

DENISE SOBRAL

**EFEITO DA NISINA NA CONTAGEM DE *Staphylococcus aureus*
E NAS CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO MINAS ARTESANAL
DA REGIÃO DE ARAXÁ**

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

S677e
2012

Sobral, Denise, 1979-

Efeito da nisina na contagem de *Staphylococcus aureus* e nas características do queijo minas artesanal da região de Araxá / Denise Sobral. – Viçosa, MG, 2012.
xv, 100f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 87-100

1. Queijo-de-minas. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Nisina.
4. Queijarias - Araxá (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

DENISE SOBRAL

**EFEITO DA NISINA NA CONTAGEM DE *Staphylococcus aureus*
E NAS CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO MINAS ARTESANAL
DA REGIÃO DE ARAXÁ**

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*.

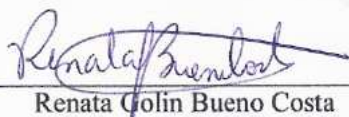
Aprovada: 11 de maio de 2012.



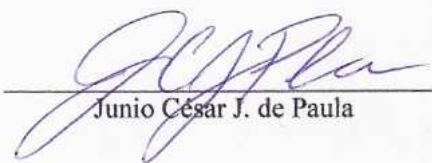
Mauro Mansur Furtado
(Coorientador)



Ana Clarissa dos S. Pires



Renata Golin Bueno Costa



Junio César J. de Paula



Antônio Fernandes de Carvalho
(Orientador)

*Ao companheiro e parceiro de todas as horas **Stênio**, pelo amor e paciência.*
*Ao meu pai, **Márcio**, e minha mãe, **Cleuza**, pelo amor incondicional e por torcerem*
pelos meus ideais, me apoiando sempre.
*À **Dani** e ao **Paulo**, pelo carinho, amor e amizade.*
*Ao meu primo-irmão, **Marcelo**, pelo amor, amizade e companheirismo.*
*À **Aninha**, sem palavras pra definir o que sinto por ela, amor maior que o infinito.*
*Ao meu tio **Marcelo Lopes Sobral**, um anjo que olha por mim e por minha carreira*
lá do céu.
*À minha avó **Irene** e aos meus queridos avós **Agostinho** e **Efigênia** que mesmo*
somente na lembrança, serão inesquecíveis em minha vida.

Aos familiares e amigos, que sempre estiveram ao meu lado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo em minha vida.

À EPAMIG e ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes pela oportunidade concedida e pelo apoio.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

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

Ao Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho, pela oportunidade, conselhos e orientação.

Aos membros da banca e co-orientadores, Ana Clarissa dos Santos Pires, Junio Cesar J. de Paula, Luís Augusto Nero, Mauro Mansur Furtado, Maximiliano Soares Pinto e Renata G. B. Costa pelas sugestões de grande valia para a conclusão deste trabalho.

Ao prof. Maximiliano Soares Pinto por idealizar e contribuir em todas as etapas do projeto e também pela grande amizade.

À Vanessa A. M. Teodoro por compartilhar, auxiliar, ouvir, ensinar, enfim, por fazer parte deste projeto e do meu seletor círculo de amizade.

Ao Junio César J. de Paula, Elisângela Michele Miguel, Gisela de M. Machado, Renata Golin B. Costa pelas contribuições nos experimentos, nas viagens e principalmente pela grande amizade e pela paciência nas horas difíceis.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho.

Às bolsistas Sheila, Suellen, Pâmella, Amanda, Mônica, Tadiana, Ariane e Lia, pela ajuda muito necessária.

À Gabriela Nogueira Viçosa e ao Gabriel pela grande ajuda e disponibilidade.

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

Ao Evandro por auxiliar nas análises de enterotoxinas.

Ao Laticínio Dona Beija e ao Janilson, por viabilizar as análises microbiológicas em Araxá.

À todos da EMATER de Araxá-MG, especialmente à Silvia Passos, pela presteza e disponibilidade em ajudar.

Aos produtores de queijos artesanais de Araxá por acreditarem em nosso trabalho.

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

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

À Regina Célia Mancini por compreender a situação.

Ao professor Carlinhos, por me substituir diversas vezes, quando não pude dar as aulas de queijos.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. O queijo Minas artesanal.....	4
2.2. Caracterização do queijo Minas artesanal.....	6
2.3. O queijo Minas artesanal da região de Araxá.....	9
2.4. A segurança dos queijos artesanais.....	12
2.5. <i>Staphylococcus</i> spp.	15
2.5.1. Características gerais.....	15
2.5.2. Intoxicação alimentar e enterotoxinas de <i>Staphylococcus</i> spp.	16
2.5.3. <i>S. aureus</i> em leite e derivados.....	18
2.5.4. Técnicas moleculares para identificação de <i>S. aureus</i> e suas respectivas enterotoxinas.....	19
2.6. Bacteriocinas de bactérias lácticas.....	21
2.7. Nisina.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. 1ª Etapa – Caracterização do queijo Minas artesanal da região de Araxá, isolamento de <i>S. aureus</i> e identificação de genes que codificam enterotoxinas clássicas.....	26
3.1.1. Seleção das Propriedades.....	26
3.1.2. Coleta dos queijos.....	27
3.1.3. Análises físico-químicas dos queijos.....	27
3.1.4. Análises microbiológicas dos queijos.....	28
3.1.4.1. Preparo das amostras.....	28
3.1.4.2. Análises de <i>S. aureus</i>	28
3.1.4.3. Obtenção das culturas puras de <i>S. aureus</i>	28

3.1.4.4. Curva de crescimento.....	29
3.1.5. Análises de PCR.....	29
3.2. 2ª Etapa - Efeito antagônico <i>in vitro</i> da adição de nisina sobre o desenvolvimento de <i>S. aureus</i>	31
3.3. 3ª Etapa - Efeito antagônico <i>in loco</i> da adição de nisina ao processo de fabricação do queijo minas artesanal sobre o desenvolvimento de <i>S. aureus</i>	32
3.3.1. Análises físico-químicas dos queijos	33
3.3.2. Análises microbiológicas do leite, da massa e do queijo	33
3.3.3. Análises de PCR.....	34
3.3.4. Análise de enterotoxinas estafilocócicas.....	34
3.3.5. Perfil de textura instrumental	34
3.3.6. Avaliação da Cor.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Resultados da 1ª etapa.....	36
4.1.1. Características físico-químicas do queijo Minas artesanal coletado nas propriedades selecionadas na região de Araxá.....	36
4.1.2. Evolução da maturação dos queijos artesanais coletados na região de Araxá.....	37
4.1.3. Contagem de <i>S. aureus</i> e identificação de genes que codificam enterotoxinas clássicas	38
4.2. Resultados da 2ª etapa - Efeito <i>in vitro</i> da adição de nisina sobre o crescimento de <i>S. aureus</i> em LDR 12%.....	41
4.3. Resultados da 3ª etapa.....	43
4.3.1. Efeito <i>in loco</i> da nisina sobre a composição centesimal do queijo Minas Artesanal da região de Araxá	43
4.3.1.1. Teor de resíduo mineral fixo (cinzas)	45
4.3.1.2. pH durante a maturação	45
4.3.1.3. Umidade durante a maturação.....	47
4.3.1.4. Teor de cloretos durante a maturação	48
4.3.1.5. Atividade de água (a_w) durante a maturação.....	50
4.3.1.6. Teor de gordura e gordura no extrato seco (GES) durante a maturação	52

