo de tratamento, nem interação entre os fatores tratamentos (doses de nisina) e tempos de maturação ($P \geq 0,05$), porém, houve efeito significativo de tempo, isoladamente ($P < 0,01$), demonstrado também pelo estudo da regressão. A

contagem de BAL para os diferentes tratamentos apresentou tendência de redução com o tempo de maturação ($P < 0,01$).

A Figura 19 mostra o comportamento de bactérias lácticas no leite, na massa e nos queijos Minas artesanais Canastra, durante o período de maturação, na presença e na ausência de nisina.

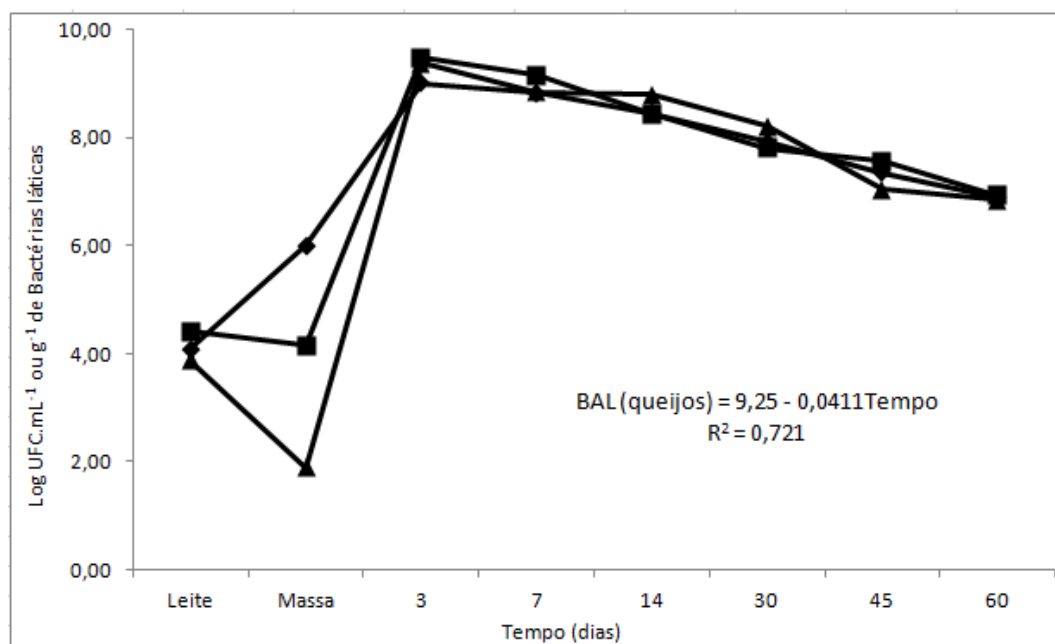


Figura 19 – Populações de Bactérias Lácticas no leite, na massa e durante a maturação (60 dias) de queijos Minas artesanais Canastra, fabricados com diferentes concentrações de nisina: (♦) 0; (■) 100 UI.mL⁻¹; e (▲) 500 UI.mL⁻¹.

É possível perceber pelo gráfico que as contagens foram menores nas massas adicionadas de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina e que apresentaram redução entre a adição da nisina ao leite e a formação da massa de 0,26 e 1,98 log UFC.g⁻¹, respectivamente. O mesmo não ocorreu no controle em que houve aumento de 1,93 log UFC.g⁻¹.

Esses resultados indicam que a nisina pode ter exercido efeito bactericida sobre as bactérias lácticas fazendo com que houvesse redução significativa ($P < 0,05$) nas contagens dos tratamentos com 500 UI.mL⁻¹, quando comparados com o controle, entre as etapas de adição da mesma ao leite e a formação da massa. Entretanto, com 3 dias de fabricação os queijos apresentaram contagens mais elevadas de BAL do que aquelas

encontradas na massa. As contagens para os três tratamentos foram estatisticamente iguais até o final da maturação, o que demonstra que a nisina não interferiu nas contagens dos queijos tratados, nas condições empregadas neste experimento.

Um aumento nas contagens de BAL do leite para a massa é esperado devido ao aprisionamento físico de bactérias na coalhada e, acima de tudo, à multiplicação microbiana durante o processo de fabricação e início de maturação (ARENAS et al., 2004).

Bactérias lácticas constituem parte da microbiota normal de queijos, oriunda do leite cru e do pingo adicionado no momento da fabricação. Possuem papel fundamental durante a maturação na formação do sabor e do aroma dos queijos, além de influenciar na textura (HERREROS et al., 2007; ABRIOUEL et al., 2008; MARTÍN-PLATERO et al., 2009; DAL BELLO et al., 2010). Desta forma, qualquer fator que interfira no seu desenvolvimento poderá acarretar em um produto final descaracterizado, com propriedades sensoriais alteradas.

A nisina é uma bacteriocina capaz de inibir a multiplicação de bactérias Gram positivas (CLEVELAND et al., 2001; BOWER et al., 2002; ARQUÉS et al., 2011) e pode reduzir as contagens de bactérias lácticas. Neste trabalho, embora a nisina tenha reduzido as contagens de BAL na massa, o mesmo não ocorreu nos queijos. Não houve interferência sobre os parâmetros de maturação dos queijos Minas artesanal Canastra, fato comprovado pelos resultados encontrados de proteólise de maturação (relação de % $NS_{pH4,6}/NT$ e de % $NS_{TCA12\%}/NT$) em que não foram apresentadas diferenças significativas entre os tratamentos, bem como os parâmetros de textura que, com exceção da coesividade, também não foram influenciados pelos tratamentos.

Algumas estirpes bacterianas são resistentes a bacteriocinas, pois são capazes de produzir uma proteína de imunidade para se proteger, outras passaram por processo de mutação espontânea e foram selecionadas na presença de nisina (VENEMA et al., 1995).

Ao contrário do verificado no presente trabalho, em estudo realizado por Pinto et al. (2011), as contagens de bactérias lácticas de queijos Minas

artesanais do Serro tratados com 100 UI.mL^{-1} e 500 UI.mL^{-1} foram menores que a do controle, afetando também os índices de proteólise.

4.3.3.2. Contagem de Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos dos queijos

A análise de Kruskal-Wallis não indicou efeito significativo ($P \geq 0,05$) em relação às contagens de mesófilos aeróbios estritos e facultativos dos queijos obtidos dos diferentes tratamentos (controle, 100 UI.mL^{-1} e 500 UI.mL^{-1} de nisina). No entanto, para os tempos de maturação (03, 07, 14, 30, 45 e 60 dias), houve efeito significativo ($P < 0,05$), assim como no estudo da regressão em que o número desses micro-organismos reduziu ($P < 0,01$) ao longo do tempo de maturação para os diferentes tratamentos.

A Figura 20 mostra a evolução do logaritmo das contagens de mesófilos aeróbios em função dos tempos de maturação para o queijo Minas artesanal Canastra.

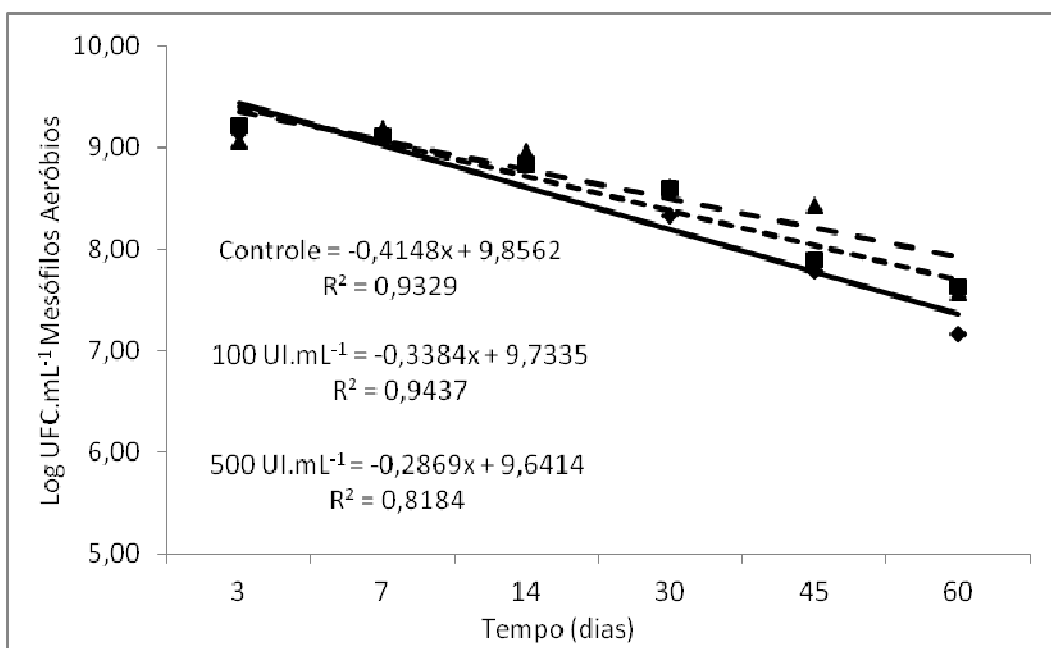


Figura 20 – Evolução das contagens de mesófilos aeróbios estritos e facultativos ao longo da maturação (60 dias) de queijos Minas artesanal Canastra, fabricado com diferentes concentrações de nisina: (◆ —) 0; (■ ----) 100 UI.mL^{-1} e (▲ - - -) 500 UI.mL^{-1} .

Os resultados indicam que as diferentes doses de nisina não interferiram no desenvolvimento de mesófilos aeróbios. Em estudo realizado por Al-Holy et al. (2012) com queijo branco fresco, com contagens iniciais de mesófilos aeróbios entre 5 e 6 log UFC.g⁻¹, a nisina na concentração de 500 UI.mL⁻¹ também não apresentou efeito sobre suas contagens em relação ao controle, enquanto a combinação de calor e nisina (1.000 ou 1.500 UI.mL⁻¹) exibiu um efeito bacteriostático durante todo o período de armazenamento a 4 °C e a 10 °C.

As contagens de mesófilos aeróbios foram tão elevadas quanto aquelas obtidas para enterobactérias, coliformes, *E. Coli* e bactérias lácticas. Outros trabalhos com queijos artesanais fabricados com leite cru também verificaram altos números deste grupo de micro-organismos (ARAÚJO et al., 2004.; BORELLI, et al., 2006; MARTINS, 2006; PINTO, 2008; MARTÍN-PLATERO et al., 2009).

Arenas et al. (2004) constataram altas contagens de mesófilos aeróbios em Queijo Genestoso fabricado com leite cru, com pico aos 2 dias de fabricação, atingindo 9 a 10 log UFC.g⁻¹, semelhante ao verificado no presente trabalho. Aygun et al. (2005) encontraram contagens em torno de 1,87 x 10⁸ UFC.g⁻¹ em queijo Carra, tradicional queijo da Turquia fabricado com leite cru.

O queijo pode ser considerado como um ecossistema em contínua alteração em que algumas espécies são substituídas por outras, dependendo dos fatores intrínsecos os quais, por sua vez, são modificados pelo próprio metabolismo microbiano. Desta forma, altas densidades de micro-organismos estão presentes em todo o período de maturação e desempenham um importante papel nesse processo. Em geral, o comportamento de mesófilos aeróbios durante a fabricação e maturação dos queijos reflete o que ocorre com a maioria dos grupos microbianos (ARENAS et al., 2004).

4.3.3.3. Contagens de *Enterobacteriaceae*, Coliformes e *E. coli* dos queijos

A análise de Kruskal-Wallis realizada para as contagens de enterobactérias, coliformes e *E. coli* dos queijos Minas artesanais Canastra demonstrou que houve efeito significativo de tratamento e de tempo ($P < 0,05$). As contagens foram inferiores nos queijos do grupo-controle ($P < 0,05$) quando comparadas aos queijos adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina que, por sua vez, não diferiram entre si ($P \geq 0,05$). Os intervalos das contagens de enterobactérias, coliformes e *E. coli* dos queijos com e sem nisina, para todos os tempos de maturação (60 dias), estão apresentados nas Figuras 21, 22 e 23, respectivamente.

