

**EVANDRO MARTINS**

**ASSOCIAÇÃO DE BACTERIOCINAS E BACTÉRIAS LÁCTICAS PARA  
INIBIÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**

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

T

M386a  
2012

Martins, Evandro, 1985-

Associação de bacteriocinas e bactérias lácticas para inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal / Evandro Martins. – Viçosa, MG, 2012.  
viii, 39f. : il. ; 29cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 30-39.

1. Alimentos - Microbiologia. 2. Queijo-de-minas.
  3. *Staphylococcus aureus*. 4. *Lactococcus lactis*.
  5. Bacteriocinas. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

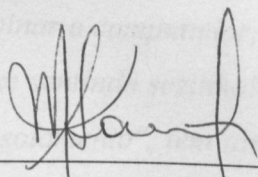
CDD 22. ed. 664.001579

EVANDRO MARTINS

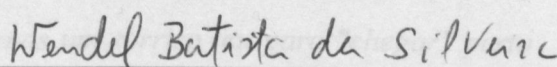
**ASSOCIAÇÃO DE BACTERIOCINAS E BACTÉRIAS LÁCTICAS PARA  
INIBIÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

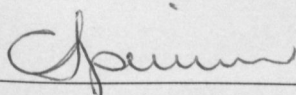
APROVADA: 10 de setembro de 2012.



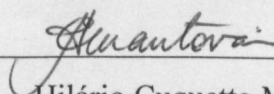
Mirjam Teresinha dos Santos



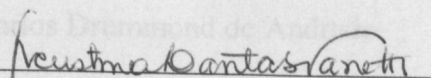
Wendel Batista da Silveira



Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto



Hilário Cuquetto Mantovani  
(Co-orientador)



Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Orientadora)

Hoje é o dia para um grande recomeço...

*“Não importa onde você parou, em que momento da vida você cansou, o que importa é que sempre é possível e necessário "Recomeçar".*

*Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo. É renovar as esperanças na vida e o mais importante: acreditar em você de novo.*

*Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado. Chorou muito? Foi limpeza da alma. Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia. Sentiu-se só por diversas vezes? É porque fechaste a porta até para os outros. Acreditou que tudo estava perdido? Era o início da tua melhora... Pois é! Agora é hora de iniciar, de pensar na luz, de encontrar prazer nas coisas simples de novo.*

*Que tal um novo emprego? Uma nova profissão? Um corte de cabelo arrojado, diferente? Um novo curso, ou aquele velho desejo de aprender a pintar, desenhar, dominar o computador, ou qualquer outra coisa?...*

*Tá se sentindo sozinho? Besteira! Tem tanta gente que você afastou com o seu "período de isolamento", tem tanta gente esperando apenas um sorriso teu para "chegar" perto de você... Recomeçar! Hoje é um bom dia para começar novos desafios..."*

Adaptado de Recomeçar de Carlos Drummond de Andrade

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo árduo ofício de viver e pela vontade inquietante de buscar o improvável. Agradeço a Deus por ser maior que as expectativas e por ter encontrado abrigo naqueles que chamo de família, amor e amigos.

Agradeço aos meus pais, Raimundo e Maria Lúcia, pelo empenho e valores de uma vida toda, pela incansável e às vezes não compreendida proteção. Agradeço às minhas outras mães, Luciana e Ana Lúcia, que me permitiram uma boa infância ainda que os tempos não fossem tão bons assim. Agradeço pelos novos familiares, Fabrício e Rafael, em especial Fabrício, por ser um eterno perdedor no xadrez.

Agradeço aos amigos que leram minha história no momento em que foi escrita (Marcos Roberto, Luíza, Ludmila, Onara, Vanelle, Túlio e Leo) e, agradeço Ester, Fernando, Letícia e Thaís, por terem sido conforto e festa no melhor dia da minha vida. Agradeço os amigos de todos os laboratórios, Cláudia, Flávio, Gardênia, Ana Íris, Adriana, Camila, Emilene, Wemerson, Fernandas, Aline, Elsa, Robson, Caio, Mateus, Sabrina, Eliane, Júlio, Marliane ..., que ajudaram a construir essa dissertação e, mais que isso, apagaram todo o cansaço do dia com risadas pelos corredores. Agradeço minha orientadora, Maria Cristina, pelas correções, lições e pelas longas conversas nos momentos em que disse: não sei o que fazer!

Por último, agradeço ao acaso, aos desencontros e às oportunidades que me levaram até a mulher que conheço como amor. Agradeço Ramila pela compreensão, companheirismo, pelo carinho e pelos momentos de felicidade. Obrigado Ramila pelo simples fato de existir e por preencher os meus melhores sonhos. Agradeço a todos, por isto e por tudo....

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Queijo Minas frescal .....	3
2.2. <i>S. aureus</i> em queijo Minas frescal .....	4
2.3. Bacteriocinas .....	6
2.3.1. Nisina .....	9
2.3.2. Bovicina HC5 .....	11
2.4. Bactérias Lácticas .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
3.1. Micro-organismos e condições cultivo .....	14
3.2. Preparo das bacteriocinas e determinação da atividade .....	15
3.3. Determinação do efeito de <i>L. lactis</i> associado às bacteriocinas sobre o crescimento de <i>S. aureus in vitro</i> .....	16
3.4. Determinação do efeito das bacteriocinas sobre a viabilidade de <i>S. aureus</i> em leite e em queijo Minas frescal .....	17
3.5. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas .....	18
3.6. Análises estatísticas .....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	19
4.1. Efeito de bovicina HC5, nisina e <i>L. lactis</i> , sobre <i>S. aureus</i> .....	19
4.2. Efeito de bovicina HC5 e nisina sobre a viabilidade de <i>S. aureus</i> em LDR .....	23
4.3. Efeito das bacteriocinas e de cultura <i>starter</i> sobre a viabilidade de <i>S. aureus</i> em queijo Minas frescal .....	25
5. CONCLUSÕES .....	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30

## RESUMO

MARTINS, Evandro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2012.

**Associação de bacteriocinas e bactérias lácticas para inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.

O queijo Minas frescal é um dos produtos mais populares do Brasil e suas características nutricionais não são limitantes para o crescimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos. Surto de intoxicação alimentar envolvendo queijos Minas frescal contaminados com *Staphylococcus aureus* são frequentes e, por esse motivo, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias que controlem o crescimento desse patógeno no produto. Em razão disso, o objetivo desse trabalho foi o de avaliar o efeito das bacteriocinas bovicina HC5, nisina e de bactérias lácticas sobre o crescimento e produção de enterotoxinas por *S. aureus*. O crescimento das estirpes de *S. aureus* ATCC 6538, EMBRAPA 4018 e FRI 722 foi acompanhado em caldo tripticase e soja (TSB) e em leite em pó desnatado reconstituído a 10 % (LDR 10%), a 37 °C, em presença de bovicina HC5 e, ou nisina e *Lactococcus lactis* ATCC 19435. Amostras de queijo Minas frescal produzido com cultura *starter* (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*) foram inoculadas com, aproximadamente,  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> das estirpes de *S. aureus* e adicionadas de 1200 UA.g<sup>-1</sup> das bacteriocinas. A presença das bacteriocinas aumentou a fase lag e este efeito foi mais acentuado na presença de nisina. Embora as bacteriocinas tenham apresentado efeito inibidor inicial, *S. aureus* reassumiu o crescimento e alcançou população final similar ao do tratamento controle, sem bacteriocinas, após 24 h de incubação. A produção de enterotoxina pelas estirpes de *S. aureus* avaliadas neste estudo foi detectada no meio TSB tanto na ausência como na

presença de bacteriocinas adicionadas ao meio de cultura. O cocultivo de *S. aureus* e *L. lactis* não interferiu no crescimento do patógeno, porém foi suficiente para inibir a produção de enterotoxinas. Em LDR 10 %, as bacteriocinas combinadas a  $1200 \text{ UA.mL}^{-1}$  exerceram efeito bactericida sobre as estirpes avaliadas de *S. aureus* e não foi possível recuperar sobreviventes pela técnica de contagem em placas após 96 h de incubação. A adição das bacteriocinas combinadas em queijo Minas frescal reduziu a população inicial de *S. aureus*, bactérias *starter* e da microbiota contaminante do queijo. A presença de enterotoxinas não foi detectada nos queijos produzidos com culturas *starter*, adicionados ou não das bacteriocinas nisina e bovicina HC5.

## ABSTRACT

MARTINS, Evandro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2012.

**Association of bacteriocins and lactic bacteria to inhibit *Staphylococcus aureus* in Minas fresh cheese.** Advisor: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisor: Hilário Cuquetto Mantovani.

The Minas fresh cheese is one of Brazil's most popular products and their nutritional characteristics are not limiting to the growth of pathogenic and spoilage microorganisms. Outbreaks of food poisoning involving Minas fresh cheese contaminated with *Staphylococcus aureus* are frequent and, therefore, it becomes necessary to develop new strategies to control the growth of this pathogen in the product. For this reason, the aim of this study was to evaluate the effect of bovicin HC5, nisin and lactic bacteria on the growth and production of enterotoxins by *S. aureus*. The growth of strains of *S. aureus* ATCC 6538, EMBRAPA 4018, FRI 722 was conducted in tryptic soy broth (TSB) and reconstituted skimmed milk powder 10% (RSM 10%), at 37 °C, in the presence of bovicin HC5 and, or nisin and *Lactococcus lactis* ATCC 19435. Minas fresh cheese samples produced with *starter* culture (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *Cremoris*) were inoculated with approximately  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> of strains of *S. aureus* and were containing added of 1200 UA.g<sup>-1</sup> of bacteriocins. The presence of bacteriocins increased lag phase and nisin showed this effect more pronounced. Although the bacteriocins have shown initial inhibitory effect, *S. aureus* started to grow again and achieved the final population similar to the control treatment, without bacteriocins, after 24 h incubation. The enterotoxin production by strains of *S. aureus* evaluated in this study was detected in TSB medium both in the

absence or presence of bacteriocins added to the culture medium. The coculture of *S. aureus* and *L. lactis* did not affect the growth of the pathogen, but it was sufficient to inhibit the production of enterotoxins. In RSM 10%, bacteriocins combined to 1200 UA.mL<sup>-1</sup> exerted bactericidal effect on the strains of *S. aureus* and it was not possible to recover survivors by plate count technique after 96 h incubation. The addition of bacteriocins combined in Minas fresh cheese reduced the initial population of *S. aureus*, *starter* bacteria and contaminant microbiota of the cheese. The presence of enterotoxins was not detected in cheeses produced with *starter* cultures, added or not of bacteriocins nisin and bovicin HC5.

## 1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas frescal é um dos produtos mais populares do Brasil e é produzido a partir da coagulação enzimática do leite de vaca pasteurizado. Por ser um queijo de alta umidade e apresentar características nutricionais favoráveis ao crescimento microbiano, esse produto é altamente perecível, mesmo sob refrigeração.

A produção artesanal associada à negligência das práticas de higiene aumentam a microbiota deterioradora do queijo Minas frescal assim como, a probabilidade de ocorrência de patógenos alimentares.

A incidência de patógenos como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Staphylococcus aureus* em queijos em razão das condições insatisfatórias de produção, transporte e comercialização, é frequente. Todavia, no caso específico do queijo Minas frescal, *S. aureus* é o patógeno mais preocupante em função da maior incidência no produto. A ingestão de alimentos contaminados com as enterotoxinas A, B, C, D, E e F produzidas por *S. aureus* pode causar ação emética e diarreica em humanos. Essas enterotoxinas são proteínas termorresistentes e não são inativadas pelo processo de pasteurização.