4.3.1.7. Evolução do teor de proteína total durante a maturação	54
4.3.2. Efeito <i>in loco</i> da nisina na proteólise do queijo Minas Artesanal da região de Araxá	55
4.3.3. Análises Microbiológicas.....	58
4.3.3.1. Contagens de <i>S. aureus</i> e bactérias lácticas no leite e na massa.....	58
4.3.3.2. Contagem de <i>S. aureus</i> do queijo Minas Artesanal da região de Araxá	61
4.3.3.3. Detecção de genes que codificam para a produção de enterotoxinas de <i>S. aureus</i>	63
4.3.3.4. Detecção de enterotoxinas de <i>S. aureus</i>	65
4.3.3.5. Demais análises microbiológicas	66
4.3.3.5.1. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos	67
4.3.3.5.2. Contagem de coliformes totais.....	68
4.3.3.5.3. Contagem de <i>E. coli</i>	71
4.3.3.5.4. Contagem de bactérias lácticas	72
4.3.4. Efeito <i>in loco</i> da nisina sobre o perfil de textura do queijo Minas Artesanal da região de Araxá	74
4.3.4.1. Coesividade	75
4.3.4.2. Firmeza, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade.....	76
4.3.4.3. Elasticidade	78
4.3.5. Efeito da nisina sobre a cor do queijo Minas artesanal da região de Araxá	79
4.3.5.1. Luminosidade (L*).....	80
4.3.5.2. Coordenada cromática a*	81
4.3.5.3. Coordenada cromática b*	82
5. CONCLUSÃO	84
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a _a	- Atividade de água
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	- Brain heart infusion (caldo de infusão cérebro coração)
BP	- Ágar Baird-Parker
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
<i>E. coli</i>	- <i>Eschechiria coli</i>
EMATER	- Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais
EST	- Extrato seco total
FAO	- <i>Food and Agriculture Organization</i>
<i>femA</i>	- Gene codificador do fator <i>femA</i>
GES	- Gordura no extrato seco
GRAS	- <i>Generally Recognized as Safe</i> - geralmente reconhecido como seguro
IEPHA	- Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e artístico de Minas Gerais
IMA	- Instituto Mineiro de Agropecuária
IPHAN	- Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
LDR	- Leite desnatado reconstituído
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
m/m	- Massa/massa
m/v	- Massa/volume
N	- Newton
NS _{TCA 12%}	- Nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12 % (m/m)
NS _{pH 4,6}	- Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (m/m)
NT	- Nitrogênio total
PCR	- Reação em cadeia de polimerase
RMF	- Resíduo mineral fixo
<i>S. aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
SIE	- Serviço de inspeção estadual
SIF	- Serviço de inspeção federal
SIM	- Serviço de inspeção municipal
SISB-POA	- Sistema Brasileiro de Inspeção de Produto de Origem Animal

SUASA	- Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária
<i>sea</i>	- Gene codificador da enterotoxina A
<i>seb</i>	- Gene codificador da enterotoxina B
<i>sec</i>	- Gene codificador da enterotoxina C
<i>sed</i>	- Gene codificador da enterotoxina D
<i>see</i>	- Gene codificador da enterotoxina E
TCA	- Ácido tricloroacético
TPA	- Análise do perfil de textura
UFC	- Unidade formadora de colônia
UI	- Unidades internacionais

RESUMO

SOBRAL, Denise, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2012. **Efeito da nisina na contagem de *Staphylococcus aureus* e nas características do queijo minas artesanal da região de Araxá.** Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Coorientadores: Maximiliano Soares Pinto, Mauro Mansur Furtado e Luís Augusto Nero.

Os queijos Minas artesanais são aqueles produzidos com leite cru e atualmente são fabricados com certificação em 5 regiões tradicionais do estado de Minas Gerais sendo elas Serro, Canastra, Araxá, Cerrado e Campo das Vertentes. O queijo Minas artesanal, por ser fabricado a partir de matéria-prima que não sofreu nenhum tratamento térmico e por ser muito manipulado, pode veicular micro-organismos patogênicos no qual se destaca o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), o que se torna um risco para a saúde do consumidor desse produto. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nisina sobre o comportamento de *S. aureus* em queijo Minas artesanal da região de Araxá, durante o período de 60 dias de maturação. Também foi investigado o efeito da nisina nas características físico-químicas, na proteólise e no perfil de textura e cor dos queijos artesanais ao longo da maturação. O trabalho foi dividido em 3 etapas. Na primeira etapa, os queijos artesanais de 5 propriedades escolhidas na região de Araxá foram coletados. Além da caracterização físico-química destes queijos, realizou-se o isolamento de estirpes de *S. aureus* da região de Araxá e identificou-se os genes que codificam as enterotoxinas clássicas (*sea-see*) e o gene *femA* dos *S. aureus* isolados. Na segunda etapa, realizou-se o teste *in vitro*, com a finalidade de escolher qual concentração de nisina seria mais eficiente contra as estirpes de *S. aureus* isoladas. Na terceira etapa, as quantidades de nisina testadas foram adicionadas diretamente ao leite durante o processo de fabricação do queijo Minas artesanal. Investigou-se também o efeito de diferentes doses de nisina sobre a microbiota contaminante do queijo Minas artesanal de Araxá por meio de contagens de *S. aureus*, aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli* ao longo do período de maturação. Ainda na terceira e última etapa, identificou-se os genes que codificam as enterotoxinas clássicas (*sea-see*) e o gene *femA* dos *S. aureus* isolados dos queijos artesanais da

região de Araxá e averiguou-se a presença de enterotoxinas estafilocócicas nestes queijos durante o período de maturação. Avaliou-se o efeito da nisina nos índices de proteólise, no perfil físico-químico, no perfil de textura e na cor instrumental dos queijos Minas artesanais de Araxá ao longo do período de maturação. Nas amostras de queijo Minas artesanal analisadas na primeira etapa do projeto, verificou-se a presença de genes que codificam para enterotoxinas em todos os isolados de *S. aureus*. Das 12 estirpes isoladas, 11 apresentaram genes para a enterotoxina SEA, 1 para a SEB, 5 para a SEC, 7 para a SEE e nenhuma para a SED, demonstrando o potencial enterotoxigênico destas estirpes. O resultado do teste *in vitro* realizado com as próprias estirpes de *S. aureus* isoladas, indicaram que as doses de nisina de 200, 400 e 500 UI.mL⁻¹ foram estatisticamente iguais ($P \geq 0,05$), no entanto a dose de 400 UI.mL⁻¹ foi a escolhida baseando-se nas interferências que podem ocorrer na matriz do queijo em relação ao efeito bactericida da nisina e também no efeito da nisina nas características dos queijos. As duas doses escolhidas para a utilização no teste *in loco* foram as de 100 UI.mL⁻¹ e 400 UI.mL⁻¹. Ambas as doses de nisina escolhidas foram igualmente efetivas na inibição de *S. aureus* na massa de queijo, no momento da fabricação, antes da etapa de salga, apresentando contagens menores que 10 UFC.g⁻¹ de *S. aureus*. As doses de 100 e 400 UI.mL⁻¹ também foram efetivas nos queijos durante todo o período de maturação, apresentando contagens de *S. aureus* menores que 10 UFC.g⁻¹ em todos os queijos com nisina, nos tempos de 3, 7, 14, 30, 45 e 60 dias. Este resultado evidencia a atividade bactericida da nisina em relação ao desenvolvimento de *S. aureus*, mesmo utilizando baixas concentrações de nisina como 100 UI.mL⁻¹. Com relação à presença de genes que codificam para enterotoxinas, 92,9% das estirpes isoladas de *S. aureus* na terceira etapa do teste *in loco* apresentaram genes para a enterotoxina SEA, 78,6% para SEE e 28,6% para SEC. Nenhuma das estirpes isoladas no teste *in loco* apresentaram genes que codificam para as enterotoxinas SEB e SED. Apesar da presença de genes nas estirpes isoladas, não foi encontrada a presença de enterotoxinas em nenhuma das amostras de queijos analisadas. Nas características físico-químicas, a nisina influenciou significativamente ($P < 0,05$) apenas o pH, a umidade e a gordura dos queijos. As diferentes concentrações de nisina não influenciaram significativamente ($P \geq 0,05$) no % NS_{pH 4,6}/NT (extensão) e % NS_{TCA 12%}/NT (profundidade) dos queijos. Também não houve influência significativa ($P \geq 0,05$) da nisina em relação a contagem de bactérias lácticas nos queijos ao longo da maturação, o que corrobora