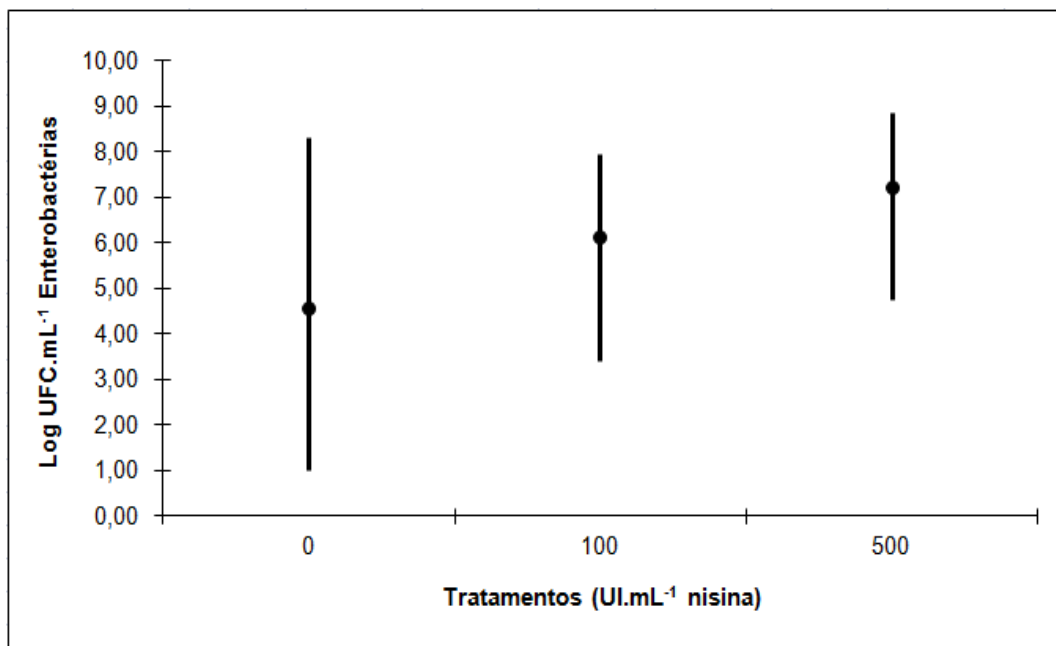


Figura 21 – Intervalos de Log₁₀ das contagens de Enterobactérias para os queijos Minas artesanais Canastra sem nisina (controle) e adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina para todos os tempos de maturação.

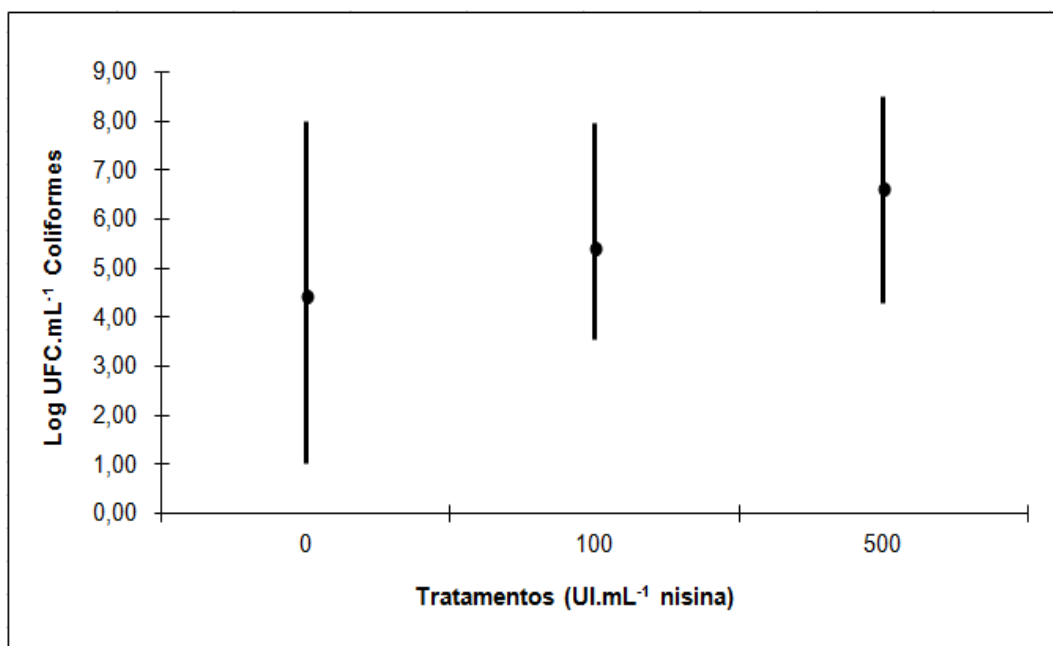


Figura 22 – Intervalos de Log₁₀ das contagens de Coliformes para os queijos Minas artesanais Canastra sem nisina (controle) e adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina para todos os tempos de maturação.

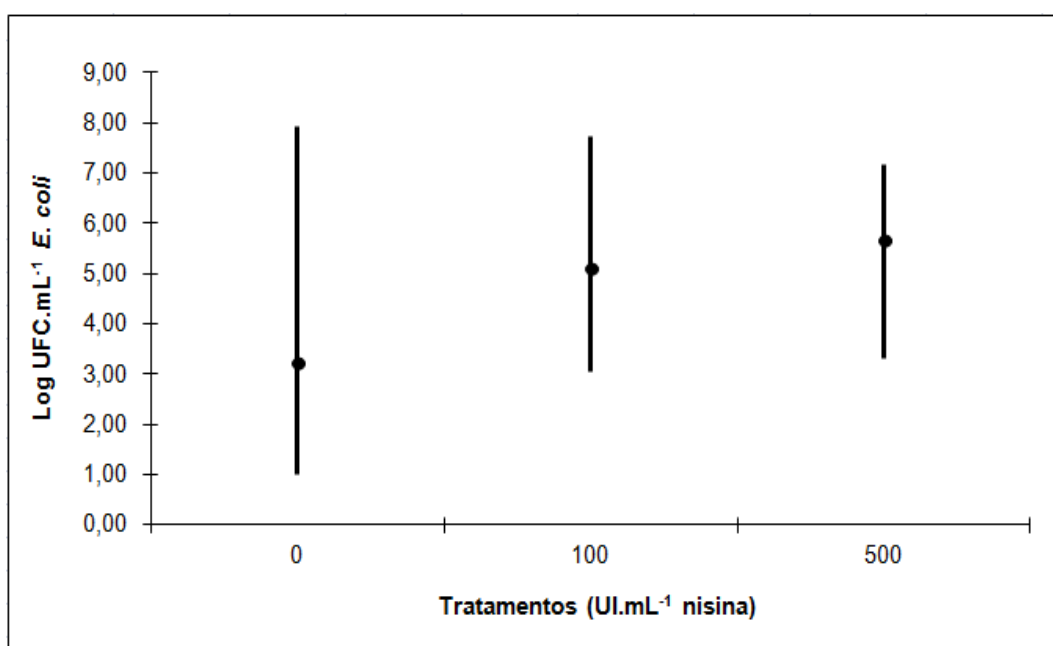


Figura 23 – Intervalos de Log₁₀ das contagens de *E. coli* para os queijos Minas artesanais Canastra sem nisina (controle) e adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina para todos os tempos de maturação.

A nisina, isoladamente, não atua sobre Gram negativos (CLEVELAND *et al.*, 2001; BOWER *et al.*, 2002; ARQUÉS *et al.*, 2011), dessa forma, não reduz ou impede a multiplicação de enterobactérias. Por outro lado, poderia contribuir indiretamente para o aumento de suas contagens na medida em que inibe Gram positivos reduzindo a competição entre esses micro-organismos (TORNADIJO *et al.*, 2001).

Os queijos tratados com nisina, apresentaram maiores contagens de enterobactérias, coliformes e *E. coli*. Embora a análise de BAL tenha demonstrado que não houve efeito significativo da adição de nisina sobre as contagens dos queijos, o mesmo não ocorreu na massa, onde houve diferença entre os tratamentos. A massa tratada com 500 UI.mL⁻¹ de nisina apresentou menor contagem ($P < 0,05$) que os demais tratamentos. Essa diferença nas contagens de BAL na massa pode ter influenciado nas contagens de enterobactérias e coliformes que já se apresentavam maiores nos queijos com 500 UI.mL⁻¹ logo no início da maturação.

Por meio da análise de regressão foi possível constatar tendência significativa ($P < 0,01$) de redução do número desses micro-organismos com o aumento do tempo de maturação dos queijos. Os resultados da evolução das contagens de enterobactérias, coliformes e *E. coli* dos diferentes tratamentos em função dos tempos de maturação estão apresentados nas Figuras 24, 25 e 26, respectivamente.

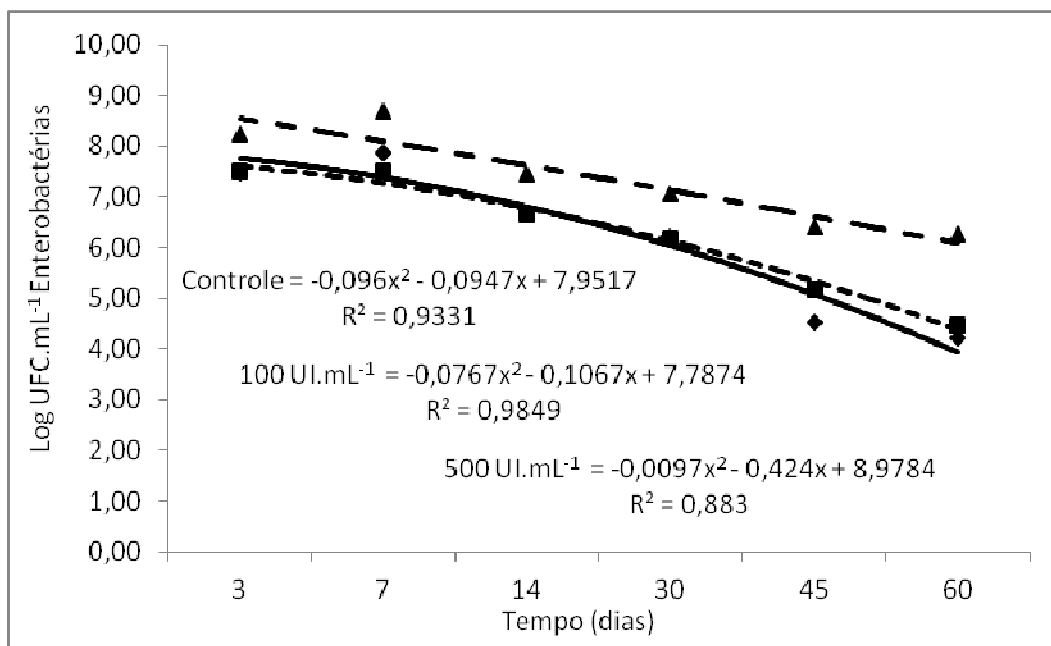


Figura 24 – Evolução das contagens de *Enterobacteriaceae* ao longo da maturação (60 dias) de queijos Minas artesanal Canastra, fabricado com diferentes concentrações de nisina: (♦ —) 0; (■ - - -) 100 UI.mL⁻¹ e (▲ - - -) 500 UI.mL⁻¹.