Para controlar o desenvolvimento de *S. aureus* em queijos, uma alternativa seria a utilização de culturas *starter* que modificam as características intrínsecas do produto, tornando-o menos favorável ao crescimento bacteriano. Além disso, o Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal (1996) preconiza o uso de nisina como agente conservante.

Nisina tem efeito bactericida sobre *S. aureus* em alimentos, no entanto, esse patógeno pode tornar-se resistente quando exposto a baixas concentrações dessa bacteriocina. Portanto, a investigação de outras bacteriocinas para inibição de *S. aureus* é uma estratégia promissora para a garantia da qualidade microbiológica do queijo Minas frescal.

A bacteriocina bovicina HC5, produzida por *Streptococcus bovis* HC5, pode ser mais efetiva no controle de patógenos, entre eles *S. aureus*, uma vez que ainda não foi

demonstrada a ocorrência de resistência à bovicina. Além disso, a associação de tratamentos e, ou de bacteriocinas que apresentem efeito sinérgico poderia aumentar ainda mais as barreiras contra o crescimento bacteriano.

Considerando a incidência frequente de *S. aureus* em queijo Minas frescal e o potencial antimicrobiano da associação de bacteriocinas e culturas *starter*, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito da bovicina HC5, nisina e bactérias lácticas sobre o crescimento e a produção de enterotoxinas em estirpes de *S. aureus* em queijo Minas frescal.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Queijo Minas frescal

O consumo nacional de queijos cresceu 30,8 % *per capita* entre 2000 e 2008 e, em 2009, o Brasil foi o terceiro maior produtor de queijos no mundo com 5,2 % da produção brasileira representada pelo queijo Minas frescal (LIMA FILHO, 2010).

O queijo Minas frescal apresenta sabor agradável, consistência macia e coloração esbranquiçada. Trata-se de um queijo semi-gordo, de umidade superior a 55 % e pH em torno de 6,5. Sua produção se inicia pela coagulação enzimática do leite de vaca pasteurizado realizada com coalho e, ou outras enzimas coagulantes, complementadas ou não com a adição de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997). No entanto, as características físico-químicas e microbiológicas desse queijo podem ser alteradas em função da qualidade da matéria-prima empregada para produção. Queijos produzidos com leites com baixa contagem de células somáticas (CCS) apresentam menores contagens de bactérias mesófilas aeróbias e pH ligeiramente mais alto quando comparados com os queijos produzidos com leite contendo CCS superior a 80.000 células.mL<sup>-1</sup> (ANDREATTA, 2006).

Em razão das características nutricionais e do alto teor de umidade, esse produto é altamente perecível mesmo sob refrigeração, uma vez que favorece o crescimento contínuo da microbiota psicrotrófica, lipolítica, proteolítica e de bactérias lácticas durante todo período de estocagem (SILVA et al., 2003; ROCHA et al., 2006, SANGALETTI et al., 2009; VISOTTO et al., 2011). A fabricação artesanal e a negligência nas práticas de higiene podem aumentar ainda mais a contaminação microbiana inicial, o que interfere diretamente na vida-de-prateleira, na qualidade do produto e na segurança à saúde do consumidor.

A qualidade do queijo Minas frescal envolve vários fatores que vão desde a ordenha, na qual a sanidade do animal é importante, até as condições de higiene dos manipuladores, equipamentos e utensílios que entram em contato direto com o produto

(QUINTANA e CARNEIRO, 2007). O não cumprimento das práticas de higiene durante a produção, transporte e armazenamento, pode aumentar não só o número da microbiota deterioradora, como também, a probabilidade de ocorrência de patógenos.

No Brasil, apesar da deficiência no sistema de coleta de dados epidemiológicos, há registros de que as intoxicações e infecções alimentares causaram a internação de 26.588 pessoas no ano de 2000, sendo o queijo um dos alimentos comumente associados às doenças de origem alimentar (VIEIRA et al., 2008).

Queijos podem ser veículos de bactérias causadoras de infecções como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e bactérias produtoras de toxinas, tais como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. No entanto, no caso específico do queijo Minas frescal, a incidência de *S. aureus* é frequente e extremamente preocupante (DE BUYSER et al., 2001; LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; SILVA et al., 2003; SALOTTI et al., 2006; VIEIRA et al., 2008; CAMPOS et al., 2009; SANGALETTI et al., 2009; PINTO et al., 2011).

## **2.2. *S. aureus* em queijo Minas frescal**

*S. aureus* é encontrado no ambiente, assim como na pele e nas mucosas de humanos e animais. A contaminação de produtos lácteos com este patógeno pode ocorrer diretamente pelo contato do leite com o animal infectado ou em razão de prática higiênica precária durante o processo de produção, distribuição e, ou estocagem dos produtos (CAN e ÇELIK, 2012). Por esses motivos, esse patógeno está frequentemente presente no leite e em queijos e, muitas vezes, associado a surtos de intoxicação de origem alimentar.

Almeida Filho e Nader Filho (2000) constataram que 50 % das amostras de queijo Minas frescal coletadas apresentaram níveis inaceitáveis de *S. aureus*. Loguercio e Aleixo (2001) verificaram que 96,67 % das amostras apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva superiores ao estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), que é de  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> e, dentre essas amostras, 43,33 % foram classificadas como potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar. Em estudo similar, Salotti et al. (2006) verificaram que 20 % das amostras artesanais e 10 % das amostras industriais de queijo Minas frescal estavam em desacordo com a legislação quanto à enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva. Pinto et al. (2011) obtiveram resultados mais preocupantes, uma vez que todas as

amostras artesanais e 25 % das amostras de queijo Minas frescal inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Estadual e Federal apresentavam números inaceitáveis de *S. aureus*. Resultados semelhantes também foram observados por Ferreira et al. (2011) que verificaram que 90 % das amostras de queijo Minas frescal eram impróprias ao consumo humano em função da contaminação por *S. aureus*.

Segundo Spanu et al. (2012), a maioria das estirpes de *S. aureus* detectadas em queijos tem origem animal ou humana e, dessa forma, medidas simples como a adoção das Boas Práticas de Fabricação (BPF) seriam eficientes para reduzir a presença desse patógeno no queijo Minas frescal. No entanto, a produção artesanal associada à falta de informação e à carência na fiscalização ainda são os maiores entraves para o fornecimento de produtos microbiologicamente seguros. Em combinação com as BPF, a tecnologia de barreiras é uma estratégia que pode ajudar no controle de *S. aureus* no queijo Minas frescal.

Isolados de *S. aureus* de queijo podem apresentar variados graus de resistência a antibióticos assim como conter diferentes genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas (SE's), incluindo *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* e, por apresentar tais genes, é comum a ocorrência de casos de intoxicação alimentar envolvendo queijos e SE's (FREITAS, 2005; ERTAS et al., 2010; CAN e ÇELIK, 2012).

As SE's são proteínas termorresistentes e, portanto, não são inativadas pelo processo de pasteurização. Além disso, queijos apresentam condições nutricionais que favorecem o crescimento de *S. aureus*, aumentando a probabilidade de ocorrência de SE's no produto (VIÇOSA et al., 2010; FERREIRA et al., 2011).

O mecanismo da expressão dos genes de SE's ainda não foi esclarecido, entretanto, Even et al. (2009) encontraram evidências sobre a dinâmica dessa expressão em *S. aureus* MW2. Segundo os autores, os genes *sea* e *sek* são expressos principalmente durante a fase exponencial, *seg2* é expresso durante todo o cultivo, enquanto que *sec*, *sel*, e *seh* são induzidos nas fases de desaceleração e estacionária de crescimento. Esses autores também evidenciaram que a expressão de *seg* está diretamente ligada ao mecanismo de *quorum sensing*. Cretenet et al. (2011) verificaram que a matriz alimentar e *Lactococcus lactis* afetam a expressão de genes de SE's em queijo. Segundo os pesquisadores, a presença de *L. lactis* inibe fortemente a expressão de *sek*, *seg2* e *seh*, enquanto estimula a expressão de *sea*. Esses resultados justificam a elevada prevalência de SEA em surtos associados ao consumo de produtos lácteos uma vez que *L. lactis* não inibe a expressão de *sea*.

A incidência elevada de *S. aureus* em queijos frescos alerta para o risco de intoxicações alimentares e aponta para a necessidade de medidas preventivas para garantir a saúde pública. Nesse sentido, o Regulamento Técnico do MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal (1996) permite o uso de bactérias lácticas e de nisina em queijo Minas frescal. Os produtos do metabolismo das bactérias lácticas alteram as características intrínsecas do queijo, tornando-o menos propício ao crescimento bacteriano, enquanto que as bacteriocinas, como a nisina, têm efeito bactericida sobre vários micro-organismos, incluindo patógenos alimentares (DEEGAN et al., 2006). A associação de bacteriocinas e bactérias lácticas pode ser uma estratégia promissora no controle de *S. aureus* em queijos frescos.

### **2.3. Bacteriocinas**

Bacteriocinas são proteínas biologicamente ativas com modo de ação bactericida e inclui proteínas que variam quanto ao tamanho, modo de ação, alvos microbianos e mecanismos de imunidade. Esse sistema de defesa bacteriano é abundante e diversificado, podendo ser encontrado tanto em bactérias gram-negativas, como no caso das colicinas em *E. coli*, quanto em bactérias gram-positivas, representado pelos lantibióticos produzidos pelas bactérias do ácido láctico (RILEY e WERTZ, 2002).

Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são peptídeos antimicrobianos termicamente estáveis sintetizados ribossomicamente. Micro-organismos produtores são imunes a sua própria bacteriocina por possuírem proteínas de imunidade específica. No entanto, esses peptídeos podem atuar em bactérias pertencentes a uma mesma espécie (espectro de ação restrito) e, ou em bactérias de diferentes gêneros (amplo espectro de ação) (NAGAO et al., 2006).

Cotter et al. (2005) propuseram a classificação das bacteriocinas em duas categorias: lantibióticos contendo lantionina (classe I) e bacteriocinas não contendo lantionina (classe II). Os lantibióticos (classe I) são pequenos peptídeos, com 19 a 38 resíduos de aminoácidos e que possuem os resíduos de lantionina ou  $\beta$ -metilantionina. Estes resíduos incomuns formam ligações covalentes entre os aminoácidos, o que resulta em anéis internos na molécula. Além disso, os lantibióticos podem conter outros resíduos incomuns que resultam de modificações pós-traducionais, incluindo a substituição de D-alaninas por L-serinas. Em geral, os lantibióticos catiônicos anfifílicos alongados, por exemplo, nisina, são ativos por meio da formação de poros

que conduzem à dissipação do potencial de membrana e ao efluxo de metabólitos pequenos. Em contraste, lantibióticos globulares, por exemplo, mersacidina, atuam por meio da inibição enzimática. Os genes relacionados à biossíntese de lantibióticos são genericamente agrupados no *locus lan* sendo os produtos destes genes assim classificados: pré-peptídeo (LanA), modificação enzimática (LanB, C /LanM, LanD, e LanJ), protease de processamento (LanP e LanT), transportador ABC (LanT), proteína de imunidade (LanFEG, LanI e LanH) e proteínas regulatórias (LanR, LanK, LanQ e LanX) (NAGAO et al., 2006).