com os índices de proteólise semelhantes para as diferentes concentrações de nisina dos queijos ao longo da maturação. Em relação aos parâmetros de textura, os queijos com 400 UI.mL⁻¹ apresentaram maiores valores de coesividade e elasticidade em relação aos queijos com 100 UI.mL⁻¹ e ao queijo controle. Já para firmeza, fraturabilidade, gomosidade e mastigabilidade não houve influência significativa ($P \geq 0,05$) da nisina. Na análise de cor, a nisina influenciou significativamente ($P < 0,05$) apenas a coordenada cromática a* que representa a escala de cor que vai do vermelho ao verde nos queijos, no entanto o efeito foi mínimo. Em relação a microbiota contaminante dos queijos, a nisina influenciou significativamente ($P < 0,05$) as contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli*. Quanto maior a dose de nisina, menor foi a contagem de aeróbios mesófilos e maior foi a contagem de coliformes totais. Nos queijos com dose de 100 UI.mL⁻¹ e nos queijos controle as contagem de *E. coli* foram iguais, no entanto para os queijos com dose de 400 UI.mL⁻¹ a contagem de *E. coli* foi maior.

ABSTRACT

SOBRAL, Denise, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2012. **Effect of nisin on *Staphylococcus aureus* counting and in the characteristics of artisanal Minas cheese from Araxá region.** Advisor: Antonio Fernandes de Carvalho. Co-advisors: Maximiliano Pinto Soares, Mauro Mansur Furtado and Luis Augusto Nero.

Artisanal Minas cheeses are produced with raw milk and are manufactured in five traditional regions with certification in Minas Gerais state corresponding Serro, Canasta, Araxá, Cerrado and Campos das Vertentes. The artisanal Minas cheese traditionally made by hand and from milk without any heat treatment can bring risk to consumer being a disseminator of pathogenic microorganisms mainly *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), which becomes a health risk to the consumer of this product. The aim of this work was to evaluate the effect of adding different concentrations of nisin on the behavior of *S. aureus* in Minas Araxá cheese during the 60 days of ripening. We also investigated the effect of nisin on the physico-chemical properties of proteolysis, texture and color profile of the cheeses during ripening. The work was divided into three steps. In the first stage, the samples of artisanal cheeses from 5 chosen cheese-farms of Araxá region were collected. In addition to the physico-chemical characterization of these cheeses, we also made the isolation of *S. aureus* strains and the identification of the genes that encoding classical enterotoxins (*sea-see*) and the *femA* gene of *S. aureus* isolates. In the second step was performed the *in vitro* test in order to choose which concentration of nisin would be effective against strains *S. aureus* isolates. In the third step, the level of tested nisin were added directly to the milk during the cheese-making. We investigated the effect of different doses of nisin on the microbial contaminants of artisanal Minas Araxá cheese through the counts of *S. aureus*, *mesophilics*, total *coliforms* and *E. coli* counts during ripening. By the third and final step, we identified the genes encoding classical enterotoxins (*sea-see*) and *femA* gene of *S. aureus* isolates from the artisanal cheeses of Araxá region and examined for the presence of staphylococcal enterotoxins in these cheeses during the ripening period. Was also studied the effect of nisin in proteolysis, physico-chemical, texture profile and instrumental color properties of artisanal Minas Araxá cheese throughout the

ripening period. In the analyzed cheese samples of artisanal Minas Araxá cheese, in the first stage of the project, there was the presence of genes encoding enterotoxins in all isolates of *S. aureus*. Of the 12 isolates, 11 had genes for enterotoxins SEA, 1 to the SEB, 5 to the SEC, 7 for SEE and no to the SED, demonstrating the enterotoxigenic potential of these strains. The result of the *in vitro* test performed with the own isolates of *S. aureus* isolates indicated that the levels of nisin 200, 400 and 500 UI.mL⁻¹ showed no statistical difference ($p \geq 0.05$), but the dosage of 400 UI.mL⁻¹ was chosen based on the interference that may occur in the matrix of the cheese relative to the bactericidal effect of nisin as well as to the effect of nisin on cheese properties. The two nisin dosages chosen for use in the “*in loco*” test were 100 and 400 UI.mL⁻¹. Both dosages of nisin were effective in the inhibition of *S. aureus* in the cheese curd, before salting, presenting *S. aureus* counting below 10 CFU.g⁻¹. The dosages of 100 and 400 UI.mL⁻¹ were also effective in the cheese ripening period, showing counts for *S. aureus* below 10 CFU g⁻¹ for all cheeses with nisin addition on 3, 7, 14, 30, 45 and 60 days of ripening. This result shows the bactericidal activity of nisin against *S. aureus* even using low concentrations of nisin as 100 UI.mL. Regarding to the presence of the genes encoding enterotoxins, 92.9% of the strains of *S. aureus* isolated in the third stage of the “*in loco*” test had genes for enterotoxin SEA, 78.6% for SEE and 28.6% for SEC. None of the isolates in the “*in loco*” test showed genes that encoding for enterotoxins SEB and SED. Despite the presence of genes in isolated strains, we not found the presence of enterotoxins in any of the analyzed samples. In physical-chemical properties, nisin significantly ($P < 0.05$) influenced only the pH, moisture and fat content of the cheeses. The different concentrations of nisin not influenced significantly ($P \geq 0.05$) in the cheese ripening indexes, % NS_{pH 4.6} / NT and % NS_{TCA12%} / NT. There was no significant influence ($P \geq 0.05$) of nisin against lactic acid bacteria counts in the cheeses throughout ripening, which helps to explain the similar level of proteolysis for the different concentrations of nisin addition during cheese ripening. To the texture profile parameters, the cheeses with a 400 UI.mL⁻¹ showed highest values of cohesiveness and elasticity in relation to the cheeses with 100 UI.mL⁻¹ and the control cheeses. On the other hand, for firmness, brittleness, gumminess and chewiness no significant influence ($P \geq 0.05$) of nisin was found. In color analysis nisin significantly influenced ($P < 0.05$) only the color coordinate a* that represents the color scale that goes from red to green in the cheeses, but the effect was small. For microbial

contaminants of the cheese, nisin significantly influenced ($P < 0.05$) the aerobic mesophiles, total coliforms and *Escherichia coli* counts. As higher the nisin dosage lower aerobic mesophilic count and higher total coliforms count were found. For cheeses with dosage of 100 UI.mL⁻¹ and the control cheeses *E. coli* counts were similar but for the cheeses with dosage of 400 UI.mL⁻¹ the *E. coli* counts were higher.