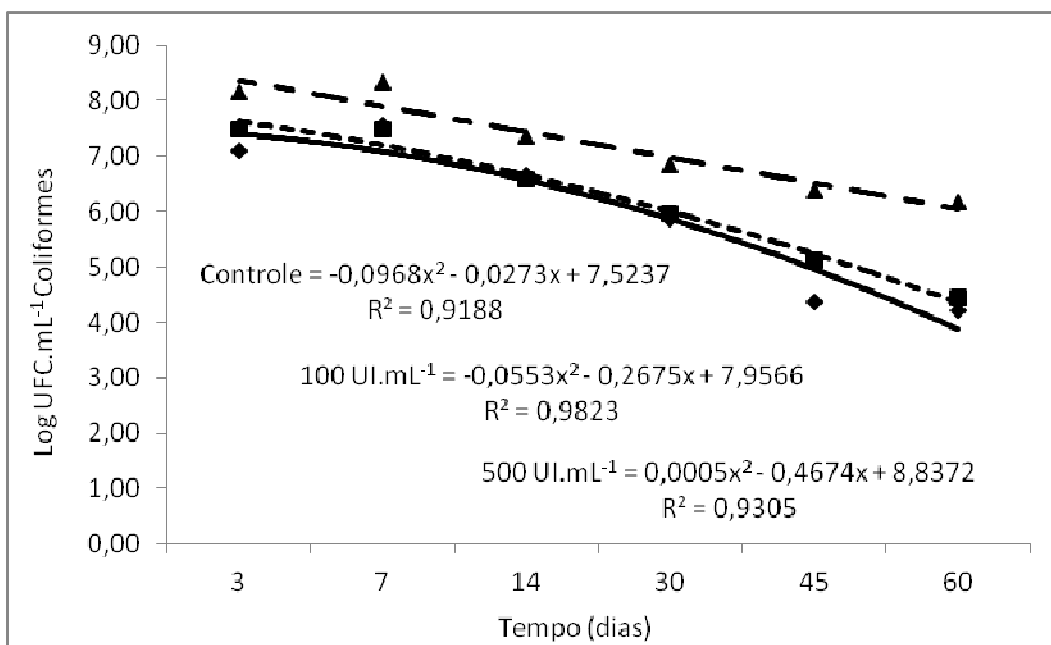


Figura 25 – Evolução das contagens de Coliformes ao longo da maturação (60 dias) de queijos Minas artesanal Canastra, fabricado com diferentes concentrações de nisina: (♦ —) 0; (■ - - -) 100 UI.mL⁻¹ e (▲ - - -) 500 UI.mL⁻¹.

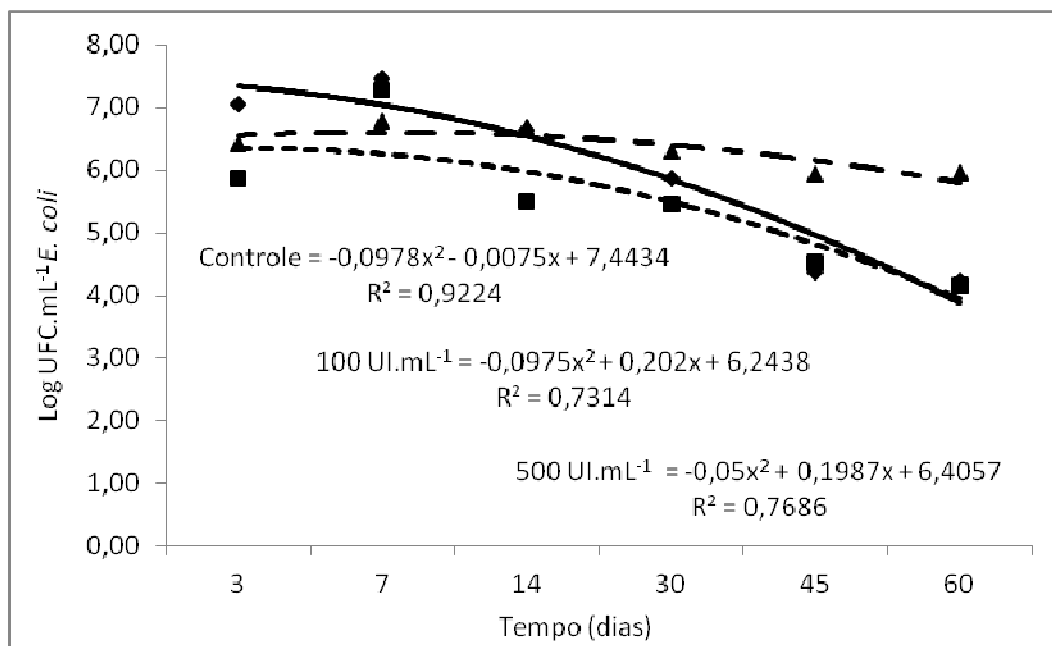


Figura 26 – Evolução das contagens de *E. coli* ao longo da maturação (60 dias) de queijos Minas artesanais Canastra, fabricado com diferentes concentrações de nisina: (♦ —) 0; (■ ----) 100 UI.mL⁻¹ e (▲ - - -) 500 UI.mL⁻¹.

Fatores como umidade, concentração de sal, a_w , pH e temperatura podem limitar a multiplicação de muitos micro-organismos, especialmente os patogênicos (ICMSF, 1996). Enterobactérias, coliformes e *E. coli* apresentaram diminuição de suas contagens com o tempo de maturação, conseqüentemente, é possível concluir que pode ser devido ao desenvolvimento de condições de multiplicação desfavoráveis durante maturação, visto que houve redução significativa da umidade e da a_w e aumento de cloretos. Além disso, não se pode descartar a atividade antibacteriana de bactérias lácticas, muitas vezes atribuída à produção de ácidos orgânicos ou de substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio, CO₂, diacetil e bacteriocinas (TORNADIJO et al., 2001; ABRIOUEL et al., 2008; DAL BELLO et al., 2010) que poderiam contribuir para a redução das contagens ao longo do tempo.

A a_w média durante a maturação dos queijos variou de 0,97 aos 03 dias de fabricação para 0,89 aos 60 dias. Segundo Tornadijo et al. (2001), valores inferiores a 0,95 podem inibir a multiplicação de bactérias da família *Enterobacteriaceae*.

O pH não variou significativamente durante a maturação, sendo que os queijos controle apresentaram menores médias que os adicionados de 100 UI.mL⁻¹ de nisina que, por sua vez, apresentaram pH menor que os de 500 UI.mL⁻¹. Para que haja interferência no desenvolvimento de enterobactérias o pH deve ser inferior a 5,2, embora alguns coliformes pareçam ser mais resistentes à acidez (TORNADIJO et al., 2001).

Estes resultados sugerem que a evolução dos parâmetros físico-químicos exerceram influência significativa nas contagens de enterobactérias, coliformes e *E. coli* durante o processo de maturação de queijos Minas artesanais Canastra. Entretanto, deve-se considerar que a redução nas contagens de enterobactérias não é consequência somente de um fator podendo ter sido afetada não apenas pela alteração nos parâmetros físico-químicos, mas também devido à microbiota competidora, inclusive bactérias ácido lácticas por meio da produção de ácido e bacteriocinas (TORNADIJO et al., 2001). Estes fatores de estresse combinados podem exercer um efeito sinérgico sobre o desenvolvimento e sobrevivência da população de *Enterobacteriaceae* (ARENAS et al. 2004).

A família *Enterobacteriaceae* é composta por bactérias Gram negativas (BRENNER, 1984) que podem ser patogênicas, ou não, sendo que coliformes também compõem esse grupo (BLOOD e CURTIS, 1995; TORNADIJO et al., 2001). Altas contagens de enterobactérias não confirmam, por si só, a presença de patógenos, mas indica que existe risco em potencial de contaminação (ARENAS et al., 2004), além disso, assim como para coliformes, demonstra falha do processo ou pós-processo acarretando em contaminação do produto final (BLOOD e CURTIS, 1995). A presença de *E. coli* em alimentos pressupõe condições higiênicas inadequadas com possível contaminação por patógenos entéricos (BLOOD e CURTIS, 1995; YUCEL e ULUSOY, 2006).

A legislação nacional não determina a análise de enterobactérias e de *E. coli* como rotina para a indústria, entretanto, são importantes parâmetros de qualidade para alimentos. No caso específico de queijos Minas artesanais o padrão para coliformes 35 °C é de, no máximo, 5 x 10³ UFC.mL⁻¹, segundo legislação mineira (MINAS GERAIS, 2002c; MINAS GERAIS, 2008). *E. coli* também não possui uma contagem de referência visto que a legislação exige

análise de coliformes 45 °C, sendo estabelecido um máximo de 5×10^2 UFC.mL⁻¹ (MINAS GERAIS, 2002c; MINAS GERAIS, 2008). Diante do exposto, é possível concluir que, neste trabalho, os queijos Minas artesanais Canastra não atenderam à legislação em nenhum dos tempos e tratamentos para contagens de coliformes, nem de coliformes 45 °C, se considerarmos as contagens de *E. coli*.

As contagens de *Enterobacteriaceae* e Coliformes encontradas neste trabalho foram maiores que as verificadas por outros autores em queijos fabricados com leite de vaca cru (TORNADIJO et al., 2001, AYGUN et al., 2005) leite de cabra cru (PSONI et al., 2003) e leite de ovelha cru (MARTUSCELLI et al., 2005). Altas contagens podem levar ao estufamento precoce e afetar a proteólise durante a maturação, causando defeitos de textura e sabor nos queijos (TORNADIJO et al., 2001; TAMAGNINI et al., 2008).

Segundo Morales et al. (2003), estudos têm demonstrado que as maiores contagens de enterobactérias, em torno de 10^7 UFC.g⁻¹, ocorrem, em geral, durante a primeira semana de maturação, reduzindo posteriormente a uma taxa variável, dependendo das estirpes e das características físico-químicas do queijo.

Herreros et al. (2007) e Arenas et al. (2004) encontraram contagens de enterobactérias aos 7 e 2 dias de fabricação de queijos Armada e Genestoso, respectivamente, semelhantes às do presente trabalho, porém, a redução foi mais significativa durante a maturação.

Estudo realizado por Aygun et al. (2005) avaliou amostras de queijo Carra fabricado com leite cru e verificaram contagens de *Enterobacteriaceae* de $5,6 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, coliformes de 10^4 UFC.g⁻¹ e *E. coli* de $4,2 \times 10^3$ UFC.g⁻¹. Os autores concluíram que os resultados microbiológicos demonstraram a presença de contagens elevadas de micro-organismos indicadores, provavelmente devido à utilização de leite de baixa qualidade e insuficientes condições de higiene durante a fabricação, armazenamento e comercialização do produto.

Tornadijo et al. (2001) também observaram contagens semelhantes de enterobactérias nos primeiros 15 dias de maturação do queijo San Simón, com redução significativa à partir da segunda semana, atingindo entre 10^3 e

10^4 UFC.g⁻¹ ao final da maturação. Nesse mesmo estudo, *E. coli* foi detectada em proporção relativamente elevada ao final da maturação demonstrando sua resistência às condições do queijo.

4.3.4. Efeito do uso de nisina nas contagens de *Staphylococcus aureus* do leite, da massa e do queijo Minas artesanal Canastra

A análise de variância indicou que não houve efeito significativo ($P \geq 0,05$) nas contagens iniciais de *S. aureus* no leite. Esse resultado era esperado visto que se utilizou o mesmo leite para a fabricação dos queijos dos diferentes tratamentos.

Houve efeito significativo de tratamento sobre a concentração de *S. aureus* ($P < 0,01$) na massa, sendo a contagem do controle maior que a do tratamento com dose de 100 UI.mL⁻¹ que, por sua vez, superou a da massa adicionada de 500 UI.mL⁻¹ de nisina. As médias das contagens de *S. aureus* na massa estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores médios do log₁₀ UFC.g⁻¹ (± desvio-padrão) de *S. aureus* para a massa dos queijos Minas artesanais Canastra sem nisina (controle) e adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina.