Bacteriocinas da classe II são pequenos peptídeos com menos de 10 kDa, estáveis ao calor e, ao contrário dos lantibióticos, não são sujeitos a grandes modificações pós-traducionais. A maioria das bacteriocinas da classe II induz a permeabilização da membrana e subsequente extravasamento de moléculas (COTTER et al., 2005). A classe II pode ser dividida em cinco subgrupos: classe IIa, similares à pediocina e bacteriocinas com proeminente atividade anti-listeria (ex: pediocina PA-1); classe IIb, bacteriocinas de dois peptídeos (ex: plantaricina EF); classe IIc, bacteriocinas que não foram incluídas em nenhuma das outras subclasses (ex: lactococcina A); classe IId, bacteriocinas sem sequência líder e classe IIe, bacteriocinas formadas a partir da degradação de grandes proteínas (NES et al., 2007).

Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas possuem estreito ou amplo espectro de ação, mas em geral, essas bacteriocinas atuam principalmente sobre bactérias gram-positivas. Atividade contra bactérias gram-negativas tem sido demonstrada, mas geralmente, em situações em que a integridade da membrana externa está comprometida (PRUDÊNCIO, 2009; BURGOS et al., 2012).

Bacteriocinas compreendem um grupo de compostos de grande interesse e podem substituir tratamentos médicos ou complementar a ação de antibióticos tradicionais (TODOROV e DICKS, 2009). Além disso, esses compostos podem ser utilizados como forma de controle de patógenos em alimentos para garantir a integridade físico-química e influenciar a provável população final em sistemas alimentares complexos (DELBES-PAUS et al., 2010).

Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas como, nisina, pediocina PA-1, lacticina 3147 e enterocinas, podem ser potencialmente úteis para a indústria de laticínios (SOBRINO-LÓPEZ e MARTÍN-BELLOSO, 2008). Embora os fabricantes de queijo tenham usado bacteriocinas por muitos anos, a combinação de bacteriocinas com tratamentos não térmicos, como alta pressão, campos elétricos pulsados e outros

antimicrobianos, abre possibilidades inovadoras para aplicação em produtos lácteos. Bacteriocinas combinadas ou não com outros tratamentos, podem representar um avanço promissor para a segurança microbiológica e para a manutenção das propriedades sensoriais de produtos lácteos. No entanto, estudos sobre a caracterização bioquímica, a influência da matriz alimentar e o espectro de ação microbiana precisam ser mais intensificados para identificar os possíveis inconvenientes para a ampliação do uso futuro das bacteriocinas.

Várias bacteriocinas produzidas por BAL têm potencial de aplicação na conservação de alimentos e o uso desses compostos na indústria pode auxiliar na redução de conservantes químicos, assim como na intensidade de tratamentos térmicos, resultando em alimentos mais naturalmente preservados e ricos em propriedades sensoriais e nutricionais. Isto pode ser uma alternativa para satisfazer a crescente demanda dos consumidores por produtos seguros, frescos, prontos para consumo e minimamente processados, assim como, desenvolver novos produtos, menos acidificados ou com menor teor de sal.

Bacteriocinas podem ser adicionadas em alimentos na forma de preparações concentradas ou serem produzidas *in situ* por culturas *starter* produtoras de bacteriocinas, ou ainda, imobilizadas em embalagens e aplicadas de forma sinérgica com outros agentes antimicrobianos, incluindo conservantes químicos, compostos fenólicos naturais ou outras proteínas antimicrobianas (GÁLVEZ et al., 2007).

Sugere-se que as bacteriocinas não sejam empregadas como uma única barreira contra o crescimento microbiano, mas sim como um obstáculo adicional para reduzir a probabilidade de doenças de origem alimentar (DEEGAN et al., 2006).

Apesar da grande aplicabilidade dos peptídeos antimicrobianos em alimentos, micro-organismos causadores de doença de origem alimentar podem desenvolver mecanismos de resistência a esses peptídeos (HIRON et al., 2011). Dessa maneira, a associação das bacteriocinas com outros tratamentos ou outras bacteriocinas, pode ser uma estratégia válida no controle do crescimento bacteriano em alimentos (MACWANA e MURIANA, 2012).

### 2.3.1. Nisina

A nisina é um lantibiótico produzido por estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis* com 34 resíduos de aminoácidos que totalizam massa molecular de 3,5 kDa (SOBRINO-LÓPEZ e MARTÍN-BELLOSO, 2008). Esse lantibiótico foi comercializado pela primeira vez na Inglaterra em 1953, no entanto, somente em 1988 foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* nos EUA, como substância GRAS e, desde então, tem sido aprovado para uso em mais de 48 países (DEEGAN et al., 2006).

A ampla utilização do uso de nisina em alimentos está relacionada aos benefícios para a qualidade do produto como também às descobertas em torno do seu mecanismo de ação sobre micro-organismos. Nisina se liga ao lipídeo II da membrana microbiana o que promove dois mecanismos de ação: a prevenção da síntese de peptideoglicano e a formação de poro (COTTER et al., 2005). Nisina possui dois anéis que são essenciais para a interação via ligação de hidrogênio com o pirofosfato do lipídeo II. Os N-terminais amida da nisina interagem primeiro com a metade pirofosfato do lipídeo II como uma molécula de ancoragem (NES et al., 2007). A orientação transmembrana da nisina envolve a inserção da parte C-terminal para a formação do poro e conseqüente efluxo intracelular de moléculas como ATP e aminoácidos (COTTER et al., 2005). Este último modo de ação torna a nisina altamente potente em concentrações nanomolares contra muitas bactérias gram-positivas (NAGAO et al., 2006).

A nisina controla o crescimento de vários micro-organismos em produtos lácteos e sua utilização tem sido amplamente avaliada na fabricação de queijos de baixo pH. O uso de culturas produtoras e resistentes à nisina parece ser uma alternativa viável de incorporação e manutenção desta bacteriocina durante a fabricação de queijos com a finalidade de controlar patógenos e deterioradores em alimentos (SOBRINO-LÓPEZ e MARTÍN-BELLOSO, 2008).

Concentrações de nisina em torno de 500 unidades internacionais por mililitro ( $UI.mL^{-1}$ ) reduzem até 2 ciclos log na população de *S. aureus* em queijo, além de pouco influenciar os parâmetros físico-químicos, as características mecânicas e a cor dos queijos (PINTO et al., 2011). Nisina também tem demonstrado atividade inibitória contra *L. monocytogenes* em queijo Minas frescal quando encapsulada em lipossomos (MALHEIROS et al., 2012). Acredita-se que essa tecnologia possa ser uma alternativa promissora para a inoculação de bacteriocinas em produtos lácteos. Todavia, a

associação de nisina com tratamentos térmicos tem demonstrado bons resultados no controle de patógenos em alimentos uma vez que o calor e a bacteriocina combinados apresentam efeito sinérgico (AL-HOLY et al., 2012).

Embora nisina exerça efeito inibidor do crescimento bacteriano em produtos lácteos, patógenos alimentares como *S. aureus* podem facilmente adquirir resistência a esse lantibiótico. Este fato foi constatado por Hiron et al. (2011) que demonstraram que *S. aureus* apresenta mecanismos de adaptação à nisina por meio de um sistema de dois componentes (BraS/BraR) associado à dois transportadores, BraDE e VraDE, que funcionam como sinalizador da presença de nisina e módulo de desintoxicação, respectivamente. No entanto, com a finalidade de evitar a seleção de mecanismos de resistência, uma alternativa seria a associação da nisina com outros compostos com atividade antimicrobiana, incluindo outras bacteriocinas. O sinergismo entre compostos que apresentem diferentes atividades antimicrobianas pode representar uma barreira eficiente no controle de micro-organismos.

Pimentel Filho (2010) demonstrou que nisina e bovicina HC5, uma bacteriocina produzida por *Streptococcus bovis* HC5, foram efetivas no controle de *L. monocytogenes* Scott A e *S. aureus* em queijo Minas frescal. O uso das bacteriocinas combinadas a 600 UA.g<sup>-1</sup> permite reduzir o número de células viáveis de 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* Scott A para valores abaixo de 1 UFC. 25 g<sup>-1</sup> em queijo Minas frescal após nove dias de estocagem a 4 °C. Em contrapartida, apesar do efeito bactericida observado sobre *S. aureus*, o patógeno foi mais resistente que *L. monocytogenes* e, além disso, as bacteriocinas não impediram a produção de SE's nos queijos armazenados por 30 dias a 15 °C. Já a associação de nisina e reuterina apresentou efeito bactericida sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus* em leite refrigerado (ARQUÉS et al., 2011). A associação de nisina, EDTA e sais de ácidos orgânicos ou nisina e ramnolipídeos apresentaram resultados satisfatórios no controle de *L. monocytogenes* em alimentos (NORHANA et al., 2012; MAGALHÃES e NITSCHKE, 2013).

Embora o uso isolado de nisina em alimentos para o controle de micro-organismos seja efetivo, a combinação de nisina com outros compostos antimicrobianos parece ser uma alternativa mais efetiva. Em razão do efeito bactericida observado, a associação de nisina e bovicina HC5 apresenta potencial aplicação em alimentos, sobretudo em produtos lácteos.

### 2.3.2. Bovicina HC5

Como muitas bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico, bovicina HC5 é um peptídeo catiônico produzido por *S. bovis* HC5 que possui estabilidade ao oxigênio, resistência à alfa-quimiotripsina, à proteinase K e às altas temperaturas (MANTOVANI et al., 2002; HOULIHAN et al., 2004). Trata-se de um lantibiótico composto por 22 resíduos de aminoácidos com mecanismo de ação vinculado ao efluxo de potássio de células sensíveis (MANTOVANI e RUSSELL, 2008; PAIVA et al., 2012).

Bovicina HC5 apresenta amplo espectro de ação podendo atuar tanto sobre células vegetativas quanto sobre esporos bacterianos. O efeito desse lantibiótico sobre a germinação de esporos e a sensibilidade térmica de *Alicyclobacillus acidoterrestris* foi testada em polpa de manga (pH 4,0) adicionada de 80 UA.mL<sup>-1</sup> da bacteriocina (CARVALHO et al., 2008). Bovicina HC5 apresentou atividade bactericida contra células vegetativas de *A. acidoterrestris* em diferentes valores de pH e apresentou atividade esporicida contra endósporos do mesmo micro-organismo (CARVALHO et al., 2008).

O efeito de bovicina HC5 sobre o crescimento de estirpes de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *S. aureus* também foi acompanhado em caldo tripticase e soja (TSB) e em leite integral comercialmente esterilizado (UAT) (PIMENTEL FILHO, 2010). Em caldo TSB, bovicina HC5 aumentou a fase lag e reduziu a velocidade específica de crescimento das estirpes de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *S. aureus*. Todavia a inibição completa do crescimento microbiano foi obtida em concentrações superiores a 100 UA.mL<sup>-1</sup> da bacteriocina (PIMENTEL FILHO, 2010). Em leite UAT, concentrações de bovicina HC5 superiores a 400 UA.mL<sup>-1</sup> apresentaram efeito bactericida sobre *L. monocytogenes* Scott A e *L. innocua* LMA83, porém, *S. aureus* ATCC 6538 foi resistente às concentrações avaliadas (PIMENTEL FILHO, 2010).

Considerando a possibilidade de adaptação de alguns micro-organismos à nisina, Mantovani e Russell (2003) demonstraram que a bovicina HC5 pode ser mais efetiva no controle de patógenos uma vez que bactérias que se tornaram resistentes à nisina não foram resistentes à bovicina HC5, mesmo quando expostas por sucessivas vezes a doses subletais. Essa constatação é um grande incentivo para a utilização da bovicina HC5 em alimentos associada ou não à nisina. Embora os resultados sejam promitentes, outros

estudos precisam ser conduzidos para a completa compreensão do efeito da bovicina HC5 sobre a microbiota dos alimentos e a segurança alimentar.