1. INTRODUÇÃO

Minas Gerais destaca-se como maior e mais importante produtor de queijos artesanais do Brasil. São 9.445 produtores, pertencentes a cinco regiões tradicionais caracterizadas: 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, 2012a).

O queijo artesanal possui características de sabor, aroma e textura típicas de cada região onde é produzido, motivo pelo qual é tão apreciado pelos consumidores. O queijo Minas artesanal valoriza as tradições e as raízes da cultura mineira e tem sido objeto de pesquisa devido também a sua importância econômica e social. No entanto, existe uma preocupação com a inocuidade dos alimentos e com a qualidade do queijo artesanal que é produzido com leite cru e, por este motivo, pode veicular micro-organismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), o que caracteriza risco de doenças.

A presença de *Staphylococcus* em queijos artesanais pode estar associada à manipulação intensa e inadequada durante o processo de fabricação e ao alto índice de mastite. Diversos estudos (BORELLI et al., 2011, PINTO et al., 2011, BRANT et al., 2007; BORELLI et al., 2006) comprovam a presença de *S. aureus* em queijos artesanais mineiros, em níveis suficientes para a produção de enterotoxinas. Esta preocupação desperta o interesse para o uso de novas tecnologias como a bioconservação de alimentos e para a obtenção de queijos artesanais seguros para o consumo. A técnica é utilizada para estender a vida útil e aumentar a segurança dos alimentos por meio do emprego de bacteriocinas, ou seja, proteínas ou peptídeos antimicrobianos capazes de inibir ou reduzir a multiplicação de bactérias Gram-positivas.

A nisina é a bacteriocina mais conhecida, sendo aprovada para utilização em alimentos há mais de 50 anos, em vários países. O uso de nisina é permitido com limite de 12,5 mg.kg⁻¹ de produto final para todos os tipos de queijos no Brasil e é considerada uma substância GRAS pelo comitê do *Codex Alimentarius* da FAO - *Food and Agriculture Organization*.

Em um estudo realizado por Pinto et al. (2011) a nisina foi utilizada em queijos artesanais da região do Serro, apresentando eficiência contra *S. aureus*, principalmente nas etapas de coagulação do leite e separação do soro. Este fato resultou em menores concentrações iniciais de *S. aureus* no queijo. A utilização de nisina por si só, não implica necessariamente em níveis aceitáveis de *S. aureus*, pois a dose a ser utilizada é dependente da contaminação inicial da matéria-prima (PINTO et al., 2011). Sendo assim, ela pode ser eficiente no controle de *S. aureus* desde que haja cuidados na obtenção do leite e condições higiênicas de manipulação e fabricação do queijo que minimizem a contaminação inicial.

O queijo artesanal fabricado em cada região demarcada (Araxá, Canastra, Serro, Cerrado e Campo das Vertentes) é diferente em sua microbiota e composição físico-química. Além disso, em um estudo já realizado com o queijo do Serro por Pinto et al. (2011), não foram utilizadas cepas de *S. aureus* isoladas da própria região para a escolha das doses de nisina. Por este motivo, pode haver disparidade em relação ao efeito bactericida da nisina nos queijos artesanais da região do Serro e da região de Araxá. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de nisina sobre o comportamento de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal da região de Araxá durante a maturação, envolvendo os seguintes objetivos específicos:

- Isolar estirpes de *S. aureus* de queijos coletados em unidades produtoras selecionadas na região de Araxá;
- Caracterizar os queijos desta região, por meio de análises de composição centesimal e proteólise durante 60 dias de maturação e definir quais queijarias serão utilizadas para as fabricações de queijos com nisina.
- Testar quais doses de nisina seriam mais adequadas para inibir *S. aureus* em um estudo *in vitro*, partindo de estirpes isoladas de queijos artesanais da região de Araxá.
- Investigar o efeito de diferentes doses de nisina sobre a microbiota contaminante do queijo Minas artesanal de Araxá por meio de contagens de *S. aureus*, aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli* ao longo do período de maturação.

- Detectar, utilizando-se a técnica de PCR, os genes que codificam as enterotoxinas clássicas (*sea-see*) e o gene *femA* dos *S. aureus* isolados dos queijos artesanais da região de Araxá.
- Averiguar a presença de enterotoxinas estafilocócicas nestes queijos durante o período de maturação.
- Avaliar o efeito da adição de nisina no desenvolvimento das bactérias lácticas nos queijos ao longo do período de maturação.
- Investigar os índices de proteólise, o perfil físico-químico, de textura e de cor dos queijos, a fim de verificar a influência da nisina sobre as características dos queijos Minas artesanais de Araxá ao longo do período de maturação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O queijo Minas artesanal

Minas Gerais possui séculos de tradição nas práticas de fabricar e de comercializar queijo, bem como de consumi-lo como hábito alimentar indispensável à dieta da população. O preparo especial e a aceitação do queijo Minas Artesanal estão entrelaçados com a própria identidade do Estado, além de manter a sobrevivência de várias famílias fundamentando a economia de municípios e regiões (EMATER, 2003a; MENESES, 2009).

O queijo Minas artesanal é produzido principalmente, nas regiões do Serro, Cerrado (Alto Paranaíba), Canastra, Araxá e Campo das Vertentes consideradas tradicionais e protegidas pela Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 que possibilita a legalidade desses produtos (MINAS GERAIS, 2002b; MINAS GERAIS, 2008) (Figura 1).