Tratamento	Log ₁₀ UFC.g ⁻¹ <i>S. aureus</i> * (± DP)
Controle	5,21 ^a (± 0,39)
100 UI.mL ⁻¹	2,70 ^b (± 0,50)
500 UI.mL ⁻¹	1,10 ^c (± 0,17)

* Letras iguais indicam valores semelhantes pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

DP = desvio-padrão

A análise de variância dos resultados das contagens dos queijos demonstrou que houve efeito significativo de tratamento e de tempo ($P < 0,01$), isoladamente. Assim como ocorreu para a massa, o grupo-controle apresentou números mais elevados de *S. aureus*, superiores àqueles encontrados para o tratamento com 100 UI.mL⁻¹ que, por sua vez, superou os do tratamento com 500 UI.mL⁻¹ de nisina. Os resultados médios do

logaritmo das contagens de *S. aureus* dos queijos Minas artesanal Canastra dos diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores médios do \log_{10} UFC.g⁻¹ (\pm desvio-padrão) de *S. aureus* para os queijos Minas artesanais Canastra sem nisina (controle) e adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina para todos os tempos de maturação.

Tratamento	Log ₁₀ UFC.g ⁻¹ <i>S. aureus</i> * (\pm DP)
Controle	4,79 ^a (\pm 1,92)
100 UI.mL ⁻¹	2,70 ^b (\pm 1,42)
500 UI.mL ⁻¹	1,68 ^c (\pm 1,14)

* Letras iguais indicam valores semelhantes pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

DP = desvio-padrão

Houve interação entre os fatores tratamentos (0, 100 e 500 UI.mL⁻¹ de nisina) e tempos de maturação (03, 07, 14, 30, 45, 60 dias) dos queijos Minas artesanal Canastra ($P < 0,01$). No estudo de tratamento dentro de cada tempo, o tempo 14 foi avaliado por meio de Kruskal-Wallis, pois não apresentou distribuição normal, para os demais tempos utilizou-se ANOVA. Nos tempos 03 e 07 os tratamentos diferiram entre si ($P < 0,01$), nos demais tempos não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P \geq 0,05$). No estudo de tempo dentro de cada tratamento, o tratamento de 100 UI.mL⁻¹ foi avaliado por meio de Kruskal-Wallis, para os demais tratamentos utilizou-se ANOVA. A análise de regressão indicou tendência significativa ($P < 0,01$) de decréscimo nas contagens de *S. aureus* nos tratamentos controle e adicionado de 100 UI.mL⁻¹ de nisina.

A Figura 27 mostra o comportamento de *S. aureus* no leite, na massa e nos queijos Minas artesanais Canastra, durante o período de maturação, na presença e na ausência de nisina, bem como a equação ajustada obtida por meio da análise de regressão (Tratamento *versus* Tempo de maturação) do logaritmo das contagens de *S. aureus* ao longo do período de maturação dos queijos, ao nível de significância $P < 0,01$.

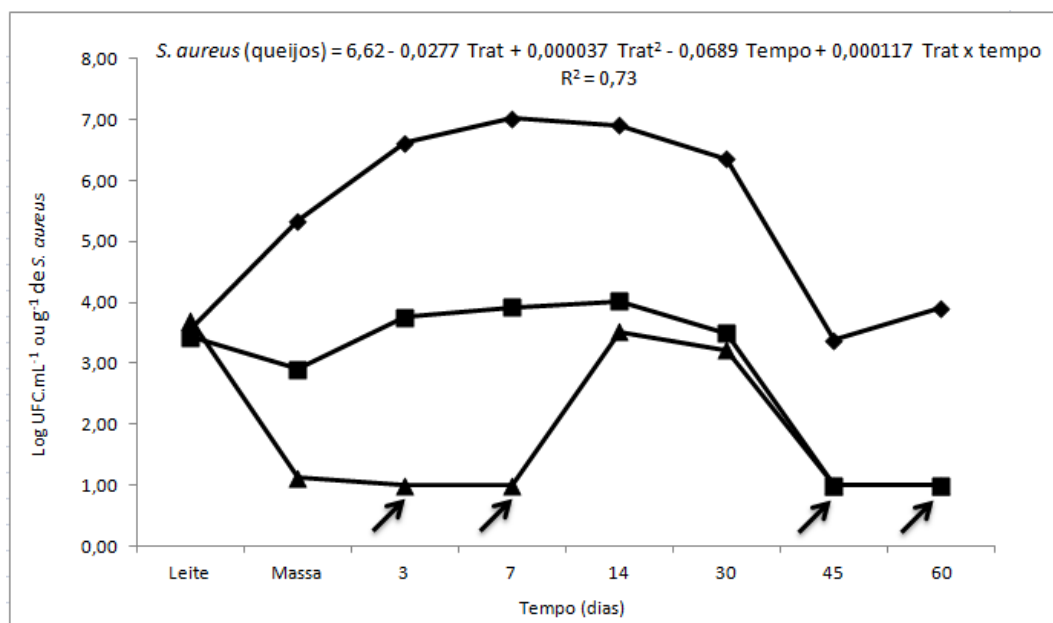


Figura 27 – Sobrevivência de *S. aureus* no leite, na massa e durante a maturação de queijos Minas artesanais Canastra, fabricados com diferentes concentrações de nisina: (◆) 0; (■) 100 UI.mL⁻¹; e (▲) 500 UI.mL⁻¹. As setas indicam o limite de detecção da técnica.

A Figura 27 demonstra que houve um aumento de 1,78 log UFC.g⁻¹ nas contagens de *S. aureus* do leite para a massa do grupo-controle, por outro lado, nos tratamentos com nisina, houve redução de 0,58 log UFC.g⁻¹ e de 2,58 log UFC.g⁻¹ nos queijos adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e de 500 UI.mL⁻¹ de nisina, respectivamente. Verifica-se também que no controle e no tratamento de 100 UI.mL⁻¹ de nisina, houve um aumento nas contagens da massa para o primeiro tempo avaliado (03 dias) dos queijos. O mesmo não ocorreu no tratamento de 500 UI.mL⁻¹ de nisina, que, ao contrário, apresentou uma pequena redução, permanecendo nas contagens mínimas de detecção do teste até o 7º dia de maturação. Posteriormente, as contagens tornaram a aumentar, provavelmente, devido à presença de *S. aureus* resistentes à bacteriocina.

Pode ocorrer resistência à nisina devido a uma mutação espontânea que faz com que o micro-organismo resista à bacteriocina, sendo tais estirpes selecionadas na presença de nisina (VENEMA et al., 1995). Há relatos de falhas nos processos de conservação devido à presença de

eventual estirpes resistentes à nisina tais como *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *C. botulinum* (GARCÍA et al., 2010).

Apesar do aprisionamento físico de bactérias na coalhada (ARENAS et al., 2004), o aumento das contagens de *S. aureus* do leite para a massa no controle foi devido, sobretudo, à multiplicação microbiana durante o processo de fabricação, visto que o mesmo não ocorreu nos demais tratamentos.

A fase Log de multiplicação iniciou-se somente a partir do sétimo dia no tratamento com 500 UI.mL⁻¹ de nisina, por outro lado, nos queijos tratados com 100 UI.mL⁻¹ iniciou-se na massa e nos queijos controles teve início ainda no leite. Nos três tratamentos as contagens começaram a reduzir a partir dos 14 dias de maturação, atingindo seu mínimo aos 45 dias. Aos 60 dias, os queijos tratados com nisina apresentaram a mesma contagem de *S. aureus*, sendo a diferença para o grupo-controle de 2,91 log UFC.g⁻¹.

Embora seja controversa a concentração mínima de *S. aureus* necessária para que se inicie a produção de enterotoxinas, é importante ressaltar que ao longo do período de maturação, os queijos tratados com nisina atingiram contagens inferiores ao considerado crítico pela maioria dos autores, o mesmo não ocorreu com os queijos sem nisina que alcançaram números de 10⁵ UFC.g⁻¹ ainda na massa. Quando o *S. aureus* excede esse nível pode ocorrer a produção de enterotoxinas (FDA, 1992; FORSYTHE, 2002; BHATIA e ZAHOR, 2007; AKINEDEN et al. 2008; PELISSER et al., 2009; DELBES-PAUS et al., 2010; SANTANA et al., 2010; SILVA et al., 2010), dependendo das condições físico-químicas do alimento e de temperatura (CUNHA NETO et al., 2002; JAY et al., 2005; SILVA et al. 2010), apesar de haver relatos da produção em alimentos mesmo com contagens inferiores (MEYRAND et al., 1998).

Pode-se afirmar que a nisina foi eficaz no controle do desenvolvimento de *S. aureus* até a obtenção da massa para os queijos tratados com 100 UI.mL⁻¹ de nisina e até o sétimo dia de maturação para aqueles adicionados de 500 UI.mL⁻¹. Nos queijos, a partir de 14 dias de maturação, outros fatores podem ter contribuído para a redução das contagens de *S. aureus* como outras substâncias antimicrobianas

produzidas pelas bactérias lácticas, redução na a_w , alteração de pH e elevação na concentração de cloretos.

A redução das contagens bacterianas ao longo da maturação pode estar relacionada à diminuição do potencial de oxi-redução, à produção de ácidos orgânicos, bem como à perda de água com consequente aumento de cloretos que inibem a multiplicação microbiana (BERESFORD et al., 2001).

A a_w média dos queijos Minas artesanais Canastra diminuiu de 0,97 no início para 0,89 ao final dos 60 dias de maturação. Essa redução é importante, pois interfere na multiplicação de micro-organismos deterioradores e patogênicos (FORSYTHE, 2002). *S. aureus* são capazes de se multiplicar em valores de a_w entre 0,83 e 0,99 em condições aeróbicas, com produção de toxinas a partir de 0,86 (CUNHA NETO et al., 2002; JAY et al., 2005).

O teor de cloretos dos queijos, média dos três tratamentos, variou de 1,72 % (m/m) no início da maturação a 2,75 % (m/m) ao final dos 60 dias. *S. aureus* é capaz de se multiplicar em uma faixa de 0 a 20 % de NaCl, sendo o ótimo entre 0 e 4 %. A produção de enterotoxinas ocorre entre 0 e 10 % com ótimo entre 0 e 0,5 % (ICMSF, 1996). Desta forma, pode-se afirmar que o teor de cloretos, isoladamente, não influenciou na inibição deste micro-organismo, mas pode ter agido sinergicamente com os demais fatores.

As médias de pH apresentadas pelos tratamentos, embora inferiores ao considerado ideal, permitem a multiplicação de *S. aureus* que possuem faixa de pH favorável entre 4,0 e 9,8, com ótimo entre 6 e 7, tanto para o desenvolvimento quanto para produção de enterotoxinas (ICMSF, 1996; SILVA et al. 2010).

Os queijos tratados com nisina apenas atingiram uma contagem de 10^3 UFC.g⁻¹, máximo de *S. aureus* permitido pela legislação (MINAS GERAIS, 2002c; MINAS GERAIS, 2008; BRASIL 2001) aos 30 dias de maturação, enquanto os queijos do grupo-controle apresentaram-se fora dos padrões legais em todo o período de maturação. Os queijos com 500 UI.mL⁻¹ de nisina também apresentaram contagens menores até o 7º dia de maturação, pois houve um aumento da fase Lag de multiplicação.

O efeito da nisina sobre *S. aureus* depende da contagem inicial desses micro-organismos (PINTO et al., 2011), dessa forma, a aplicação de

boas práticas de ordenha e de fabricação é fundamental para garantir a qualidade dos queijos, pois, somente a utilização de nisina não garante a segurança desses produtos.

Pinto et al. (2011) verificaram o efeito antagônico de nisina sobre *S. aureus* em queijo Minas artesanal do Serro e obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho. A bacteriocina, nas concentrações de 100 UI.mL⁻¹ e de 500 UI.mL⁻¹, apresentou ação bactericida reduzindo a população de *S. aureus* na massa, em comparação com as contagens do leite. Os autores consideraram que a nisina foi eficaz até o momento de obtenção da massa e que, posteriormente, outros fatores como alterações físico-químicas do queijo em função da evolução da maturação, a produção de ácidos orgânicos e outros compostos que atuam sinergicamente com a nisina podem ter influenciado na taxa de mortalidade de *S. aureus*.