#### 2.4. Bactérias Lácticas

A fermentação de matérias-primas perecíveis por bactérias tem sido usada durante séculos para preservar o valor nutritivo e aumentar a vida útil dos alimentos. Ácido láctico e outros produtos do metabolismo de BAL, incluindo peróxido de hidrogênio, diacetil e acetoína, atuam como bioconservantes que alteram as propriedades intrínsecas dos alimentos tornando-os menos propícios ao crescimento microbiano. Este fato foi constatado por Delbes-Paus et al. (2010), que observaram que o peróxido de hidrogênio produzido por *Lactococcus garvieae* em queijo inibe grupos microbianos como enterococos, *Leuconostoc* produtores de dextrano, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* mesófilos heterofermentativos, bactérias gram e catalase positivas, Enterobacteriaceae e *S. aureus*.

Além da ação inibitória do peróxido de hidrogênio, o ácido láctico produzido por *Lactobacillus* spp., e *Lactococcus* spp. também pode inibir patógenos alimentares como *S. aureus* e *L. monocytogenes* em produtos lácteos (CHIODA et al., 2006; RADOVANOVIC e KATIC, 2009).

Em adição ao efeito antimicrobiano dos produtos do metabolismo das BAL, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* são capazes de produzir bacteriocinas como nisina A, nisina Z, lactococcina 972 ou lactococcina G e essa produção é estimulada pela alta densidade populacional e inibida em altas concentrações de sal e surfactantes (ALEGRÍA et al., 2010; CASTRO et al., 2011).

Bacteriocinas produzidas por BAL são capazes de inibir *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella* sendo que esses peptídeos antimicrobianos apresentam atividade tanto em meio de cultivo quanto em alimentos (HAMAMA et al., 2002; BROMBERG et al., 2006; GUESSAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008; KHALID et al., 2011)

Hamama et al. (2002) verificaram que *L. lactis* subsp. *lactis* UL730 produtor de nisina inibe o crescimento de *S. aureus* J10 em queijo fresco, no entanto, quando os queijos foram preparados com leite contendo  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *S. aureus*, o patógeno persistiu durante a estocagem e produziu SEC no produto. Também foi verificado que *L. lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 produz uma bacteriocina termo-estável capaz de inibir

*Lactobacillus helveticus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis* (BROMBERG et al., 2006). Já a bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *Lactis* biovar *diacetyllactis* (Lc8) reduziu 5 ciclos log da população de *S. aureus* em leite reconstituído, porém, quando *S. aureus* e Lc8 foram cocultivados, a mesma redução ocorreu mais rapidamente em função da associação da bacteriocina e do ácido produzidos pelo Lc8 (GUESSAS et al., 2007). Esses resultados demonstram que as bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas podem ser úteis para a elaboração de fermentos com características protetoras contra a deterioração e proliferação de patógenos alimentares.

Além de inibir o crescimento bacteriano, tem sido demonstrado que as bactérias lácticas podem interferir na expressão gênica de patógenos de origem alimentar como *S. aureus*, impedindo a produção de SE's (EVEN et al., 2009; CRETENET et al., 2011; SERIDAN et al., 2012).

A alta prevalência de SEA em surtos associados com consumo de produtos lácteos contaminados pode estar relacionada com a falta de inibição da expressão de *sea* por *L. lactis*, enquanto que a expressão de genes que codificam outras enterotoxinas, como *sec*, é afetada (EVEN et al., 2009). Em meio de cultivo *L. lactis* reprime a expressão de *sec*, *seg* e *sel*, mas pouco afeta a expressão de *sek*, *seg2* e *seh* enquanto que a expressão de *sea* é favorecida na fase estacionária (EVEN et al., 2009).

A associação de bacteriocinas e bactérias lácticas tem se mostrado benéfica no que diz respeito à inibição de patógenos em produtos lácteos. A utilização de culturas *starter* e o monitoramento da fermentação podem reduzir significativamente a presença de patógenos como *L. monocytogenes* e *S. aureus* em queijos frescos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Patógenos Alimentares do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

#### 3.1. Micro-organismos e condições de cultivo

Na Tabela 1 estão listados os micro-organismos utilizados neste trabalho assim como a sua origem.

*S. bovis* HC5, produtor de bovicina HC5, foi cultivado anaerobicamente em meio basal a 39°C por 24 h, como descrito por Mantovani e Russell (2001).

**Tabela 1.** Micro-organismos utilizados e sua respectiva origem

Bactérias	Origem	Enterotoxina produzida	Procedência
<i>S.bovis</i> HC5	Rúmen bovino	-	James B. Russell
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Lesão humana	SEK	ATCC*
<i>S. aureus</i> FRI 722	-	SEA, SEB, SEQ, SEK	Universidade de Wisconsin, EUA
<i>S. aureus</i> EMBRAPA 4018	Mastite bovina	SED	EMBRAPA**
<i>L. lactis</i> ATCC 19435	-	-	ATCC*

\*ATCC = *American Type Culture Collection*

\*\*EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

O micro-organismo indicador da atividade das bacteriocinas, *L. lactis* ATCC 19435, foi cultivado em meio MRS (HiMedia, Índia) a 37 °C por 24 h.

As estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus* ATCC 6538, FRI 722 e EMBRAPA 4018 foram cultivadas em caldo tripticase e soja – TSB (Merck, Alemanha) ou infusão cérebro coração- BHI (Oxoid, Inglaterra) e incubadas em B.O.D. (Modelo 347 CD, Fanem, São Paulo) a 37°C por 24 h.

### 3.2. Preparo das bacteriocinas e determinação da atividade

A produção de bovicina HC5 foi realizada segundo a metodologia proposta por Carvalho (2006). Foi adicionado 1% da cultura ativa de *S. bovis* HC5 em meio basal anaeróbico e incubado a 39 °C por 14 a 16 h em banho-maria sem agitação. Após incubação, o pH do meio de cultura foi ajustado para 6,5 com NaOH 1 M e a cultura de células foi aquecida a 70 °C por 30 min. Células de *S. bovis* HC5 foram coletadas por centrifugação a 1700 g por 15 min a 4°C (Sorvall® RT 6000 D, GMI, Minnesota, EUA) e ressuspendidas em solução salina 100 mM pH 2,0. O pH da suspensão de células foi ajustado para 2,0 com solução de HCl 1 M e, em seguida, aquecida a 100 °C por 15 min. Uma nova etapa de centrifugação foi realizada (1700 g por 15 min a 4 °C) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a – 80 °C. Após o congelamento completo, o extrato de bovicina HC5 foi liofilizado e ressuspendido em solução de fosfato de sódio 5mM, pH 2,0.

A atividade antimicrobiana da bovicina HC5 foi realizada segundo Hoover e Harlander (1993). Diluições seriadas 1:1 do extrato de bovicina HC5 em solução de fosfato de sódio 5mM, pH 2,0 foram realizadas e, alíquotas de 25 µL das diluições foram aplicadas em orifícios com 5 mm de diâmetro em ágar MRS contendo, aproximadamente,  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *L. lactis* ATCC 19435. Após incubação a 37 °C por 24 h, mediu-se o diâmetro do halo de inibição. O cálculo da atividade antimicrobiana foi realizado a partir da maior diluição que apresentou halo de inibição igual ou superior a 5 mm, descontando-se o diâmetro do orifício. A atividade foi expressa em unidades arbitrárias (UA.mL<sup>-1</sup>). A solução de fosfato de sódio foi usada como controle negativo.

A atividade antimicrobiana dos extratos concentrados de bovicina HC5 usados nos experimentos variou entre 5.120 e 20.480 UA.mL<sup>-1</sup>.

Para o preparo da solução de nisina, 8 g de nisina (Nisaplin®, Danisco) foram diluídos em 25 mL de solução de fosfato de sódio (5mM, pH 2,0). A atividade da bacteriocina foi determinada conforme a metodologia descrita para bovicina HC5. A atividade antimicrobiana da solução de nisina foi de 5.120 UA.mL<sup>-1</sup>.

### 3.3. Determinação do efeito de *L. lactis* associado às bacteriocinas sobre o crescimento de *S. aureus* *in vitro*

Cem mililitros de TSB foram inoculados com, aproximadamente,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de cada uma das estirpes enterotoxigênicas ATCC 6538, EMBRAPA 4018 e FRI 722 de *S. aureus* contendo ou não  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *L. lactis* ATCC 19435. Nos frascos de TSB contendo apenas as estirpes de *S. aureus*, foram ou não adicionados nisina e, ou bovicina ambas numa concentração de 10 UA.mL<sup>-1</sup>. Nos frascos de TSB contendo a cocultura (*S. aureus* e *L. lactis* ATCC 19435), foram ou não adicionados nisina e bovicina HC5 em concentrações equivalentes a 10 UA.mL<sup>-1</sup>. Todos os tratamentos foram realizados com três repetições.

O meio TSB foi escolhido para o cocultivo das estirpes de *S. aureus* e *L. lactis* 19435 uma vez que ensaios preliminares demonstraram que esse meio não restringe o crescimento de ambas espécies bacterianas, assim como possibilita a produção de enterotoxinas pelas estirpes de *S. aureus*. Além disso, as concentrações das bacteriocinas empregadas foram definidas em função dos resultados obtidos por Pimentel Filho (2010). Segundo esse pesquisador, as concentrações de 10 UA.mL<sup>-1</sup> das bacteriocinas não inibe completamente o crescimento de *S. aureus* em caldo TSB.

Ao longo do período de incubação a 37 °C, diluições decimais seriadas foram realizadas em solução salina 0,85 % e plaqueadas em superfície do ágar Baird-Parker (BP, HiMedia, Índia) e ágar MRS adicionado de púrpura de bromocresol (Merck) para a determinação do número de células viáveis de *S. aureus* e *L. lactis*, respectivamente. As placas de BP foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 h, conforme Lancette e Bennett (2001), enquanto que as placas de MRS foram incubadas em condições de micro-aerofilia a 30 °C por 72 h (RICHTER e VEDAMUTHU, 2001). Todos os plaqueamentos foram feitos em triplicata.

Testes adicionais como coloração de Gram e catalase foram realizados a fim de confirmar a contagem de bactérias lácticas nas amostras.

Ao final do período de incubação, o pH do meio TSB de todos os tratamentos foram mensurados com pH metro (Hanna, Romênia).

### 3.4. Determinação do efeito das bacteriocinas sobre a viabilidade de *S. aureus* em leite e em queijo Minas frescal

Leite em pó desnatado e reconstituído a 10% (LDR 10%) foi inoculado com, aproximadamente,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *S. aureus* FRI 722 ou *S. aureus* ATCC 6538 ou EMBRAPA 4018 e adicionado de nisina e bovicina HC5, ambas em concentração de 600 UA.mL<sup>-1</sup>. O LDR 10 % foi incubado a 37 °C e, amostras periódicas foram plaqueadas em superfície de ágar BP para enumeração de *S. aureus*.

Três amostras indicativas de lote de queijo Minas frescal produzidos com cultura *starter* mesofílica do tipo O (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* - R-704, Christian Hansen) foram adquiridos no mercado local de Viçosa, MG, em semanas diferentes. Os queijos coletados apresentavam prazo de validade de 30 dias e o tempo entre a fabricação e a coleta foi de dois dias.

Quinze gramas das amostras de queijo foram maceradas, acondicionadas em tubos e inoculadas com, aproximadamente,  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> de cada um das estirpes enterotoxigênicas ATCC 6538, EMBRAPA 4018 e FRI 722 de *S. aureus*. Nisina e bovicina HC5 foram combinadas ou não à massa do queijo na concentração de 600 UA.g<sup>-1</sup> cada. Os queijos foram armazenados a 8 °C por até 30 dias ou a 25 °C por 15 dias. Foram realizadas três repetições dos tratamentos com uma réplica cada.