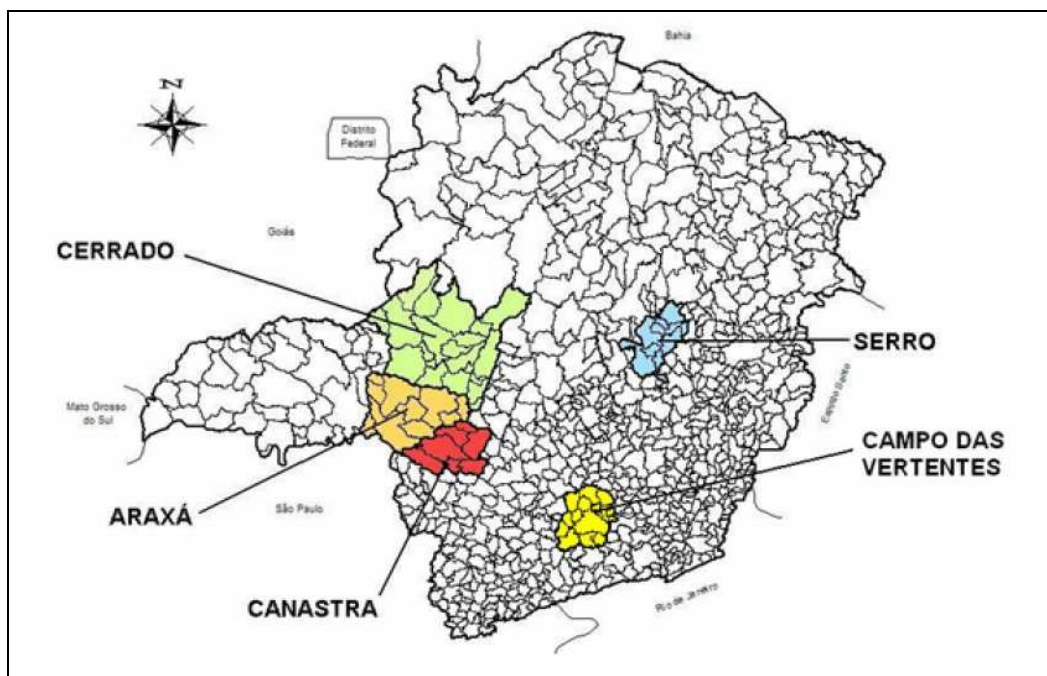


Figura 1 - Regiões produtoras do queijo Minas artesanal (EMATER-MG, 2012).

Atualmente, existem 213 queijarias cadastradas no Programa Queijo Minas Artesanal, sendo 106 na região do Serro, 52 no Cerrado, 31 na Canastra, 23 na região de Araxá e 1 no Campo das Vertentes (IMA, 2012). O Programa Queijo Minas Artesanal, executado pela EMATER-MG, contempla a organização dos produtores, a padronização do processo de fabricação, das queijarias e dos produtos, a normatização de processos, as regulamentação de embalagens, a comercialização e, finalmente, a certificação da origem e qualidade de seus queijos (EMATER, 2012).

O programa visa garantir a inocuidade do queijo, por meio do controle sanitário no processo de produção, incentivar e fortalecer a organização dos produtores, cadastrar os produtores e buscar a certificação de origem e definir a cadeia produtiva (EMATER, 2012). O cadastramento é feito pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e somente em 2010 foram cadastradas 34 queijarias e em 2011 foram 40 queijarias (IMA, 2010; IMA, 2011; IMA 2012).

Os queijos artesanais também são produzidos em outras regiões do estado, mas estas ainda não foram caracterizadas. Em 13 de janeiro de 2011, a Lei 19.492 alterou dispositivos da Lei nº 14.185 e permitiu-se a ampliação do reconhecimento de novas regiões produtoras de queijos artesanais em todo o estado de Minas Gerais e não apenas as regiões do Serro, Canastra, Araxá, Cerrado e Campo das Vertentes. Apesar desta nova Lei ter entrado em vigor em janeiro de 2011, ainda não há queijarias cadastradas de novas regiões produtoras de queijo Minas Artesanal que não sejam das 5 regiões tradicionais (MINAS GERAIS, 2011).

O queijo Minas artesanal é elaborado conforme a tradição histórica e cultural da região onde é produzido, a partir do leite cru integral, hígido, recém ordenhado ou fresco, retirado e beneficiado na propriedade de origem. No processo de fabricação o único ingrediente industrial adicionado ao leite é o coalho, que deve ser bovino e não de origem microbiana. O produto final apresenta consistência, cor e sabor característicos, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas (MINAS GERAIS, 2002b).

O Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais – IEPHA – MG, em reconhecimento à importância econômica e social desta atividade produtiva para o Estado, registrou o modo de fazer do queijo artesanal do Serro como “Patrimônio Imaterial de Minas Gerais”, pelo decreto nº42.505 de 15 de abril de 2002 (MINAS GERAIS, 2002a).

A cadeia de queijos artesanais deve ser ressaltada em virtude de sua grande importância social no processo de manutenção do homem no campo, enfatizando que a existência destes produtos é consequência de seu ambiente histórico e cultural e estes devem ser preservados. A produção artesanal de queijos em Minas Gerais, realizada em fazendas e sítios, se perpetuou, passando de geração em geração e assim manteve uma tradição secular que transformou o queijo mineiro num produto reconhecido nacionalmente e internacionalmente (RIBEIRO, 1989).

2.2. Caracterização do queijo Minas artesanal

O queijo fabricado com leite cru desenvolve sabor e aroma mais intensos que os fabricados com leite pasteurizado. A microbiota do leite cru é responsável pela diversidade de aromas, especialmente em queijos maturados por um longo período e que sofrem intensa profundidade da proteólise (%NS_{TCA} 12%/NT) e lipólise. Conseqüentemente encontra-se elevados níveis de aminoácidos, ácidos graxos livres e compostos voláteis em queijos de leite cru (BACHMANN et al., 2011).

Na fabricação dos queijos artesanais utiliza-se um ingrediente específico de cada região onde é produzido: o fermento lácteo natural, conhecido popularmente como “pingo”. O pingo é o soro recolhido dos queijos já salgados que descansam sobre a “banca” (mesa com canaletas laterais e ligeiramente inclinada) de um dia para o outro. É o soro fermentado reaproveitado da produção do dia anterior, na produção seguinte e contribui de maneira relevante na maturação do queijo (FURTADO, 1980, NOBREGA et al., 2008). Este ingrediente, quando adicionado ao leite cru, direciona a fermentação desejável do queijo na fase inicial do processo de fabricação, pois é rico em bactérias lácticas específicas de cada região e também pode inibir parte de micro-organismos indesejáveis. Dentre as bactérias presentes no pingo estão *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* e estirpes de *Enterococcus* sp., dentre outras (PIMENTEL FILHO et al., 2005).

Lima et al. (2009) estudaram recentemente a microbiota de bactérias lácticas presentes no leite, no soro fermentado (pingo), na coalhada e no queijo Minas artesanal produzido na Cerrado – MG. As espécies de bactérias lácticas mais

freqüentes encontradas neste estudo foram *Lactococcus lactis*, *Enterococcus spp.*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae*.

Durante a maturação, as enzimas dos micro-organismos presentes no leite cru e no pingo e as enzimas do coalho residual atuam especificamente sobre os constituintes da massa de queijo, proporcionando o aroma, textura e sabor característico (BACHMANN et al., 2011; FOX et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2001). Por este motivo, admite-se que o Queijo do Serro seja uma variedade do Queijo Minas, apresentando, porém, sabor característico que o faz um produto peculiar. Por outro lado, este guarda as semelhanças do queijo artesanal da Serra da Canastra e da Serra do Salitre e Araxá, os quais vêm sendo tratados como similares. O queijo Minas artesanal da Canastra apresenta variações nos atributos sensoriais de produtor para produtor. No entanto, quando há o uso de pingo, existe maior constância do perfil sensorial do queijo (SILVA et al., 2007).

Os queijos artesanais necessitam cumprir exigências legais em relação a padrões microbiológicos estabelecidos pela Lei nº 14.185 (MINAS GERAIS, 2002b). Estas exigências inicialmente eram idênticas às da legislação federal para queijos de alta umidade (umidade entre 46 e 54,9%) (BRASIL, 1996), mas foram modificadas pelo Decreto nº 44.864 de 2008 (MINAS GERAIS, 2008), e, atualmente, são idênticos aos padrões estabelecidos para queijos de média umidade (até 45,9% de umidade expressa em base seca) (BRASIL, 1996) descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros microbiológicos da Lei estadual nº 14.185 de 2002 e a Legislação Federal para queijos industriais de média umidade.