Hamama et al. (2002), avaliaram o efeito inibitório de estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produtoras de nisina sobre *S. aureus* durante a fabricação de Queijo Jben. Quando a contagem inicial de *S. aureus* foi de 10³ UFC.mL⁻¹, após 4 dias de fabricação, não mais foi verificada a sua presença. Por outro lado, quando o inóculo de *S. aureus* foi de 10⁵ UFC.mL⁻¹, estes permaneceram no produto até o terceiro dia de armazenamento e foi detectada presença de enterotoxina 24 horas após a inoculação.

4.3.5. Análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das culturas de *Staphylococcus aureus*

Foram testados 25 isolados de *Staphylococcus* sp. dos queijos Minas artesanais Canastra nesta 3ª etapa de teste *in loco* para confirmação da espécie *S. aureus* e da presença de genes que codificam para produção de enterotoxinas clássicas (*sea* - *see*). Todos os isolados apresentaram, ao microscópio, morfologia, arranjo e coloração característicos da espécie, foram positivos para catalase e termonuclease, além de resistentes à acriflavina.

Os resultados das análises de PCR dos isolados de *S. aureus* da 3ª etapa (teste *in loco*) estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Genes detectados nos isolados de *S. aureus* de queijos Minas artesanais Canastra.

Identificação do Isolado	Resultados para os genes					
	<i>femA</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>
138	+	+	-	-	-	-
139	+	+	-	-	-	-
141	+	+	-	-	-	+
142	+	+	-	-	-	+
143	+	+	-	-	-	-
144	+	+	-	-	-	+
145	+	+	-	-	-	-
147	+	+	-	-	-	-
150	+	+	-	-	-	-
151	+	+	-	-	-	-
155	+	+	-	-	-	+
158	+	+	-	-	-	+
163	+	+	-	+	-	+
164	+	+	-	-	-	-
165	+	+	-	-	-	-
166	+	+	-	-	-	-
168	+	+	-	-	-	+
171	+	+	-	-	-	-
173	+	+	-	-	-	+
174	+	+	-	-	-	+
175	+	+	+	-	-	+
178	+	+	-	-	-	-
181	+	+	-	+	-	+
184	+	+	-	-	-	+
187	+	+	-	-	-	-

(+) = indica presença dos genes nos isolados

(-) = indica ausência dos genes nos isolados

Assim como ocorreu na 1ª etapa da pesquisa, todos os isolados apresentaram gene *femA*, confirmando que todas as estirpes pertenciam à espécie *S. aureus*. O gene mais frequente foi aquele que codifica para a produção de SEA (100%), seguido pelo codificador de SEE, presentes em 12 (48%) isolados. Essa mesma porcentagem possuía 2 ou 3 genes que codificavam para diferentes enterotoxinas. Somente 1 (4%) isolado apresentou gene para SEB, 2 (8%) para SEC e nenhum para SED.

Esses resultados são importantes, pois, em geral, SEA é citada como a mais frequente em alimentos e, conseqüentemente, mais associada com intoxicação alimentar (BALABAN e RASOOLY, 2000; ATANASSOVA et al., 2001; NÁJERA-SANCHEZ et al., 2003; ARAGON-ALEGRO et al., 2007; AKINEDEN et al., 2008; PELISSER et al., 2009), possivelmente porque pode

ser produzida em uma ampla faixa de condições de multiplicação como a_w , pH e potencial de oxi-redução (ICMSF, 1996). Segundo Pinto et al. (2005a), 59% dos surtos de intoxicação são causados por SEA e SEE. No entanto, a frequência de enterotoxinas e seus genes é bastante controversa entre os pesquisadores.

SEA e SEB são produzidas, predominantemente, por estirpes de origem humana (IKEDA et al., 2005, FREITAS et al., 2009), enquanto SEC são, em sua maioria, de origem animal (AKINEDEN et al., 2008). Segundo Morandi et al. (2007) estudos realizados em diversos países indicaram que a SEC foi mais frequentemente produzida por linhagens de origem bovina enquanto a SEA foi originária de isolados humanos.

Rodriguez et al. (1996) e Ertas et al. (2010) também encontraram maior frequência de genes que codificam para SEA em queijos e cremes no Chile e em queijos de leite de ovelha e sobremesas lácteas, respectivamente.

Achados frequentes de genes que codificam para SEA e SEB foram relatados por Normanno et al. (2005) em produtos de origem bovina na Itália e por Morandi et al. (2007) em leite e produtos lácteos de vaca, búfala, ovelha e cabra.

Rosec et al. (1997) observaram que 66% das amostras isoladas de derivados lácteos foi positiva para SEC. Borelli et al. (2006) verificaram maior produção de SEB e SEC em culturas de *Staphylococcus* sp. isolados de leite, massa e queijos Minas artesanais Canastra.

Aydin et al. (2011) verificaram que *sec* foi detectado em 27,2% dos isolados de alimentos na Turquia enquanto nenhum dos isolados foi positivo para genes de SED e SEE. Bania et al. (2006) e Pereira et al. (2009) também relataram ausência de gene para produção de SEE.

Akineden et al. (2008) avaliando queijos de leite de cabra, isolaram 64 culturas de *S. aureus* que demonstraram potencial enterotoxigênico para produção de SEA ou SEC. Outros autores verificaram que a presença de SEC foi a mais frequente, seguida por SEA em diversos alimentos como leite e derivados como iogurtes, queijos frescos e maturados (ARAGON-ALEGRO et al., 2007), leite cru e pasteurizado e derivados como queijo, coalhada, ricota e sorvetes (NORMANNO et al., 2005).

Surtos ocorridos em Minas Gerais, entre 1997 e 2002, envolvendo leite e derivados como queijos Canastra, Minas, muçarela e ralado, requeijão e bebida láctea tiveram como principais enterotoxinas estafilocócicas incriminadas as SEA, SEB e SEC (VERAS et al., 2003). Em outro surto, também em Minas Gerais, devido ao consumo de leite cru proveniente de animais com mastite as enterotoxinas envolvidas foram SEC e SED (CARMO et al., 2002).

É comum haver diferenças na prevalência de genótipos, bem como na relação entre eles dependendo da fonte do isolado, da região e até da época em que foi obtido (LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al., 2007). Desta forma, é possível concluir que existem variações geográficas na distribuição de *S. aureus* enterotoxigênicos (MORANDI et al., 2007), assim como também há diferenças nos reservatórios ou origem das estirpes, na sensibilidade dos métodos de detecção, nos genes detectados, no número e nos tipos de amostras avaliadas (ERTAS et al., 2010).

O gel de agarose de produtos amplificados de PCR de estirpes de referência de *S. aureus*, com os *primers* utilizados para confirmação da espécie e da presença ou ausência de genes codificadores de enterotoxinas clássicas foi apresentado na Figura 7.

A Figura 28 mostra o gel de agarose de alguns produtos amplificados de PCR de *S. aureus* isolados de Queijos Minas artesanal Canastra nas Etapas 1 e 3 desta pesquisa.

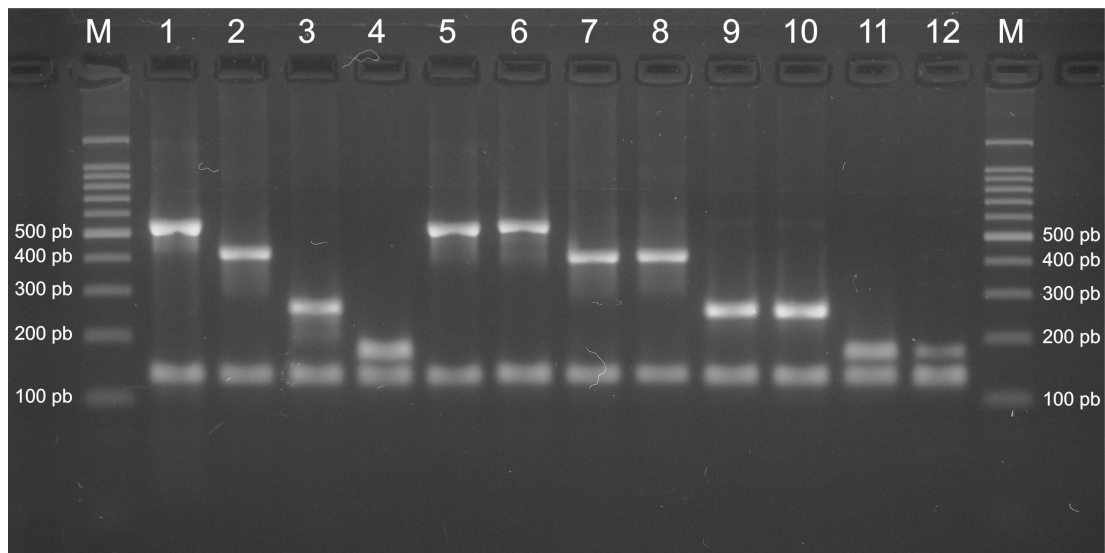


Figura 28 – Eletroforese em gel de agarose de produtos amplificados de PCR para a detecção de genes de *Staphylococcus aureus*. Todas as estirpes são positivas para o gene *femA* (132 pb). (M) Marcadores escala de 100 pb de DNA (Finnzymes); (1) *S. aureus* FRI 100 (*sea* – 544pb); (2) *S. aureus* ATCC 14458 (*seb* – 416 pb); (3) *S. aureus* ATCC 19095 (*sec* – 257 pb); (4) *S. aureus* FRI 326 (*see* – 170 pb); (5) Isolado número 2 da 1ª etapa (*sea* – 544 pb); (6) Isolado número 138 da 3ª etapa (*sea* – 544 pb); (7) Isolado número 5 da 1ª etapa (*seb* – 416 pb); (8) Isolado 175 da 3ª etapa (*seb* – 416 pb); (9) Isolado número 163 da 3ª etapa (*sec* – 257 pb); (10) Isolado número 181 da 3ª etapa (*sec* – 257 pb); (11) Isolado número 3 da 1ª etapa (*see* – 170 pb); (12) Isolado número 141 da 3ª etapa (*see* – 170 pb).

4.3.6. Pesquisa de enterotoxinas em queijo Minas artesanal Canastra

Nenhuma das amostras de queijos avaliadas para presença de enterotoxinas foi positiva ao teste VIDAS[®], mesmo quando atendidas as condições necessárias para que houvesse produção por *S. aureus* como contagens superiores a 10^5 UFC.mL⁻¹ (FDA, 1992; FORSYTHE, 2002; BHATIA e ZAHOOR, 2007; AKINEDEN et al., 2008; PELISSER et al., 2009; DELBES-PAUS et al., 2010; SANTANA et al., 2010; SILVA et al., 2010), pH maior que 5,0 (SILVA e GOMES, 2001), temperatura entre 10 e 46° C (SILVA et al., 2010) e a_w acima de 0,86 (CUNHA NETO et al., 2002; JAY et al., 2005).

S. aureus presentes nas amostras de queijos avaliadas pelo método VIDAS[®] apresentaram, na análise de PCR, pelo menos um gene que

codificava para produção de enterotoxinas, ainda assim, não foi possível detectá-las. Isso ocorre porque a presença desses genes ao exame por PCR não implica, necessariamente, na produção de enterotoxinas no alimento, pois não garante sua expressão (CREMONESI et al., 2005; MORANDI et al., 2007; RALL et al., 2008; AKINEDEN et al., 2008). Além disso, métodos imunológicos como o VIDAS[®] possuem sensibilidade e especificidade dependentes de quantidades detectáveis de toxinas (LETERTRE et al., 2003; MORANDI et al., 2007; AYDIN et al., 2011). Em alguns casos, a composição do alimento também pode interferir na detecção (PINTO et al., 2005a).