Queijos inoculados e não inoculados com *S. aureus* foram utilizados como controle.

A concentração das bacteriocinas combinadas a 600 UA.mL<sup>-1</sup> ou g<sup>-1</sup> empregadas no LDR 10 % e no queijo Minas frescal, respectivamente, foram definidas de acordo com Pimentel Filho (2010). O pesquisador demonstrou que as bacteriocinas combinadas nessas concentrações apresentavam um maior efeito bactericida sobre *S. aureus* tanto em leite quanto em queijo.

Nos tempos 0, 6, 12, 18, 24 e 30 dias de armazenamento, porções de 1 g dos simulados de queijo incubados a 8 °C por 30 dias foram diluídos em 9 mL de salina 0,85 %. Diluições decimais seriadas foram realizadas e plaqueadas por espalhamento em superfície de ágar BP, MRS e Padrão para Contagem –PCA (HiMedia, Índia) para a determinação do número de *S. aureus*, bactérias lácticas e mesófilos aeróbios, respectivamente. As placas contendo PCA foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 h, enquanto que a incubação das placas contendo BP e MRS foi procedida como descrito no item 3.3.

### 3.5. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas

Amostras do cultivo de *S. aureus* ATCC 6538, EMBRAPA 4018 e FRI 722 em TSB ou BHI proveniente de três repetições foram misturadas, centrifugadas e o sobrenadante coletado para a avaliação da presença de enterotoxinas estafilocócicas. Quinhentos microlitros foram adicionados ao barrete do teste imunoenzimático VIDAS<sup>®</sup> Staphenterotoxin system II (SET2, Enzyme linked fluorescent assay, bioMérieux<sup>®</sup> S.A., Marcy-L'Etoile, França) e submetidos à análise no aparelho Mini Vidas<sup>®</sup> (bioMérieux<sup>®</sup> S.A., França). Foram utilizados o padrão e os controles positivo e negativo que acompanham o teste.

A detecção de enterotoxina no queijo Minas frescal foi realizada segundo o protocolo para amostras lácteas do VIDAS<sup>®</sup> Staph enterotoxin system II, com limite de detecção de 1,0 ng de SE.g<sup>-1</sup> de amostra de alimentos.

Vinte e cinco gramas de queijos inoculados com *S. aureus* adicionados ou não das bacteriocinas (obtidos como descrito no item 3.4) foram diluídos em 40 mL de água desmineralizada pré-incubada a 37 °C e, com auxílio de bastão de vidro, misturou-se rapidamente durante 3 min com descanso de 30 min a 25 °C. A suspensão com pH 4,0 corrigido com HCl 5 M foi centrifugada a 3000 g por 15 min a 25 °C. O sobrenadante recuperado (pH ajustado para 8,0 com NaOH 1 M) foi adicionado de ácido tricloroacético a 90% (TCA) - o volume TCA adicionado correspondeu a 5% do volume do sobrenadante coletado. A mistura repousou por 30 min a 25 °C e foi centrifugada a 3000 g por 15 min a 25 °C. O sedimento proteico coletado foi ressuspensionado em volume de tampão TRIS 0,3 M pH 8,0 correspondente a 1/10 do volume do sobrenadante tratado com TCA. A suspensão com pH ajustado para 8,0 com NaOH 4 M foi centrifugada a 3000 g por 15 min a 25 °C. Quinhentos microlitros da solução foram transferidos para um barrete VIDAS<sup>®</sup> SET2 para efetuar o teste no aparelho Mini VIDAS<sup>®</sup>. As leituras foram realizadas sem repetições.

### 3.6. Análises estatísticas

Foram realizadas análises estatísticas descritivas dos dados como média aritmética e desvio-padrão com o auxílio do programa Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

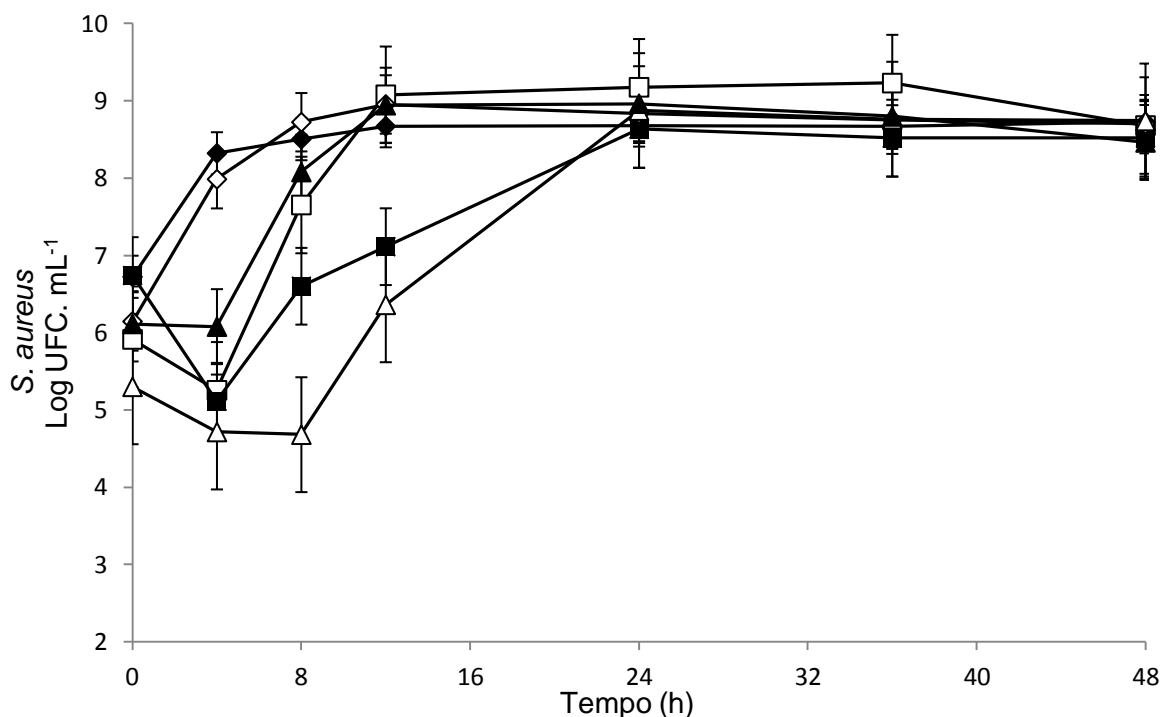
### 4.1. Efeito de bovicina HC5, nisina e *L. lactis*, sobre *S. aureus*

As estirpes ATCC 6538, EMBRAPA 4018 e FRI 722 de *S. aureus* apresentaram, em caldo TSB, velocidade específica média de crescimento ( $\mu$ ) de  $1,8 \text{ h}^{-1}$ . Nos tratamentos com bovicina HC5, nisina e com as bacteriocinas combinadas, a velocidade de crescimento de *S. aureus* foi de 2,0; 1,1 e  $1,9 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Todavia, o cocultivo de *S. aureus* com *L. lactis* reduziu o valor de  $\mu$  para  $1,6 \text{ h}^{-1}$ , sendo esta redução mais acentuada ( $\mu = 1,1 \text{ h}^{-1}$ ) com a adição das bacteriocinas (Figura 1).

Tanto no cultivo isolado de *S. aureus* ou em cocultivo com *L. lactis* não foram observadas fases lag nos tempos avaliados, no entanto, a adição das bacteriocinas atrasou o início da fase log das culturas de *S. aureus* (Figura 1). Na presença de bovicina HC5 ou das bacteriocinas combinadas, a duração da fase lag foi em torno de 4 h, enquanto nisina promoveu redução de um ciclo log na população inicial de *S. aureus* além de retardar o aumento da população em, aproximadamente, 8 h (Figura 1). Em concordância com esses resultados, *S. aureus* ATCC 6538 foi mais sensível à nisina do que a bovicina HC5 e, quando cultivado em TSB na presença de  $10 \text{ UA.mL}^{-1}$  de nisina, apresentou fase lag de 7 h (PIMENTEL FILHO, 2010).

Uma população em torno de  $8,0 \text{ log UFC.mL}^{-1}$  foi alcançada após 8 h de incubação no cultivo em TSB sem bacteriocinas e na presença de bovicina HC5 e *L. lactis*. A concentração de  $10 \text{ UA.mL}^{-1}$  de nisina utilizada não garantiu a completa inibição de *S. aureus*, pois o crescimento foi reassumido e, após 24 h de incubação, a população do patógeno foi próxima a do tratamento controle (Figura 1). A retomada do crescimento de *S. aureus* no meio de cultura contendo nisina pode estar relacionada ao desenvolvimento de mecanismos de resistência a essa bacteriocina. Segundo Hiron et al. (2011), nisina estimula um sistema de dois componentes que promove a expressão de proteínas transportadoras. Por sua vez, essas proteínas de transporte atuam bombeando a

nisina removendo-a da membrana e, em consequência disso, essa bacteriocina não consegue atuar sobre seu alvo ação. Por nisina e bovicina HC5 serem lantibióticos e apresentarem similaridade funcional, é possível que bovicina HC5 também estimule o mesmo mecanismo de resistência em *S. aureus*.



**Figura 1.** Crescimento de *S. aureus* ATCC 6538, EMBRAPA 4018 e FRI 722 na presença de *L. lactis* ATCC 19435, nisina e bovicina HC5. Aproximadamente  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *S. aureus* foram inoculados em caldo TSB, a 37°C, na presença de 10 UA.mL<sup>-1</sup> de nisina (-Δ-), 10 UA.mL<sup>-1</sup> de bovicina HC5 (-▲-), 20 UA.mL<sup>-1</sup> das bacteriocinas combinadas (-□-),  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *L. lactis* ATCC 19345 (-◆-) e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *L. lactis* ATCC 19345 e bacteriocinas combinadas a 20 UA.mL<sup>-1</sup> (-■-). Controle sem adição de *L. lactis* ATCC 19345 e bacteriocinas (-◇-).

No tratamento onde as bacteriocinas foram combinadas, o uso conjunto de nisina e bovicina HC5 não apresentou efeito bactericida superior ao observado no tratamento contendo somente nisina (Figura 1). Isso pode ser explicado pelo fato das bacteriocinas competirem pelo mesmo sítio de ação e, dessa maneira, bovicina HC5 pode ter ocupado sítios de atuação da nisina diminuindo o seu efeito bactericida sobre *S. aureus*.