Micro-organismo	Lei Estadual	Legislação Federal (Queijos)
	Lei nº 14.185	Média Umidade
Coliformes 30° C	n = 5; c = 2; m = 1.000; M = 5000	n = 5; c = 2; m = 1.000; M = 5000
Coliformes 45° C	n = 5; c = 2; m = 100; M = 500	n = 5; c = 2; m = 100; M = 500
<i>Staphylococcus</i> * Coagulase +	n = 5; c = 2; m = 100; M = 1000	n = 5; c = 2; m = 100; M = 1000
<i>Listeria</i> sp.	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

Fonte: BRASIL, 1996; MINAS GERAIS, 2002b; MINAS GERAIS, 2008.

Várias pesquisas (Tabela 2) vêm sendo realizadas com o intuito de se conhecer a composição físico-química dos queijos artesanais. As variações nas características físico-químicas encontradas nos queijos artesanais produzidos em cada uma das regiões de Minas Gerais demarcadas refletem nas características peculiares de sabor, textura e aroma, conforme citado anteriormente. Os queijos fabricados com leite cru possuem sabor mais intenso e diversificado se comparados aos queijos de leite pasteurizado, o que lhes confere características próprias (BACHMANN et al., 2011).

Tabela 2 – Características físico-químicas do queijo Minas artesanal produzido em diferentes regiões de Minas Gerais.

<i>Região</i>	<i>Maturação (dias)</i>	<i>pH</i>	<i>Gordura (% m/m)</i>	<i>Umidade (% m/m)</i>	<i>Cloretos (% m/m)</i>	<i>Extensão</i>	<i>Profundidade</i>	<i>Proteína total (% m/m)</i>	<i>Referência</i>
Canastra^{1/}	8 dias	5,14	27,59	44,93	1,64	14,32	11,87	24,81	Silva et al., 2011
Canastra^{2/}	8 dias	5,36	28,51	42,52	2,21	10,36	7,18	23,07	Silva et al., 2011
Serro	14 dias	5,01	27,83	38,47	1,96	~ 12,00	~ 7,00	Pinto et al., 2011
Canastra^{1/}	2 dias	5,20	27,50	38,80	2,00	8,90	6,90	22,30	Costa Junior et al., 2009a e 2009b
Canastra^{2/}	2 dias	5,50	21,80	52,00	2,20	10,70	6,70	19,90	Costa Junior et al., 2009a e 2009b
Serro	6 dias	4,98	29,22	50,84	4,39	9,18	17,06	Machado et al., 2004
Araxá	8 dias	4,85	28,29	45,05	2,06	9,35	5,43	24,40	Martins et al., 2004a
Alto Paranaíba	8 dias	5,08	26,50	43,12	1,74	10,34	4,26	25,20	Martins et al., 2004b
Serro	8 dias	4,75	28,21	48,22	1,62	11,01	4,62	22,40	Martins et al., 2004c

1/ período das águas; 2/ período da seca.

As variações encontradas nestes diferentes estudos (Tabela 2) ocorrem devido a diversos fatores como a microbiota endógena local do leite cru e do pinga ligada a fatores físicos, geográficos e naturais (solos, pastagens, altitude, clima, relevo e

vegetação) (IEPHA, 2011). Outros fatores que afetam a composição dos queijos são as estações do ano, as diferentes técnicas empregadas na fabricação, as condições de maturação (temperatura e umidade relativa do ar), a alimentação animal, a heterogeneidade racial do rebanho leiteiro e variações de manejo (COSTA JUNIOR et al., 2009a; SILVA et al., 2011).

2.3. O queijo Minas artesanal da região de Araxá

A região de Araxá está localizada no Planalto de Araxá, integrando a região do Alto Paranaíba, no sudoeste do estado de Minas Gerais, sendo que suas terras formaram, no passado, um amplo território. Estabelecido como um dos primeiros núcleos de ocupação colonial que incluía, ainda, o chamado Triângulo Mineiro, Araxá nasceu como fruto da atuação dos criadores de gado e dos tropeiros na lida diária em busca da sobrevivência (EMATER, 2003b).

O clima de Araxá é temperado com inverno seco e verão chuvoso. A temperatura média do mês mais quente é superior a 22 °C e do mês mais frio é inferior a 18°C. A umidade relativa média é de 75,6% (EMATER, 2003b). As diferentes temperaturas e umidade relativa do ar podem influenciar nas condições de maturação do queijos nas câmaras (FOX, 2004), visto que estes parâmetros não são controlados.

O queijo Minas artesanal de Araxá é produzido nos municípios de Araxá, Campos Altos, Ibiá, Pedrinópolis, Perdizes, Sacramento, Santa Juliana, Uberaba, Conquista, Pratinha e Tapira (Figura 2). Anualmente, 11.000 toneladas de queijos são colocadas no mercado por 1.136 propriedades, gerando cerca de 2.840 empregos diretos (EMATER, 2003b).

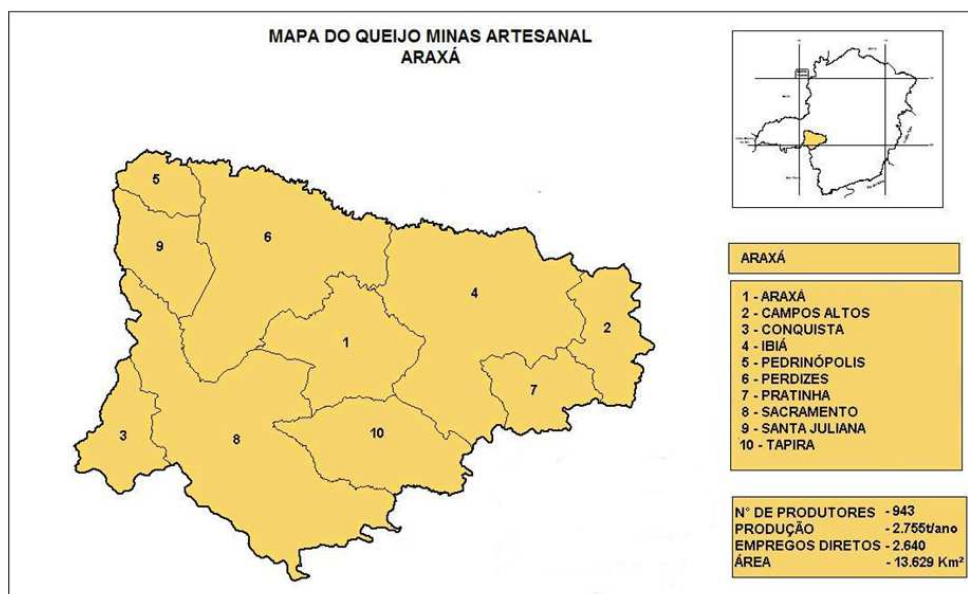


Figura 2. Região de produção queijo Minas artesanal de Araxá – MG (EMATER-MG, 2012).