Em trabalho realizado por Dores (2007) com queijo Minas artesanal Canastra, não foi detectada toxina estafilocócica pelo método VIDAS[®]. Em outro estudo, realizado por Pinto (2004), também não foi detectada a presença de enterotoxinas em queijos Minas artesanal do Serro, embora tenham apresentado índices de *Staphylococcus* sp. superiores a 10^5 UFC.g⁻¹.

Lima (2005) não verificou a presença de enterotoxinas pelo método VIDAS[®] em amostras de queijo de coalho produzido no Ceará com elevada população de *Staphylococcus* coagulase positiva ($4,4 \times 10^4$ a $5,9 \times 10^7$ UFC.g⁻¹).

Morandi et al. (2007) isolaram 112 amostras de *S. aureus* à partir de leite e produtos lácteos de vaca, búfala, cabra e ovelha, dos quais 67 % foi positivo para um ou mais genes de enterotoxinas. Os autores testaram os isolados para produção de enterotoxinas em meio BHI e avaliaram essa produção com teste VIDAS[®] SET (BioMérieux, RCS Lyon, França) e apenas 58 % das 112 amostras produziram enterotoxina, ou seja, 23 estirpes não correlacionaram a presença de genes enterotoxigênicos e sua expressão.

Aydin et al. (2011) verificaram 72,1 % de correlação entre os tipos de enterotoxina produzidos pelas estirpes e a presença dos respectivos genes na análise de PCR. Da mesma forma, Pereira et al. (2009) demonstraram 80 % de correlação em isolados de *S. aureus* utilizando o ensaio VIDAS[®] e PCR.

4. CONCLUSÃO

A nisina nas doses de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ apresentou efeito bactericida, sendo eficaz na redução das contagens de *S. aureus* entre sua adição ao leite e a formação da massa. Além disso, houve efeito bacteriostático até o 7º dia de maturação nos queijos Minas artesanais Canastra adicionados de 500 UI.mL⁻¹ de nisina. As contagens de *S. aureus* nos queijos tratados com nisina foram inferiores a 10⁵ UFC.g⁻¹, índice considerado crítico para a produção de enterotoxinas.

Os resultados demonstraram que a utilização de nisina foi eficaz na redução inicial de *S. aureus* e em manter suas contagens em níveis mais baixos. A nisina na dose de 500 UI.mL⁻¹ apresentou maior efeito bactericida que na dose de 100 UI.mL⁻¹, no entanto, levou a uma alteração de pH e de coesividade dos queijos.

Os isolados de *S. aureus* apresentaram genes enterotoxigênicos *sea*, *seb*, *sec* e *see*. Não foi verificado gene que codifica para produção de SED. O gene *sea* foi o mais frequente, presente em 100% dos isolados, seguido por *see*. Apesar da detecção de genes codificadores de enterotoxinas e das contagens elevadas de *S. aureus*, as mesmas não foram detectadas nos queijos Minas artesanais Canastra.

As massas adicionadas de nisina apresentaram redução das contagens de bactérias lácticas, sendo as do tratamento com 500 UI.mL⁻¹ significativamente menores que as do controle. Apesar disso, as doses empregadas de nisina não influenciaram nas contagens de BAL dos queijos Minas artesanais Canastra.

A contagem de mesófilos aeróbios dos queijos não foi influenciada pela adição de nisina. O mesmo não ocorreu com enterobactérias, coliformes e *E. coli* que se apresentaram mais numerosos nos queijos tratados com nisina.

Os teores de umidade, gordura, GES, proteínas, cloretos e RMF não se modificaram em função da adição da nisina, bem como a *a_w* e os índices de proteólise. O pH foi ligeiramente maior nos queijos adicionados de 500 UI.mL⁻¹ de nisina. Os parâmetros de perfil de textura também não foram

alterados em função do uso de nisina, com exceção de coesividade que apresentou maior média nos queijos adicionados de 500 UI.mL⁻¹.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de nisina por si só não garante a qualidade de queijos Minas artesanais Canastra devido ao fato de não atuar contra bactérias Gram negativas, podendo, ainda, favorecer a sua multiplicação pela redução do número de micro-organismos que competem pelo mesmo substrato. Além disso, sua eficácia contra *S. aureus* está relacionada à contagem inicial, desta forma, seu emprego deve ser aliado às boas práticas agropecuárias e de fabricação para que se obtenha um produto que atenda aos padrões estabelecidos pela legislação e que seja seguro para a população.

Nas condições deste experimento, a dose de 500 UI.mL⁻¹ levou a uma alteração do pH e da coesividade dos queijos, o mesmo não ocorreu com a dose de 100 UI.mL⁻¹. Como a análise sensorial não foi objetivo deste trabalho, não se pode afirmar que essa alteração tenha sido suficiente para causar variação perceptível nas características sensoriais dos queijos. Desta forma, podem ser realizados estudos para verificar até que ponto a nisina é capaz de alterar tais características, podendo, inclusive, serem testadas doses intermediárias.

A legislação de queijos Minas artesanais proíbe a utilização de quaisquer insumos que não sejam o leite, o coalho, o pingo e o sal durante a fabricação dos mesmos. Este estudo fornece subsídios para que se possa repensar a legislação, pois comprova que a nisina pode ser utilizada, aliada às boas práticas de fabricação, para controle do desenvolvimento de *S. aureus*, sem alterar as características físico-químicas e de textura dos queijos Minas artesanais Canastra.

Nos últimos anos, a legislação de queijos Minas artesanais tem passado por modificações. Espera-se que com a aprovação pelo MAPA da IN nº 57 no ano de 2011, que permite a redução do prazo de maturação dos queijos fabricados com leite cru, os produtores possam ampliar seu âmbito de comércio, seja pelo registro no próprio MAPA ou por meio do SISBI/SUASA. Isso aumentará a renda do produtor e servirá como estímulo para a melhoria da qualidade do produto.

É importante destacar que é difícil determinar um prazo para que os queijos estejam adequados à legislação quanto às contagens de microorganismos. Fixar um prazo seria reconhecer que todos os queijos são produzidos da mesma maneira, sob as mesmas condições de higiene e produção de leite, o que, sabidamente, não é verdade. Os queijos se comportam de formas diferentes, dependendo de sua microbiota e das características físico-químicas que, por sua vez, são influenciadas pela matéria-prima, suas condições de sua obtenção, de fabricação, incluindo as quantidades de ingredientes, e maturação.

Embora a legislação exija um prazo mínimo de maturação dos queijos artesanais, deve-se considerar que o consumo de queijos frescos é bastante elevado entre os consumidores. Em função disso, é imperativo uma solução para que esses queijos sejam seguros, embora não maturados. Instituições de pesquisa e extensão e os órgãos de inspeção devem trabalhar junto ao produtor para que haja maior controle da produção de forma a garantir a qualidade desses queijos, mantendo a tradição histórica e cultural, sem descuidar da segurança da população.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M.; LARSEN, H. D.; JENSEN, N. E. Characterization of *Staphylococcus simulans* strains isolated from cases of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 66, p. 165-170, 1999.
- ABRIOUEL, H.; MARTÍN-PLATERO, A.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 200–208. 2008.
- ADAMS, M. Nisin in multifactorial food preservation. In: ROLLER, S. (Ed.) **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**. Cap. 2, England: Woodhead Publishing Limited, 2003.
- AHMADI, M.; ROHANI, S. M. R.; AYREMLOU, N. Detection of *Staphylococcus aureus* in Milk by PCR. **Comparative Clinical Pathology**, v.19, p.91-94, 2010.
- AKINEDEN, Ö.; HASSAN, A. A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Enterotoigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, p.211-216, 2008.
- AL-HOLY, M. A.; AL-NABULSI, A.; OSAILI, T. M.; AYYASH, M. M.; SHAKER, R. R. Inactivation of *Listeria innocua* in brined white cheese by a combination of nisin and heat. **Food Control**, v. 23, p. 48-53. 2012.
- ALEGRÍA, A.; DELGADO, S.; ROCES, C.; LÓPEZ, B.; MAYO, B. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 61–66. 2010.
- ALOMAR, J.; LOUBIERE, P.; DELBES, C.; NOUAILLE, S.; MONTEL, M.C. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. **Food Microbiology**, v. 25, p. 502–508. 2008.
- ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; SERAFINI, A. B. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. **Food Control**, v. 19, p. 200–207. 2008.

ANTOLINOS, V.; MUÑOZ, M.; ROS-CHUMILLAS, M.; AZNAR, A.; PERIAGO, P. M.; FERNÁNDEZ, P. S. Combined effect of lysozyme and nisin at different incubation temperature and mild heat treatment on the probability of time to growth of *Bacillus cereus*. **Food Microbiology**, v. 28, p. 305-310. 2011.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16 ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 1997. Vol. II.

APRODU, I.; WALCHER, G.; SCHELIN, J.; HEIN, I.; NORLING, B.; RÅDSTRÖM, P.; NICOLAU, A.; WAGNER, M. Advanced sample preparation for the molecular quantification of *Staphylococcus aureus* in artificially and naturally contaminated milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. S61–S65. 2011.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; KONTA, E. M.; SUZUKI, K.; SILVA, M. G.; JÚNIOR, A. F.; RALL, R.; RALL, V. L. M. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food Control**, v. 18, p. 630–634. 2007.

ARAÚJO, R. A. B. M.; MARTINS, J. M.; PINTO, M. S.; OLIVEIRA, P. N.; OLIVEIRA, R. C.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal da região de Araxá. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.59, n.339, p.93-96, 2004.

ARCURI, E. F.; PAULA, G. B.; BORGES, M. F.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F. PCR multiplex para identificação de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE. 2. 2006, **Anais...** Goiânia. SBQL, 2006. 3p. 1 CD.

ARENAS, R.; GONZALEZ, L.; BERNARDO, A.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M.E. Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. **Food Control**, v. 15, p. 271–279. 2004.

AREVALOS-SÁNCHEZ, M.; REGALADO, C.; MARTIN, S. E.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, J.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E. Effect of neutral electrolyzed water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilms, and on listeriolysin O activity. **Food Control**. doi:10.1016/j.foodcont.2011.09.012. 2011.

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.

ASSIS, E. M. **Comportamento de *Staphylococcus aureus* e formação de injúria durante o período de comercialização dos queijos Minas e Mussarela**. 1990. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras - MG, 1990.

ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham--a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 105-113. 2001

AYDIN, A.; SUDAGIDAN, M.; MURATOGLU, K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 99–106. 2011.

AYGUN, O.; ASLANTAS, O.; ONER, S. A survey on the microbiological quality of Carra, a traditional Turkish cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 401–404. 2005.

BAIRD, R. M.; LEE, W. H. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.15-24, 1995.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1-10, 2000.

BANIA, J.; DABROWSKA, A.; BYSTRON, J.; KORZEKWA, K.; CHRZANOWSKA, J.; MOLENDNA, J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 36–41. 2006.

BENKERROUM, N.; GHOUATI, Y.; GHALFI, H.; ELMEJDOUB, T.; ROBLAIN, D.; JACQUES P.; THONART, P. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in model cultured milk by in situ bacteriocinproduction from *Lactococcus lactis lactis*. **International Journal of Dairy Technology**, Cumbria, v. 55, n. 3, p. 145-151, 2002.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11. p. 259-274, 2001.

BHATIA, A., ZAHOOR, S. *Staphylococcus aureus* enterotins. A review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.1, n.2, p.188-197, 2007.

BHATTI, M.; APARNA, V.; LEORA, A. S. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 215–219, 2004.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINE, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of Staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seL in *S. aureus* AB-08802. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.719-730, 2004.

BLOOD, R. M.; CURTIS, G. D. W. Media for total Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 93-115. 1995.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; SILVA, M. C. C.; ROSA, C. A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.545-550, 2006.