O cocultivo com *L. lactis* ATCC 19345 pouco influenciou o crescimento de *S. aureus* em caldo TSB e, resultado parecido foi obtido por Even et al. (2009), que

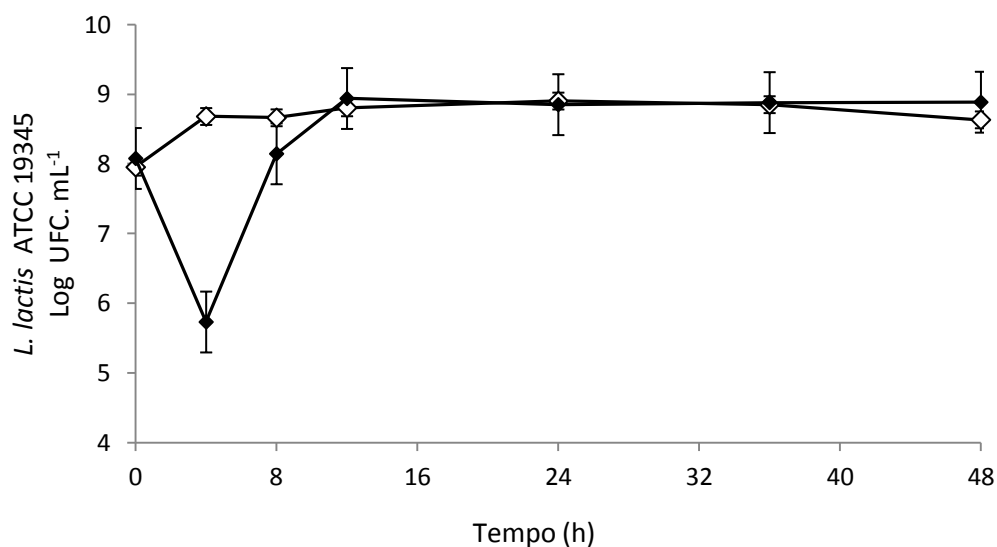
verificaram que *L. lactis* LD61 também pouco afetou a taxa de crescimento de *S. aureus* MW2 em caldo BHI a pH constante. Apesar de *L. lactis* 19435 não produzir bacteriocinas, a produção de ácido por essa bactéria pode interferir no crescimento de *S. aureus*. Entretanto, é provável que o caldo TSB não tenha favorecido a produção de ácido pelo *L. lactis* 19435 uma vez que uma discreta alteração no pH final médio foi observada (Tabela 2). Segundo Cheigh et al. (2002), o caldo M17 suplementado com 0,5 % de lactose suporta melhor o crescimento de *L. lactis* do que o caldo TSB. Esses autores também observaram que *L. lactis* A164 cultivado em caldo TSB promoveu o abaixamento do pH do meio de 6,8 para 5,01 após 24 h de incubação a 30 °C.

**Tabela 2.** Valores de pH médio do caldo TSB da cultura das estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus* em diferentes tratamentos após 48 h de incubação.

<b>Condições de cultivo de <i>S. aureus</i> em meio TSB</b>	<b>pH final</b>
Controle (TSB)	4,95 ± 0,02
Nisina (10 UA.mL <sup>-1</sup> )	5,20 ± 0,06
Bovicina HC5 (10 UA.mL <sup>-1</sup> )	5,27 ± 0,04
Bacteriocinas combinadas (20 UA.mL <sup>-1</sup> )	5,10 ± 0,04
<i>L. lactis</i>	4,83 ± 0,02
<i>L. lactis</i> + bacteriocinas combinadas (20 UA.mL <sup>-1</sup> )	5,17 ± 0,11

A associação *L. lactis*-bacteriocinas apresentou efeito bactericida ligeiramente maior do que aquele observado no tratamento contendo somente as bacteriocinas (Figura 1) e, este efeito pode estar associado à combinação dos danos à membrana e a competição por nutrientes com a bactéria láctica.

*L. lactis* ATCC 19435 é sensível tanto a nisina quanto a bovicina HC5, sendo esse micro-organismo utilizado como indicador da atividade dessas bacteriocinas, no entanto, a concentração de 20 UA.mL<sup>-1</sup> das bacteriocinas combinadas parece estimular um mecanismo de resistência em *L. lactis* ATCC 19435, uma vez que a bactéria láctica reassumiu o crescimento após 4 h de incubação a 37 °C (Figura 2).



**Figura 2.** Crescimento de *L. lactis* ATCC 19435 em cocultura com *S. aureus* ATCC 6538, EMBRAPA 4018 e FRI 722 na presença de bacteriocinas. Aproximadamente  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *L. lactis* ATCC 19435 em cocultura com  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *S. aureus* foram inoculados em caldo TSB, a 37°C, na presença (-■-) ou ausência (-◇-) de nisina e bovicina HC5 em concentrações equivalentes de 10 UA.mL<sup>-1</sup>.

O teste imunoenzimático VIDAS<sup>®</sup> Staph enterotoxin system II não detectou a presença de SE's no cocultivo de *L. lactis* e *S. aureus* em meio TSB. Além disso, os valores relativos de fluorescência (RFV) do teste VIDAS<sup>®</sup> sugerem que as bacteriocinas estimulam a produção de SE's em *S. aureus* por meio de um mecanismo ainda não descrito. Na presença de nisina, bovicina HC5 e das bacteriocinas combinadas, os RFV's foram cerca de 5,0; 3,8 e 4,7 vezes maior que do controle, respectivamente (Tabela 3).

Mesmo sem influenciar no crescimento de *S. aureus*, *L. lactis* pode reprimir a expressão de genes de SE's quando em cocultura (EVEN et al., 2009). Por outro lado, a associação *L. lactis*-bacteriocinas não foi eficiente para inibir a síntese de SE's. Acredita-se que a produção de SE's tenha ocorrido durante as primeiras 4 h de cocultivo quando foi observada inibição da bactéria láctica pelas bacteriocinas (Figura 2). Outro fator que pode ter influenciado, foi a presença das bacteriocinas, uma vez que elas parecem estimular a produção de SE's.

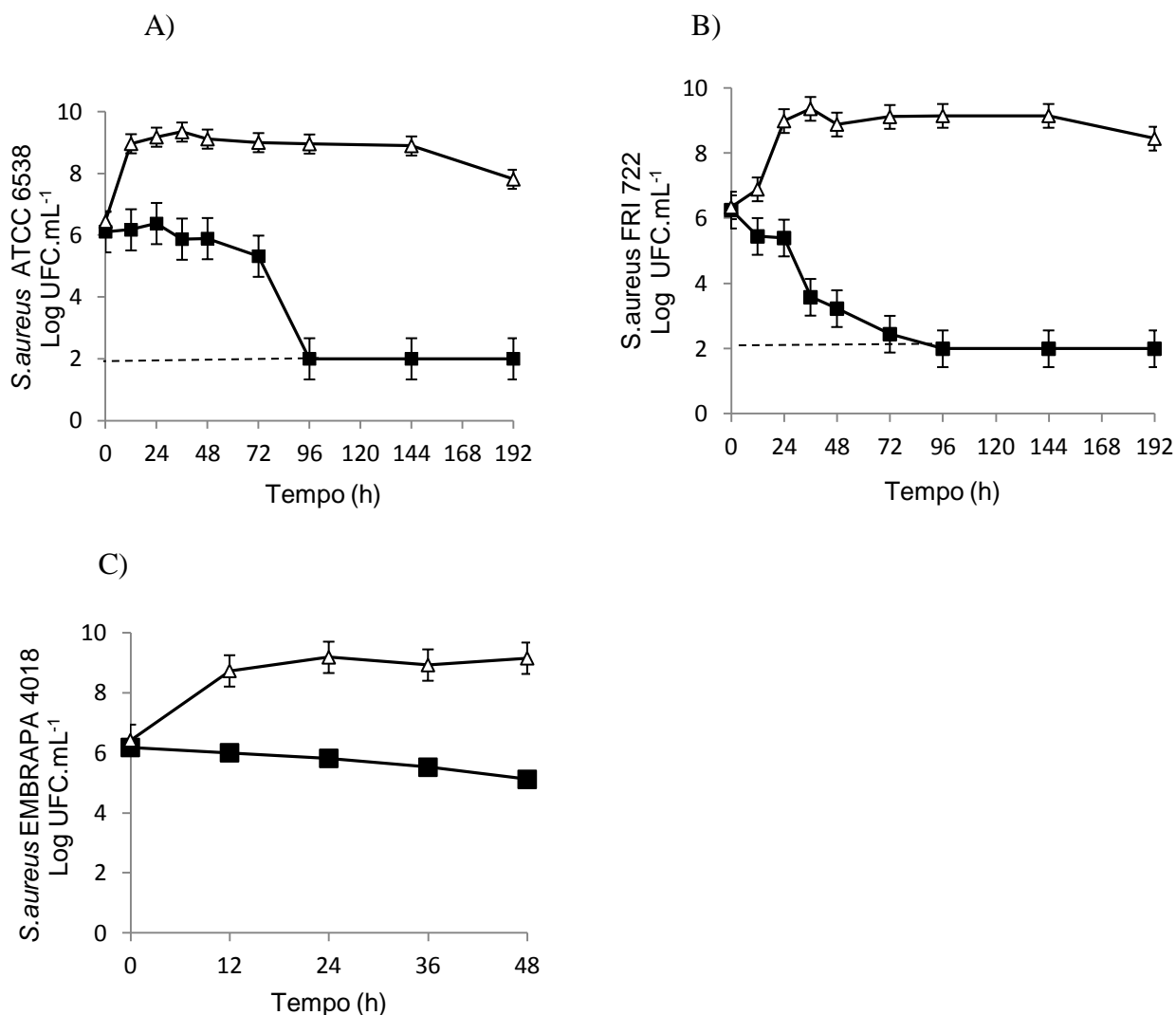
**Tabela 3.** Valores de RFV para o teste imunoenzimático em diferentes tratamentos após 48 h de incubação.

Condições de cultivo de <i>S. aureus</i> em meio TSB	Valores de RFV	Resultado
Controle (TSB)	0,69	Positivo
Nisina (10 UA.mL <sup>-1</sup> )	3,42	Positivo
Bovicina HC5 (10 UA.mL <sup>-1</sup> )	2,65	Positivo
Bacteriocinas combinadas (20 UA.mL <sup>-1</sup> )	3,24	Positivo
<i>L. lactis</i>	0,08	Negativo
<i>L. lactis</i> + bacteriocinas combinadas (20 UA.mL <sup>-1</sup> )	2,64	Positivo

Outro fato a ser destacado é que todas as estirpes de *S. aureus* usadas neste estudo produziram SE's quando cultivadas isoladamente em caldo TSB, todavia, quando o cultivo foi realizado em caldo BHI, enterotoxina foi detectada somente na cultura de *S. aureus* FRI 722. Este resultado é reforçado por informações de outros autores, que observaram que a produção de SE's pode variar dependendo do meio e das condições de cultivo, uma vez que esses fatores influenciam no padrão de crescimento e alteram os tempos de fase lag ou de entrada em fase estacionária (CRETENET et al., 2011). Além disso, estirpes de *S. aureus* apresentam diferentes perfis genéticos quanto à produção de SE's e esses fatores podem explicar a grande variação quanto à produção de SE's (CAN e ÇELIK, 2012).

#### 4.2. Efeito de bovicina HC5 e nisina sobre a viabilidade de *S. aureus* em LDR

As estirpes de *S. aureus* ATCC 6538, EMBRAPA 4018 e FRI 722 foram sensíveis às bacteriocinas adicionadas ao LDR 10 % e, o número de células viáveis de *S. aureus* ATCC 6538 e FRI 722 estiveram abaixo do limite de detecção da técnica após 96 h de incubação (Figura 3). No entanto, os perfis de sensibilidade às bacteriocinas variou entre as estirpes testadas e essa variação pode estar relacionada às características da membrana citoplasmática e parede celular de cada estirpe. Segundo Davies e Adams (1994) e Maisnier-Patin e Richard (1996), os principais fatores que explicam os diferentes graus de sensibilidade às bacteriocinas entre bactérias da mesma espécie, estão diretamente associados às variações na acessibilidade, nos sítios de adsorção dos antimicrobianos e nas cargas da parede celular.