O queijo de Araxá possui formato cilíndrico, com aproximadamente 14 a 17 cm de diâmetro e 4 a 7 cm de altura. A casca forma uma crosta fina e amarelada quando maturada e em seu interior possui cor amarelo claro, próximo ao branco, com textura firme e sabor levemente ácido (EMATER, 2003b).

No processo de fabricação (Figura 3), adiciona-se ao leite cru o fermento natural (ou “pingo”) e o coalho. A filtração do leite é feita após a ordenha, em tecido de algodão popularmente conhecido como “tecido volta ao mundo” ou peneira plástica e tem por objetivo eliminar a presença de sujidades (ARAÚJO, 2004).

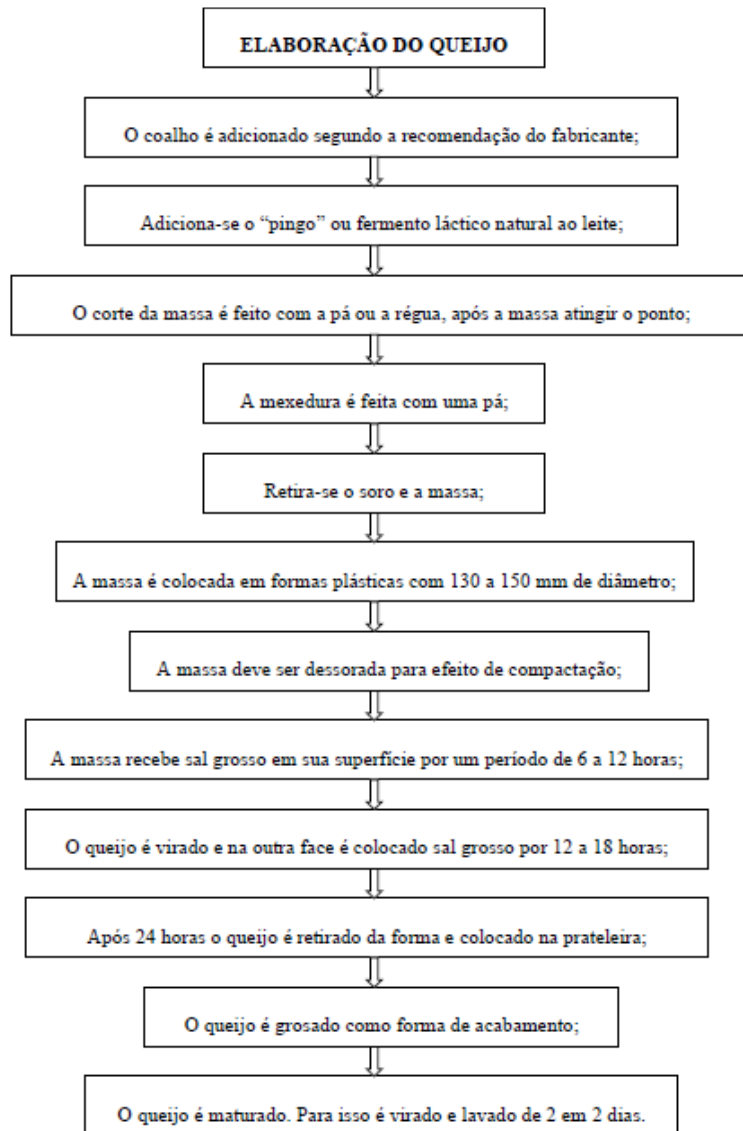


Figura 3 – Processo de fabricação do queijo Minas Artesanal de Araxá (EMATER, 2003b).

A coagulação do leite é feita em tambores plásticos (bombonas) na maioria das propriedades de Araxá, o que dificulta o corte da massa, principalmente pelo uso de pás que muitas vezes são de madeira, o que caracteriza como potencial fonte de contaminações do produto (FERREIRA e FERREIRA, 2011). O uso de pás e bombonas plásticas contribui também para um produto sem uniformidade, além de gerar perdas de finos no soro e diminuir o rendimento de fabricação do queijo (ARAÚJO, 2004).

A dessoragem e a prensagem da massa é feita com as mãos, juntamente com o tecido volta ao mundo quando, em seguida os queijos são acondicionados em formas plásticas sem fundo. O processo de salga é realizado em 2 etapas: na primeira

o sal grosso é distribuído sobre os queijos, logo após a enformagem permanecendo por aproximadamente 6 horas e a segunda é realizada depois da viragem do queijo com duração de 12 a 18 horas (ARAÚJO, 2004)..

Após a salga o queijo é lavado com água para retirar o excesso de sal e passa por um processo denominado grosagem que é a raspagem da casca do queijo para fins de acabando. Após esta etapa, o queijo permanece em prateleiras de madeira para completar a maturação, em temperatura ambiente e sem controle de umidade relativa do ar (ARAÚJO, 2004).

Economicamente, a produção do queijo Araxá tem aspecto relevante, pois dinamizou a produção local de tal forma que em torno dele constituiu-se um mercado, gerando divisas para a cidade e para a região. A dificuldade de escoamento da produção de leite cru, o isolamento das propriedades, situadas em locais de difícil acesso e a distância dos grandes laticínios ainda são indicadores que estimulam a produção deste tipo de queijo (EMATER, 2003b).

2.4. A segurança dos queijos artesanais

O Queijo Minas Artesanal é um patrimônio cultural do Estado e sua fabricação é uma tradição nas regiões produtoras. No entanto, este produto é feito com leite cru, sem a proteção prévia da pasteurização e pode representar um risco à saúde pública se não seguir com rigor os cuidados sanitários durante o processo de produção (IMA, 2010). Dessa forma, quando há procedimentos que apresentam ausência das Boas Práticas, nas etapas do processamento do queijo Minas artesanal, há exposição deste a muitas fontes de contaminação, o que compromete diretamente a sua qualidade, além de afetar a saúde do consumidor (PINTO et al., 2009b).

A comercialização de queijos elaborados a partir de leite cru é proibida no Brasil, quando o prazo de maturação é menor que 60 dias (BRASIL, 1996), devido ao risco potencial que representa à saúde do consumidor, oriundo das condições precárias de processamento nas fazendas produtoras e clima desfavorável para manuseio do leite cru a temperatura ambiente (CARIDI *et al.*, 2003).

Os queijos artesanais são protegidos pela Lei 14.185, de 31 de janeiro de 2002 (MINAS GERAIS, 2002b), que permite que estes sejam fabricados e comercializados seguindo parâmetros diferenciados. Até 2011 a comercialização dos

queijos artesanais com menos de 60 dias de maturação era permitida, no entanto somente dentro do estado de Minas Gerais. Para isso, as queijarias deveriam ser cadastradas pelo IMA e os queijos deveriam possuir valores de umidade e contagens microbiológicas dentro dos limites permitidos por esta Lei, não existindo, portanto um período de maturação específico exigido para os queijos artesanais.

Contudo, a partir de 15 de dezembro de 2011, por meio da IN 57 do MAPA, foi permitida a comercialização do queijo Minas artesanal com período de maturação inferior a 60 dias fora do Estado de Minas, desde que sejam cumpridas as condições exigidas por esta Instrução Normativa (BRASIL, 2011). Estudos técnico-científicos devem comprovar que a redução no período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do queijo (BRASIL, 2011).