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

BORGES, M. F.; TIEKO, N., R.; PEREIRA, J. L.; COLARES, A. A. P.; YOSHITERU, K. A. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciencia Rural**, v. 38, no. 5, p. 1431-1438. 2008b.

BORGES, M. F.; PEREIRA, J. L.; NASSU, R.T, MIYA, N.T.N. KUAYE, A . Y. Enterotoxina estafilocócica em queijo de coalho industrializado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.60, n.345, p.224-227, 2005.

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. Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 dez. 2011, Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 dez. 2006, Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 set. 2003, Seção I, p. 14.

BRASIL, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, revogando a portaria SVS/MS 451, de 19 de setembro de 1997. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Diário Oficial da União – D.O.U. Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do Requeijão. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1.

BRASIL. Diário Oficial da União – D.O.U. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977-3986.

BRENNER, D. N. (1984) In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Vol. I. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 408-420.

BRUNO, L. M.; T., FEITOSA, NASSU, R. T., CARVALHO, J. D. G.; ANDRADE, A. A. Avaliação microbiológica de queijos de coalho artesanais industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.60, n.345, p.217-220, 2005.

BUFFA, M. M.; TRUJILLO, A. J.; PAVIA, M.; GUAMIS, B. Changes in textural, microstructural and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw Milk, pasteurized or high-pressure-treated goats' Milk. **International Dairy Journal**, v. 11. p. 927-934, 2001.

CABO, M. L.; HERRERA, J. J.; CRESPO, M. D.; PASTORIZA. L. Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. **Food Control**, v. 20, p. 521–525, 2009.

CARIDI, A.; MICARI, P.; CAPARRA, P.; CUFARI, A.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 191-200, 2003.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J. de.; SANTOS, D. A. dos.; FARIA, M. E. de.; 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, p. 9-14, 2002.

CAO-HOANG, L.; CHAINE, A.; GRÉGOIRE, L.; WACHÉ, Y. Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. **Food Microbiology**, v. 27, p. 940-944. 2010.

CHAPPAVAL, L.; MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R., TSAI, S. M. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (*tst*) in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. **Arquivos do Instituto Biológico.**, v.73, n.2, p.165-169, 2006.

CHAPPAVAL, L. **Detecção de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *Staphylococcus aureus* no leite bovino por eletroforese capilar e identificação dos isolados enterotoxigênicos via PCR.** 2003. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2003.

CHOLLET, E.; SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; DEGRAEVE, P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, v. 19, p. 982–989. 2008.

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**, 10, 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.

CRASS, B. A.; BERGDOLL, M. S. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, p. 43-45. 1986.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular Cellular Probes**, v.19, p.299-305, 2005.

CREMONESI, P.; PEREZ, G.; PISONI, G.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; CASTIGLIONI, B. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 586–591. 2007.

CUNHA, A. S.; CUNHA, M. R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 2, p. 105-114, 2007.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.3, p.263-271,2002.

DAL BELLO, B.; RANTSIOU, K.; BELLIO, A.; ZEPPA, G.; AMBROSOLI, R.; CIVERA, T.; COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT. Food Science and Technology**, v. 43, p. 1151-1159. 2010.

DAGOSTIN, J. L. A. **Avaliação de atributos microbiológicos e físico-químicos de queijo minas frescal elaborado a partir de leite carbonatado**. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2011.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, Issues 1-2, p. 1-17, 20 July, 2001.

DE LUCA, G.; ZANETTI, F.; STAMPI, S. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 267-270. 1997.

DE RENSIS, C. M. V. B.; PETENATE, A. J.; VIOTTO, W. H. Caracterização físico-química, reológica e sensorial de queijos tipo Prato com teor reduzido de gordura. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29(3): 488-494, jul.-set. 2009

DELBES-PAUS, C.; DORCHIES, G.; CHAABNA, Z.; CALLON, C., MONTEL, M. C. Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. **Food Microbiology**, v. 27, p. 924-932. 2010.

DORES, M. T. **Implicações do processo de maturação a temperatura ambiente e sob refrigeração do queijo Minas artesanal da Canastra produzido na região de Medeiros, Minas Gerais**. 2007. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2007.

ECK, A. **O queijo**. Edição n. 137.024/5.141. v. 1, Coleção EUROAGRO, Portugal: Publicações Europa-América. 1987.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS. **Programa Queijo Minas Artesanal/Mapa do Queijo**. Disponível em: < http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&grupo=135&menu=59 >. Acesso em: 09 abr. 2012.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSAO RURAL DE MINAS GERAIS. **Caracterização da Microrregião da Canastra como produtora de Queijo Minas Artesanal**. São Roque de Minas. 2004. Disponível em: < http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO_HISTORICO/caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20do%20queijo%20canastra.pdf >. Acesso em: 09 abr. 2012.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSAO RURAL DE MINAS GERAIS. Memória da reunião de 10/07/03 – **Anexo 1: Programa de apoio aos queijos tradicionais de fabricação artesanal do estado de Minas Gerais**, Belo Horizonte – Sede da EMATER. 2003.

ERTAS, N.; GONULALAN, Z.; YILDIRIM, Y.; KUM, E. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 74–77. 2010.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E.H.F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23 (Supl.), p. 162-165, 2003.

FDA. Food and Drug Administration. **Foodborne pathogenic microorganisms & natural toxins**. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Rockville, Maryland. P.12-16, 1992.

FILHO, N. J. P.; MARTINS, J. M.; RAMOS, M. P.; ROSADO, M. S.; OLIVEIRA, N. P.; CUNHA, L. R.; COSTA, K. F.; FERREIRA, C. L. L. F. Características microbiológicas de queijo Minas artesanal da região do Alto Paranaíba, **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.60, n.345, p.298-301, 2005.

FONSECA, C.H.; PEREIRA, A. J. G.; ROSA, W. J. Queijo minas artesanal: tecnologia de fabricação na Serra do Salitre-Região do Alto do Paranaíba-MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.60, n.345, p.356-358, 2005a.

FONSECA, C. H.; PEREIRA, A. J. G.; ROSA, W. J. Queijarias artesanais do Alto Paranaíba e Serra da Canastra: o tradicional quarto de queijo do século XVIII cede espaço para as queijarias certificadas na Instituto Mineiro de Agropecuária. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.60, n.345, p.359-363, 2005b.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. São Paulo: Artmed, 2002.

FOX, P. F., Mc SWEENEY, P.L.H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. London: Chapman & Hall, v.1, 617, p. 2004.

FOX, P. F.; GUINEE, T. O.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Springer – Verlag, 638p. 2000.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Springer – Verlag, 478p. 1998.

FREITAS, M. F. L. L.; I LUZ, I. S.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; DUARTE, D. A. M.; VASCONCELOS, A. M. M.; RIBEIRO, A. R., MOTA, R. A., BALBINO, T. C. L., STAMFORD, T. L. M. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos de coalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, p.375-379, 2009.

FREITAS, E. I. **Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* sp. isolados de queijo Minas Frescal**. Rio de Janeiro, 2005. 106f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2005.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos causas e prevenção**. Fonte Comunicações e Editora. São Paulo, SP, Brasil, 200p. 2005.

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

GARDE, S.; ÁVILA, M.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NÚÑEZ, M. Proteolysis of Hispanic cheese manufactured using lactacin 481-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* INIA 639. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p.840–849. 2006.

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.

GERORNARAS, I.; SKANDAMIS, P. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J.A.; KENDALL, P. A.; SMITH, G. C.; SOFOS, J. N. Post-processing application of chemical solutions for control of *Listeria monocytogenes*, cultured under different conditions, on commercial somoked sausage formulated with and without potassium lactate-sodium diacetate. **Food Microbiology**, v. 23, p. 762-771, 2006.

GOMES, J. P.; PRUDÊNCIO, S. H.; SILVA, R. S. S. F. Queijo tipo minas frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 30(Supl.1): 77-85, maio 2010

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, v.43, n.6, p.1367-1378, 2002.

HALIN, M. B.; KALCHAYANAND, N., RAY, P.; RAY, B. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have a greater antibacterial activity. **Journal of Food Protection**. v.56, n.3, p.252-255, 1993.

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.

HEIN, I.; JORGENSEN, H. J.; LONCAREVIC, S.; WAGNER, M. Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurized bovine and caprine milk by real-time PCR. **Research in Microbiology**, v.156, p.554-563, 2005.

HERREROS, M. A.; ARENAS, R.; SANDOVAL, M. H.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 328–335. 2007.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico sanitário de alimentos**. Tradução de Silvia Panetta Nascimento e Marcelo Arruda Nascimento. 1. ed. São Paulo-SP: Livraria Varela, p. 29-31, 1998.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods 5. In Microbiological specifications of food pathogens** (513p). London: Blackwell Academic and Professional. 1996.

IKEDA, T.; TOMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of Staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.5, p.2793-2795, 2005.

INGHAM, S. C.; BECKER, K. L.; FANSLAU, M. A. Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm™ Staph Express Count plate methods for enumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contaminated foods. **Journal of Food Protection**, v.66, n.11, p.2151-2155, 2003.

IMA. 2010. **Queijo Minas Artesanal possui 155 queijarias cadastradas**. Publicado em 27/12/2010. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/acontece-no-ima/1171-queijo-minas-artesanal-possui-155-queijarias-cadastradas>>. Acesso em 26 ago. 2011.

JAKOBSEN, R. A.; HEGGEBØ, R.; SUNDE, E. B.; SKJERVHEIM, M. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. **Food Microbiology**, 2010, In Press.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal Immunology**, v.166, p.669-677, 2001.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed., New York: Springer. 2005. 790pp.

JOHNSON, E. A.; NELSON, J. H.; JOHNSON, M. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, part I. Executive summary, introduction and history. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 5, p. 441-452, may 1990a.

JOHNSON, E. A.; NELSON, J. H.; JOHNSON, M. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, part II. Microbiology **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 6, p. 519-540, june 1990b.

JOHNSON, W. M.; TYLER, S. D.; EWAN, E. P.; ASHTON, F. E.; POLLARD, D. R.; ROZEE, K. R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, 29, 426-430, 1991.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégãos e nisina**. 2006. 91f. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

KWOK; A., Y. C.; CHOW, A. C. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.87–92, 2003.

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.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

LAWRYNOWICZ-PACIOREK, M., KOCHMAN, M., PIEKARSKA, K., GROCHOWSKA, A., WINDYGA, B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 319–323. 2007.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.38-43, 2003.

LIMA, A. F. **Staphylococcus coagulase-positiva e enterotoxinas em queijo de coalho**. 2005. 86f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

LIMA, A. F., FIGUEIREDO, E., A., T., GONÇALVES, M. C., BORGES, M. F. Incidência de *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos de coalho artesanal e industrial comercializados em Fortaleza, Ceará. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.60, n. 345, p.195-198, 2005.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31,n.6, p. 1063-1067, 2001.

MACHADO, E. C. **Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas Artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais**. 2002. 49 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Setor de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D. J.; SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, v. 27, p. 175–178, 2010.

MARTÍN-PLATERO, A. M.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E.; PURSWANI, J.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. **Food Microbiology**, v. 26, p. 294–304. 2009.

MARTINEZ, Y. B.; FERRER, K.; SALAS, E. M. Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 65, b. 11, p. 1780-1783, 2002.

MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C. Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 79–88. 2001.

MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro**. 2006. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKASATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E. S. S. Prevalência e etiologia da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p.181-187, 2010.

MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F.; TORRIANI, S.; MASTROCOLA, D.; SERIO, A.; CHAVES-LÓPEZ, C.; SCHIRONE, M.; SUZZI, G. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 571–578. 2005.

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 27, n.2/3 p.127-144, mai/agosto de 2004.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.3. p.1032-1035, 2000.

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

MENG J.; DOYLE, M. P. Emerging and involving microbial foodborne pathogens. **Institute Pasteur**, v. 96, p. 151-164, 1998.