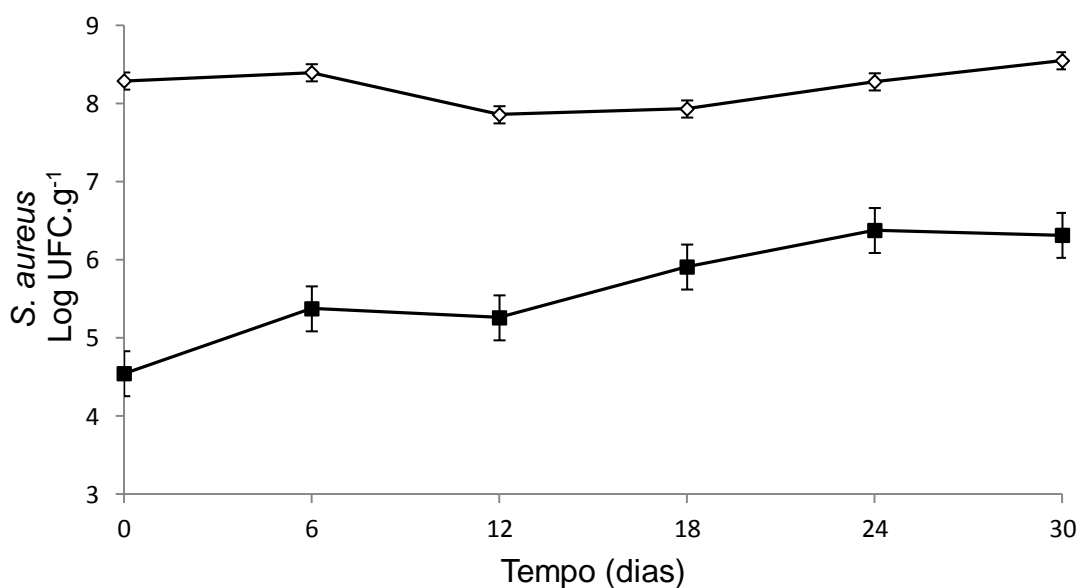
**Figura 3.** Efeito combinado de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de *S. aureus* ATCC 6538 (A), *S. aureus* FRI 722 (B) e *S. aureus* EMBRAPA 4018 (C) em LDR 10 % incubado a 37°C. Aproximadamente,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de células de *S. aureus* foram inoculadas em LDR 10% na presença das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina combinadas a 1200 UA.mL<sup>-1</sup> (-■-). Controles sem adição de bacteriocinas (-Δ-). A linha tracejada indica o limite de detecção do método utilizado.

O efeito bactericida da associação de nisina e bovicina HC5 sobre células de *S. aureus* também foi observado em leite UAT onde uma concentração 400 UA.mL<sup>-1</sup> de ambas bacteriocinas inativou completamente uma população inicial de 7,0 log UFC.mL<sup>-1</sup> de *S. aureus* ATCC 6538 (PIMENTEL FILHO, 2010).

#### 4.3. Efeito das bacteriocinas e da cultura *starter* sobre a viabilidade de *S. aureus* em queijo Minas frescal

Queijos adquiridos no mercado local apresentaram população inicial de *S. aureus* em torno de  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> e, apesar da alta densidade populacional, aproximadamente  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> de estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus* foram inoculadas para garantir a presença de *S. aureus* produtores de SE's.

O número elevado de *S. aureus* verificado inicialmente nas amostras de queijo se manteve constante ao longo de 30 dias de armazenamento a 8 °C (Figura 4). Entretanto, em queijos Minas frescal com população inicial de *S. aureus* em torno de  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>, o patógeno não apresentou restrições quanto ao crescimento e aumentou a população inicial em até 4 ciclos log após 30 dias de armazenamento a 4 °C (PIMENTEL FILHO, 2010).



**Figura 4.** Crescimento de *S. aureus* ATCC 6538, EMBRAPA 4018 e FRI 722 em queijo Minas frescal, a 8°C, na presença de bacteriocinas. Aproximadamente,  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> de células de *S. aureus* foram inoculadas em queijo na presença de bovicina HC5 e nisina combinadas a 1200 UA.g<sup>-1</sup> (-■-). Controle sem adição de bacteriocinas (-◇-).

A adição das bacteriocinas associadas ao queijo resultou em efeito bactericida sobre *S. aureus*, percebida pela redução imediata de 3,7 ciclos log na população inicial (Figura 4). Por outro lado, este efeito bactericida não se manteve ao longo do período de

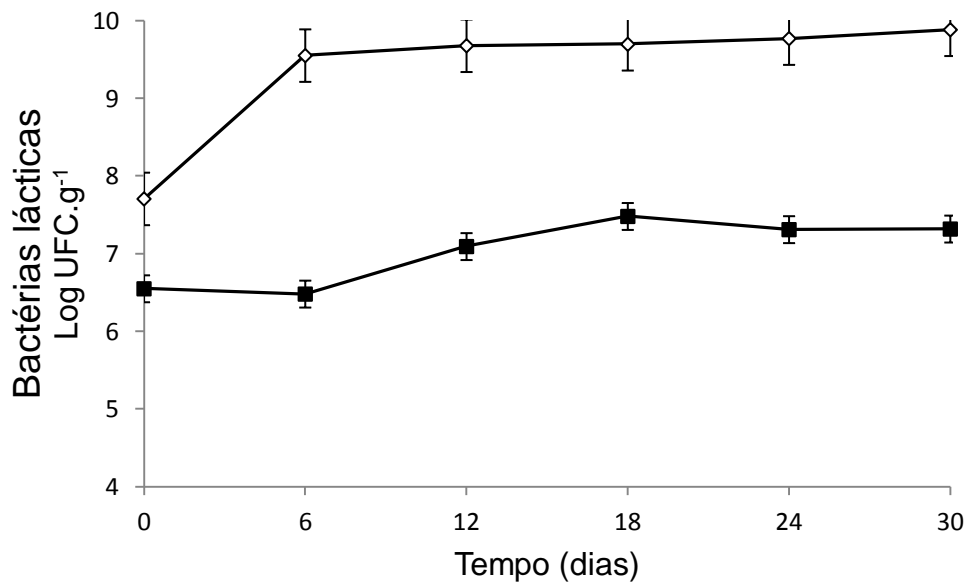
armazenamento, uma vez que a população do patógeno aumentou em quase 2 ciclos log após 24 dias de estocagem a 8 °C (Figura 4).

Por apresentar amplo espectro de ação, as bacteriocinas agem sobre diferentes micro-organismos do queijo não atuando especificamente sobre *S. aureus*. Este fato pode ser constatado pelo efeito bactericida exercido sobre as bactérias lácticas e sobre a microbiota mesofílica do queijo (Figuras 5 e 6). Além disso, as bacteriocinas podem ter interagido com a matriz alimentar ou terem sido degradadas por enzimas produzidas pela microbiota do queijo, o que também justificaria a diminuição na atividade ao longo do período de estocagem. O queijo é um alimento sólido e, por essa razão, a difusão das bacteriocinas é dificultada no seu interior. Consequentemente, em razão do acúmulo e retenção das bacteriocinas em porções da matriz alimentar, o efeito antimicrobiano é diminuído. Como pode ser observado, a atividade antimicrobiana das bacteriocinas foi maior no LDR 10 % do que no queijo (Figura 3). Nascimento et al. (2008) reforçam esse resultado uma vez que esses autores constataram que a atividade de nisina é 50 % menor em leite do que em caldo MRS.

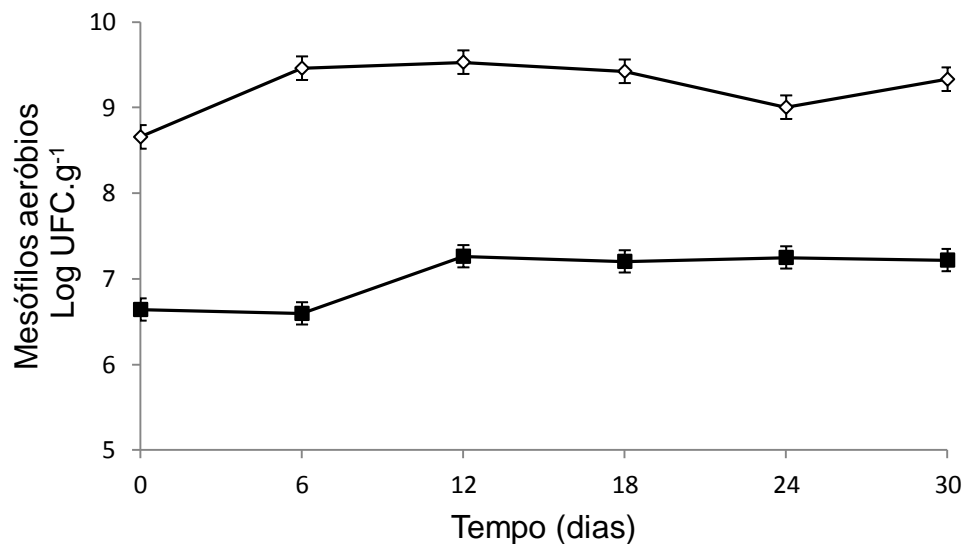
Mesmo que discretamente, *S. aureus* reassumiu o crescimento no queijo contendo as bacteriocinas e, neste caso, o efeito bacteriostático exercido pelas culturas *starter* não foi observado (Figura 4). As bacteriocinas também interferiram no crescimento das bactérias lácticas (Figura 5) e, em razão disso, o efeito adverso que essa microbiota exerce sobre *S. aureus* possivelmente foi diminuído. Nisina e bovicina HC5 em concentrações equivalentes a 600 UA. g<sup>-1</sup> também apresentaram efeito bactericida sobre *S. aureus* ATCC 6538 durante os primeiros 15 dias de estocagem a 4 °C do queijo Minas frescal, no entanto, o crescimento do patógeno foi reassumido após esse período (PIMENTEL FILHO, 2010).

As bacteriocinas também atuaram de maneira similar àquela observada em *S. aureus* sobre as bactérias lácticas e sobre a microbiota do queijo (Figuras 5 e 6).

O número de bactérias lácticas aumentou, aproximadamente, 2 ciclos log após 30 dias de armazenamento dos queijos Minas frescal a 8 °C (Figura 5). Entretanto, reduções de 1,2 ciclos log na população inicial na taxa de crescimento das bactérias lácticas foram observadas nas amostras contendo nisina e bovicina HC5. Possivelmente a diminuição no número de bactérias lácticas e o estresse causado pelas bacteriocinas afetaram o acúmulo de ácido láctico e de outros produtos metabólicos inibidores do crescimento microbiano. Esta hipótese ajuda a explicar o crescimento de *S. aureus* nos queijos adicionados das bacteriocinas.



**Figura 5.** Crescimento de bactérias lácticas em queijo Minas frescal, a 8 °C, na presença de bacteriocinas. Queijos produzidos com cultura *starter* e inoculados com *S. aureus* foram adicionados de bovicina HC5 e nisina combinadas a 1200 UA.g<sup>-1</sup> (-■-). Controle sem adição de bacteriocinas (-◇-).



**Figura 6.** Crescimento de bactérias aeróbias mesófilas em queijo Minas frescal, a 8 °C, na presença de bacteriocinas. Queijos produzidos com cultura *starter* e inoculados com *S. aureus* foram adicionados de bovicina HC5 e nisina combinadas a 1200 UA.g<sup>-1</sup> (-■-). Controle sem adição de bacteriocinas (-◇-).

A microbiota aeróbia mesófila presente no queijo Minas frescal aumentou 0,67 ciclos log após 30 dias de armazenamento a 8 °C (Figura 6). Assim como observado para *S. aureus* e bactérias lácticas, a população inicial da microbiota do queijo foi reduzida em 2 ciclos log imediatamente após a adição das bacteriocinas (Figura 6).

Tanto nos queijos armazenados a 8 °C por 30 dias quanto nos queijos estocados a 8 °C por 15 dias e 25 °C por 15 dias, não foram detectadas SE's. Apesar das bactérias lácticas já serem reconhecidas por inibir a produção de enterotoxinas, estes resultados reforçam que o uso de culturas *starter* pode conter a produção de SE's mesmo em queijos visivelmente deteriorados, como no caso dos queijos mantidos em condições abusivas de temperatura. Em conformidade com esses resultados, Seridan et al. (2012) verificaram que *L. lactis* também inibe a produção de SEB por *S. aureus* em queijo e, em contrapartida, Cretenet et al.(2011) constataram que a produção de SEK, SEG2 e SEH por *S. aureus* é inibida por *L. lactis* em queijo, porém, a bactéria láctica estimula a produção de SEA.

Em queijos Minas frescal produzidos sem a cultura *starter*, inoculados com *S. aureus* EMBRAPA 4018 e adicionados de nisina e bovicina HC5 combinadas a 1200 UA. g<sup>-1</sup>, foi detectada a presença de SED após 30 dias de estocagem a 15 °C (PIMENTEL FILHO, 2010). Esse resultado reforça a ideia de que, apesar das bacteriocinas controlarem a população inicial de *S. aureus*, esses lantibióticos não são capazes de conter a produção de SE's, entretanto, essa função pode ser exercida pela microbiota láctica.

## 5. CONCLUSÕES

A utilização das bacteriocinas e bactérias lácticas em queijos Minas frescal não garantem produtos microbiologicamente seguros, porém, tanto as bacteriocinas quanto as bactérias lácticas funcionam como barreiras adicionais contra o desenvolvimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos. Dessa forma, para a produção de queijos Minas frescal, a adoção das BPF ainda é a melhor opção para garantia da segurança do consumidor. Nesse trabalho foi verificado que nisina e bovicina HC5 combinadas a  $1.200 \text{ UA.g}^{-1}$  de queijo Minas frescal, reduziram a população inicial de *S. aureus*, porém não impediram que esse patógeno retomasse o crescimento ao longo do período de estocagem do produto. Além disso, resultados obtidos em meio de cultivo demonstraram que as bacteriocinas parecem estimular a produção de SE's em *S. aureus*.

Dessa maneira, conclui-se que as bacteriocinas devem ser utilizadas como co-adjuvantes no controle de *S. aureus* em queijos pouco contaminados, uma vez que, se a população inicial do patógeno for elevada, as bacteriocinas não eliminam o risco de intoxicação alimentar. Por outro lado, apesar de não impedirem o crescimento de *S. aureus*, bactérias lácticas podem inibir a produção de SE's tanto em queijos quanto em meio de cultivo. Assim, o uso de *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* como cultura *starter* na produção de queijos Minas frescal parece ser uma boa estratégia no controle de SE's no produto. Sugere-se também, que as bacteriocinas não sejam associadas às bactérias lácticas em queijos Minas frescal, uma vez que as bacteriocinas apresentam efeito bactericida sobre a microbiota láctica, diminuindo assim, o caráter bioprotetor dessa cultura.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEGRÍA, Á.; 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.

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.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 578-580, 2000.

ANDREATTA, E. **Avaliação da qualidade de queijos Minas frescal e mussarela produzidos com leite contendo diferentes níveis de células somáticas**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 112p. 2006.

ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; MEDINA, M. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. **FoodControl**, v. 22, p. 457- 461, 2011.

BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Ministério da Saúde. **Regulamento técnico do MERCOSUL de identidade e qualidade de queijo Minas frescal**. XXIV GMC - Fortaleza, 13 de dezembro de 1996.

BRASIL, 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997. **Regulamento técnico para fixação de identidade e**

**qualidade de queijo Minas frescal.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 16 de agosto de 2012.

BRASIL, 2001. Resolução RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.** Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>>. Acesso em 16 de agosto de 2012.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 135-144, 2006.

BURGOS, M. J. G.; LÓPEZ, R. L.; AGUAYO, M. D. C. L.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A. Inhibition of planktonic and sessile *Salmonella enterica* cells by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides. **Food Control**, 2012. Article in Press.

CAMPOS, M. R. H.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; BORGES, L. J.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; SERAFINI, A. B. Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* strains isolated from raw milk, Minas Frescal cheese, and food handlers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1203-1209, 2009.

CAN, H. Y.; ÇELIK, T. H. Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish cheeses. **Food Control**, v. 24, p. 100-103, 2012.

CARVALHO, A. A. T. **Atividade inibitória de bovicina HC5 sobre bactérias deterioradoras de polpa de manga.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 89p., 2006.

CARVALHO, A. A. T.; VANETTI, M. C. D.; MANTOVANI, H. C. Bovicin HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1364 - 5072, 2008.

CASTRO, M. P.; PALAVECINO, N. Z.; HERMAN, C.; GARRO, O. A.; CAMPOS, C. A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat Science**, v. 87, p. 321 – 329, 2011.

CHEIGH, C.; CHOI, H.; PARK, H.; KIM, S.; KOOK, M.; KIM, T.; HWANG, J.; PYUN, Y. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. **Journal of Biotechnology**, v. 95, p. 225 – 235, 2002.

CHIODA, T. P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R.; MACRI, S. F.; TROVO, K. P.; MEDEIROS, A. A. Inhibition of the growing of *Listeria monocytogenes* in Minas frescal cheese elaborated with *Lactobacillus acidophilus* culture. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 121-124, 2006.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Food microbiology: developed innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.

CRETENET, M.; NOUAILLE, S.; THOUIN, J.; RAULT, L.; STENZ, L.; FRANÇOIS, P.; HENNEKINNE, J.; PIOT, M.; MAILLARD, M. B.; FAUQUANT, J.; LOUBIÈRE, P.; LE LOIR, Y.; EVEN, S. *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, p. 340–351, 2011.

DAVIES, E. A.; ADAMS, M. R. Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 341-347, 1994.

DE BUYSER, M.; 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, p.1-17, 2001.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058–1071, 2006.

DELBES-PAUS, C.; DORCHIES, G.; CHAABNA, Z.; CALLON, C.; MONTEL, M. 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.

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.

EVEN, S.; CHARLIER, C.; NOUAILLE, S.; BEN ZAKOUR, N.; CRETENET, M.; COUSIN, F. J.; GAUTIER, M.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; LOUBIÈRE, P., LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4459–4472, 2009.

FERREIRA, R. M.; SPINI, J. C. M.; CARRAZZA, L. G.; SANT'ANA, D. S.; OLIVEIRA, M. T.; ALVES, L. R.; CARRAZZA, T. G. Pesquisa de *Staphylococcus coagulase* positiva em queijo Minas frescal artesanal. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, 2011.

FREITAS, E. I. **Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo Minas frescal**. Dissertação (Mestrado). Fundação Adolf Lutz, 119p., 2005.

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

GUESSAS, B.; HADADJI, M.; SAIDI, N.; KIHAL, M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by lactic acid bacteria in milk. **African Crop Science Conference Proceedings**, v. 8, p. 1159-1163, 2007.

HAMAMA, A.; EL HANKOURI, N.; EL AYADI, M. 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.

HIRON, A.; FALORD, M.; VALLE, J.; DÉBARBOUILLÉ, M.; MSADEK, T. Bacitracin and nisin resistance in *Staphylococcus aureus*: a novel pathway involving the BraS/BraR two-component system (SA2417/SA2418) and both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC transporters. **Molecular Microbiology**, v. 81, p. 602–622, 2011.

HOOVER, D. G; HARLANDER, S. K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. *In*: HOOVER, D. G.; STEENSON, L. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology**, p. 23-39, 1993.

HOULIHAN, A. J.; MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Effect of pH on the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, p. 27-32, 2004.

KHALID, K.; KIONG, L. H.; CHOWDHURY, Z. Z.; KHALID, K. Antimicrobial interaction of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* against some pathogenic bacteria. **International Journal of Biosciences**, v. 1, p. 39-44, 2011.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. *In*: DOWNES, F. P. (Ed.); ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 387-403.

LIMA FILHO, R. R. Aumenta consumo de queijo no Brasil. Disponível em: <[http://www.bovinos.ufpr.br/100921\\_Aumenta\\_o\\_consumo\\_de\\_queijo\\_no\\_brasil\\_def.pdf](http://www.bovinos.ufpr.br/100921_Aumenta_o_consumo_de_queijo_no_brasil_def.pdf)>. Acesso em 23 de julho de 2012.

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

MACWANA, S.; MURIANA, P. M. Spontaneous bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* as a susceptibility screen for identifying different mechanisms of resistance and modes of action by bacteriocins of lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, p. 7–13, 2012.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, v. 29, p. 138-142, 2013.

MAISNIER-PATIN, S.; RICHARD, J. Cell wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentrations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 140, p. 29-35, 1996.

MALHEIROS, P. S.; SANT'ANNA, V.; BARBOSA, M. S.; BRANDELLI, A.; MELO FRANCO, B. D. G. Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 272–277, 2012.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 808-813, 2001.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HC5, catalyzes the efflux of intracellular potassium but not ATP. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2247-2249, 2008.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 77-83, 2003.

MANTOVANI, H. C.; HU, H.; WOROBO, R. W.; RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiology**, v. 48, p. 3347-3352, 2002.

NAGAO, J.; ASADUZZAMAN, S. M.; ASO, K.; OKUMA, K.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, p. 139–149, 2006.

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

NES, I. F.; YOON, S.; DIEP, D. B. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, p. 675 – 690, 2007.

NORHANA, M. N. W.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A. Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 3, p. 43-50, 2012.

PAIVA, A. D.; IRVING, N.; BREUKINK, E.; MANTOVANI, H. C. Interaction with lipid II induces conformational changes in bovicin HC5 Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 4586-4593, 2012.

PIMENTEL FILHO, N. J. **Atividade das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina sobre de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 85p., 2010.

PINTO, F. G. S.; SOUZA, M.; SALING, S. MOURA, A. C. Qualidade Microbiológica de queijo Minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 78, p. 191-198, 2011.

PINTO, M. S.; DE CARVALHO, A. F.; PIRES, A. C. S.; SOUZA, A. A. C.; DA SILVA, P. H. F.; SOBRAL, D.; DE 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.

PRUDÊNCIO, C. V. **Inibição de *Salmonella Typhimurium* por bovina HC5 associada a agentes quelantes e tensoativos.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, MG, 77p., 2009.

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos queijos minas frescal e mussarela produzidos na cidade de Morrinhos – GO. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, p. 205-211, 2007.

RADOVANOVIC, R. S.; KATIC, V. Influence of lactic acid bacteria isolates on *Staphylococcus aureus* growth in skimmed milk. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 15, p. 196-203, 2009.

RICHTER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and Milk Products .*In*: DOWNES, F. P. (Ed.); ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 483-495.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. **Biochimie**, v. 84, p. 357–364, 2002.

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

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo Minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 173-175, 2006.

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

SERIDAN, B.; SOUZA, M. R.; NICOLI, J. R.; CARMO, L. S.; MENEZES, L. D. M., OLIVEIRA, D. L. S.; ANDRADE, E. H. P. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 465-470, 2012.

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

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 329–343, 2008.

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E. P. L. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 53–57, 2012.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocaryabirrea*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 117–126, 2009.

VIÇOSA, G. N.; MORAES, P. M.; YAMAZI, A. K.; NERO, L. A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: an evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. **Food Microbiology**, v. 27, p. 447- 452, 2010.

VIEIRA, K. P.; LEDESMA, M. M.; ROSA, C. M.; HASSEGAWA, R. H. Contaminação de queijo Minas frescal por bactérias patogênicas: um risco à saúde. **Conscientiae Saúde**, v. 7, p. 201-206, 2008.

VISOTTO, R. G.; OLIVEIRA, M. A.; PRADO, S. P. T.; BERGAMINI, A. M. M.  
Queijo Minas frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v. 70, p. 8-15, 2011.