MEYRAND, A.; BOUTRAND-LOEL, S.; RAY-GUENIOT, S.; MAZUY, C.; GARPARD, C.E.; JAUBERT, G.; PERRIN, G.; LAPEYRE, C.; VERNOZY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheese from raw goats' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.537-544, 1998.

MINAS GERAIS (Estado). Decreto 44.864 de 01 de agosto de 2008. Altera o regulamento da lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. **Diário do Executivo e do Legislativo e Publicações de Terceiros**, p. 1, col. 2, 2008.

MINAS GERAIS (Estado). Decreto 42.505, de 15 de abril de 2002. Institui as formas de registros de bens culturais de natureza imaterial ou intangível que constituem patrimônio cultural de Minas Gerais. **Diário do Executivo e do Legislativo e Publicações de Terceiros**. 2002a.

MINAS GERAIS (Estado). Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e das outras providências. **Diário do Executivo e do Legislativo e Publicações de Terceiros**, de 01. fev. 2002b.

MINAS GERAIS (Estado). Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 42645, de 31 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. **Diário do Executivo e do Legislativo e Publicações de Terceiros**, de 31 jan 2002c.

MINITAB™ Statistical Software. Version Release 14. MiniTab, Inc., 2003.

MITRA, S.; CHAKRABARTTY, P. K.; BISWAS, S. R. Potential production and preservation of dahi by *Lactococcus lactis* W8. a nisin-producing strain. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 337–342, 2010.

MONTEIRO, J. C.; LEANDRO, E. S. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal com serviços de inspeção federal e artesanal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.59, n.339, p.347-350, 2004.

MORAES, D. A. **Otimização da Produção de Nisina em Meio Sintético**. 2002. 185f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MORALES, P.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; NUÑEZ, M. Caseinolysis in cheese by *Enterobacteriaceae* strains of dairy origin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 410–414, 2003.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 66 -72, 2007.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1316-1318, 2007.

NÁJERA-SANCHEZ, G.; MALDONADO-RODRIGUEZ, R.; OLVERA, P. R.; GARZA, L. M. Development of two multiplex Polymerase Chain Reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from food. **Journal of Food Protection**, v.66, p.1055-1062, 2003.

NARDES, R. E. F. **Caracterização do queijo Zamorano sob condições de maturação acelerada por modificações na temperatura**. 2002. 230f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

NATTRESS, F. M.; YOST, C. K.; BAKER, L. P. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 111-119, 2001.

NETO, L. G. G.; NEVES, M. V. O.; VELOSO, F. P.; PAIVA, R. M. B.; PENNA, C. F. A. M.; SENA, M. J., Qualidade físico-química e microbiológica de queijo de coalho produzido no Brasil-Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.59, n.339, p.236-238, 2004.

NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISSETTI, E.; CELANO, G.V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.290-296, 2007.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASLELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BALZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 73-79. 2005.

O'SULLIVAN, L., ROSS, R. P., HILL, C. A lactacin 481-producing adjunct culture increases starter lysis while inhibiting nonstarter lactic acid bacteria proliferation during Cheddar cheese ripening. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1235–1241, 2003.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OME, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiological Letters**, v.246, p.191-198, 2005.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by to kinds of plasmids. **Infectious Immunity**, v.71, p.6088-6094, 2003.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; YU, S.; HU, D. L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.3, p.857-862, 2002.

ORNELAS, E. A. **Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra - MG**. 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

PAIVA, P. H. C. **Tratamento da casca de queijo Canastra com resina e seus efeitos durante a maturação e na qualidade como forma de melhorar o aspecto e de agregar valor ao produto.** 2012. Dissertação (Mestrado em Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

PATHANIBUL, P.; TAYLOR, T.M.; DAVIDSON, P.M.; HARTE, F. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple and carrot juices using high pressure homogenization and nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 316–320, 2009.

PAULA, J. C. J. **Efeito do uso de dióxido de carbono (CO₂) na fabricação de queijos minas frescal e minas padrão.** 2010. 135f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. 2010.

PELES, F.; WAGNER, M.; VARGA, L.; HEIN, I.; RIECK, P.; GUTSER, K.; KERESZTURI, P.; KARDOS, G.; TURCSÁNYI, I.; BÉRI, B.; SZABÓ A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, p.186–193, 2007. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.010

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T.R.; ARISI, A. C. M. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxins genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.145-148, 2009.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL, M. S. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. **Journal of Food Protection**, v.59, p. 559-561, 1996.

PEREIRA, M. L. Baixa produção de enterotoxinas por estafilococos coagulase negativos e positivos – Algumas considerações. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 3., Campinas. **Livro de Programa e Resumos**. Campinas, 1999. p. 3.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F. da.; DE OLIVEIRA, L. L.; COSTA JUNIOR, L. C. G. C. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos**. 1. ed. Juiz de Fora-MG: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda., 2001. 190 p.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, p. 278–282, 2009.

PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal do Serro.** 2004. Dissertação. (Mestrado em Ciência e tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

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. 2005a.

PINTO, M. S.; PIRES, A. C.; PAULA, J. C. J.; FURTADO, M. M. Índice de *Staphylococcus* sp e *Escherichia coli* em queijos artesanais produzidos na Europa e no Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n.345, p.331-334, 2005b.

PINTO, M. S. **Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal do Serro.** 2008. 84f. Tese. (Doutorado em Ciência e tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

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.

PINTO, M. S.; CARVALHO, A. F.; PIRES, A. C. S.; PAULA, J. C. J.; SOBRAL, D.; MAGALHÃES, F. A. R. Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. **Food Control**, v. 20, p. 1167–1170, 2009.

PSONI, L.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greekcheese from raw goat's milk. **Food Microbiology**, v. 20, p. 575–582. 2003.

RALL, V. L. M.; VIEIRA, F. P.; RALL, R.; VIEITIS, R. L.; FERNANDES JR.; A.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; ARAÚJO JR, J. P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolates from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**, v.132, p.408-413, 2008.

RAPINI, L. S.; FEIJÓ, L. D.; VERAS, J. F.; NASCIMENTO, K. F.; AMADO, J.B.; COUTO, I. P.; CARMO, L. S.; SILVA, M. C. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Pesquisa de *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Listeria* sp e *Staphylococcus* sp e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 60-65, 2002.

REIS, A. R. **Caracterização físico-química e identificação dos elementos metálicos dos queijos Minas do Serro e Minas da Serra da Canastra.** 1998. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

RILLA, N.; MARTÍNEZ, B.; DELGADO, T.; RODRÍGUEZ, A. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 23– 33. 2003.

RILLA, N.; MARTINEZ, B.; RODRIGUEZ, A. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis lactis* IPLA 729. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 5, p. 928-933, 2004.

ROBBS, P. G.; CAMPELO, J. C. F. Produção segura na cadeia alimentar do leite. In: PORTUGAL, J. A. B. et al. (Ed.) **Segurança alimentar na cadeia do leite**. Juiz de Fora-MG: Templo Gráfica e Editora Ltda., 2002. p. 51-76.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive *Staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.3217-3219, 1992.

RODRIGUES, K. L.; MOREIRA, A. N.; ALMEIDA, A. T. S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M. J.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.297-299, 2004.

RODRÍGUEZ, E.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 129–132, 1998.

RODRIGUEZ, L.; NUNEZ, F.; CORDOBA, J. J.; BERMUDEZ, E.; ASNSIO, M. A. Gram-positive, catalase cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1897-1902, 1996.

ROSEC, J.P.; GUIRAUD, J.P.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p.213-221, 1997.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal Food Microbiology**, v.77, p.61-70, 2002.

RYAN, M. P.; FLYNN, J.; HILL, C.; ROSS, R. P.; MEANEY, W. J. The Natural Food Grade Inhibitor, Lacticin 3147, Reduced the Incidence of Mastitis After Experimental Challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in Nonlactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 26625-2631. 1999.

RYAN, M. P.; REA, M. C.; HILL, C.; ROSS, R. P. An Application in Cheddar Cheese Manufacture for a Strain of *Lactococcus lactis* Producing a Novel Broad-Spectrum Bacteriocin, Lacticin 3147. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 612–619. 1996.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.22, n.5, p.458-461, 1988.

SANTANA, E. W. H.; BELLOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SILVA, J. G. **Características físicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra**. 2007. 198f. Dissertação (Mestrado em Ciencia dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Livraria Varela, 4ª edição, São Paulo, Brasil, 2010, 617 p.

SILVA, F. T.; GOMES, C. A. O. Segurança alimentar de leite e derivados: Aplicação de BPF e APPCC. IN: PORTUGAL, J. A. B.; CASTRO, M. C. D.; SILVA, P. H. F.; NEVES, B. S.; ARCURI, E. F. (Ed.) **O agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais**. Juiz de Fora-MG: Templo Gráfica e Editora Ltda., p. 107-150, 2001.

SIRVETA. **Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos**. Disponível em: < <http://www.panalimentos.org/sirvetaipz/salida2.asp> >. Acesso em 20 de abril de 2012.

SOUSA, M. J., ARDO, Y., Mc SWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis duringcheese ripening. **International Dairy Journal**. v. 11, 327–345. 2001.

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

SZCZESNIAK. A. S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v. 13, n. 4, p. 215-225. 2002

TAMAGNINI, L. M., SOUSA, G. B., GONZÁLEZ, R. D., BUDDE, C. E. Behavior of *Enterobacter amnigenus* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese: Influence of fluctuating storage temperature. **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 177–182. 2008

TOBÓN, J. F. O.; VELÁSQUEZ, H. J. C.; MEJÍA, L. G.. Caracterización Reológica y Textural Del Queso Edam. **Dyna**, Año 72, Nro. 147, pp. 33 - 45. Medellín, Noviembre de 2005. ISSN 0012-7353

TOLEDO, M. M. **Crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCK 400 e produção de nisina em meio à base de extratos vegetais**. 2000. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

TORNADIJO, M. E.; GARCÍA, M. C.; FRESNO, J. M.; CARBALLO, J. Study of *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simón cheese. **Food Microbiology**, v. 18, p. 499-509. 2001.

VARGAS, O. L.; PORTO, M. A. C.; BRITO, A. L. Características de origens para queijos naturais de Minas Gerais: municípios do Serro e São Roque de Minas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 53, n. 301-303, p. 19-49, 1998.

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

VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais. Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 410-415, 2008.

VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C. C.; SILVA, M. C. C.; MARTINS, R. T.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no Estado de Minas Gerais. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, p. 218-119. 2003.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, G.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology** v. 30, p. 271-280, 1996.

WHER, H. M.; FRANK, J. F. **Standard methods for the examination of dairy products**. 17th ed. American Public Health Association, Washington, 2004.

WIRAWAN, R. E.; KLESSE, N. A.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1148–1156. 2006.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; LIMA, A. Extensão e profundidade de proteólise em queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 44, n. 261-266, p. 50-54, jan./dez. de 1989.

YILMA, Z.; FAYE, B.; LOISEAU, G. Occurrence and distribution of species of *Enterobacteriaceae* in selected Ethiopian traditional dairy products: A contribution to epidemiology. **Food Control**, v. 18, p. 1397–1404. 2007.

YOON, J. I.; BAJPAI, V. K.; KANG, S. C. Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 109–114. 2011.

YUCEL, N.; ULUSOY, H. A Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples. **Food Control**, v. 17, p. 383–388. 2006.

YUSTE, J.; PLA, R.; CAPELLAS, M.; MOR-MUR, M. Application of high-pressure processing and nisin mechanically recovered poultry meat for microbial descontamination. **Food Control**, v. 13, p. 451-455, 2002.

ZAPICO, P.; DE PAZ, M.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. The effect of homogenization of whole milk, skim milk and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 151–157. 1999.

ZOUHAROVA, M.; RYSSANEK, D. Multiplex PCR and RLPA identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk. **Zoonoses an Public Health**, v.55, p.313-319, 2008.