Com a IN 57, os queijos Minas artesanais serão incluídos no Sistema Brasileiro de Inspeção de Produto de Origem Animal (SISBI-POA) do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA). Hoje, os queijos artesanais podem ser comercializados na cidade de origem com o selo do Serviço de Inspeção Municipal (SIM), ou dentro do Estado com o selo do Serviço de Inspeção estadual (SIE). A partir da inclusão dos lácteos no SUASA, os produtos com os selos estaduais e municipais poderão ser comercializados em todo o País, com equivalência ao selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF) (MAPA, 2011).

Os queijos fabricados com leite cru e que passam por um curto período de maturação podem oferecer riscos ao consumidor devido à possível presença de patógenos. Além de microorganismos benéficos, o leite cru pode conter uma variedade de bactérias patogênicas e bactérias com um estado controverso de segurança, por exemplo, enterococos exibindo resistência a antibióticos e bactérias produtoras de aminas biogênicas (BACHMANN et al., 2011).

A contaminação do leite começa no momento da ordenha, quando essa é realizada sem obedecer aos preceitos de higiene adequados. O próprio ordenhador é fonte de contaminação do produto, além dos equipamentos, água utilizada, sanidade inadequada do rebanho e condições de higiene praticadas nas diferentes fases de fabricação e comercialização do queijo artesanal (PINTO et al., 2004; PAULA et al., 2007). A sobrevivência de patógenos presentes no leite cru é dependente da tecnologia utilizada no processamento de queijo. A taxa de acidificação e a combinação de tempo-temperatura do processo, mesmo durante a maturação, bem

como a umidade e teor de sal dos queijos constituem os principais fatores que afetam a sobrevivência e a multiplicação de patógenos (BACHMANN et al., 2011).

Em um estudo conduzido por Pinto et al. (2009b) acerca das fontes de contaminação do queijo Minas artesanal do Serro, foi verificada que a ausência de bons hábitos higiênicos dos manipuladores foi relacionada às contagens de coliformes 30°C e *E. coli*, enquanto a presença de animais domésticos obteve correlação com a pesquisa de coliformes 30°C e *S. aureus*.

Devido ao grande risco para os consumidores, queijos elaborados a partir de leite cru foram abandonados na Espanha e na Grécia desde o final da década de 80. Estes são agora produzidos de forma semi-artesanal, envolvendo a pasteurização e a substituição de equipamentos tradicionais por outros modernos, capazes de atender aos padrões higiênicos e tecnológicos, sendo ainda necessária a qualificação dos manipuladores, aliada às boas práticas de fabricação para a produção de um queijo que atenda aos padrões estabelecidos pela legislação vigente (OLARTE et al., 1999; MANOLOPOLOU et al., 2003).

Além dessas alternativas, as bactérias lácticas presentes no leite cru e em fermentos naturais podem produzir compostos antimicrobianos contra bactérias que causam doenças que podem ser veiculadas por alimentos (PINTO et al., 2009a), o que caracteriza uma forma de controle dessas bactérias patogênicas nos produtos lácteos. No entanto, em um estudo realizado por PINTO et al. (2009a), foi comprovado que as bactérias lácticas presentes no leite e no fermento natural não são suficientes para garantir a ausência de *Listeria innocua* em queijo Minas artesanal do Serro, mesmo após 60 dias de maturação, como é exigido pela legislação brasileira (PINTO et al., 2009a).

Em estudo realizado com queijo Minas Frescal produzido artesanalmente, foi reportado que em 96,67% do total de 30 amostras foram encontradas contagens de *S. aureus* superiores a 10^3 UFC.g⁻¹, estando apenas 1 amostra (3,33%) em conformidade com o padrão legal (LOGUERCIO e ALEIXO, 2001). Ferreira et al (2011) avaliaram a qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal artesanal e os resultados obtidos mostraram que 90% das amostras estavam com contagem acima do padrão estabelecido para *Staphylococcus coagulase positiva*.

Souza et al. (2003) verificaram que para o queijo artesanal Serrano é necessário um tempo de maturação superior a trinta dias como fator de estabilização microbiológica. Na maioria das vezes, a maturação não é um fator respeitado no que

diz respeito ao comércio de queijos artesanais. O produtor do queijo artesanal é necessário devido ao seu papel social, mas pode ser um empecilho às adequações, uma vez que é pressionado a entregar o queijo sem maturá-lo (PINTO et al., 2004) e, por isso, o queijo não atinge o período necessário para que esteja estável microbiologicamente e, conseqüentemente, de qualidade satisfatória.

Os patógenos mais freqüentemente encontrados em queijos de leite cru são *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Se a contagem de *S. aureus* excede 10^5 UFC.g⁻¹, quantidades significativas de enterotoxinas de estafilococos (SET) podem ser formadas e permanecerão na coalhada por meses, embora as bactérias diminuam progressivamente durante o período de maturação (BACHMANN et al., 2011). Por este motivo, esse micro-organismo deve ser motivo de preocupação e de pesquisas.

2.5. *Staphylococcus* spp.

2.5.1. Características gerais

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família *Micrococcaceae* e aparecem na forma de aglomerados que lembram um cacho de uva, quando vistos ao microscópio (TORTORA et al., 2005; SILVA et al., 2010). Estes micro-organismos são anaeróbios facultativos, mesófilos, halotolerantes (toleram concentrações de 10% a 20% de sal) e se desenvolvem em valores de atividade de água entre 0,83 e 0,99 (JAY, 2005).

O homem e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*. A cavidade nasal é o principal habitat dos estafilococos no homem, assim como a pele e as mucosas. Podem ser encontrados nas mãos de manipuladores, em feridas contaminadas, no úbere de vacas com mastite e no ambiente (HOBBS e ROBERTS, 1998).

Estão incluídas no gênero *Staphylococcus* sp. pelo menos 46 espécies, dessas, somente sete são coagulase positivas e geralmente produzem termonuclease, são elas: *Staphylococcus aureus* subspécie *aureus*, *Staphylococcus aureus* subspécie *anaerobius*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus*

lutrae, *Staphylococcus pseudointermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus delphini* (EUZÉBY, 2012).

Os *Staphylococcus* coagulase positiva são aquelas espécies capazes de coagular o plasma do sangue de coelho e estão associadas à produção de enterotoxinas. Neste grupo, a espécie mais conhecida é *S. aureus* (PINTO et al., 2006).

No entanto, algumas espécies são coagulase negativas como *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus haemolyticus*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis* (VERNOZY-ROZAND et al., 1996; PINTO et al., 2006; COTON et al., 2010, PIENSSENS et al., 2012) e podem produzir toxinas.

No Brasil não há legislação com determinação de limites para *Staphylococcus* coagulase negativa em alimentos (FREITAS et al., 2009). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) reconhece apenas os *Staphylococcus* coagulase positiva como produtores de enterotoxina (BRASIL, 1998; VERAS et al., 2008), mesmo com estudos que relatam a produção de toxinas por estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativa (CRASS e BERGDOLL, 1986; DE LUCA, 1997; AARESTRUP et al., 1999).

2.5.2. Intoxicação alimentar e enterotoxinas de *Staphylococcus* spp.

Em muitos países, o *S. aureus* é considerado o segundo ou terceiro patógeno mais comum responsável por surtos de intoxicação alimentar (VERAS et al., 2008). A intoxicação causada por *S. aureus*, manifesta-se logo após a ingestão do alimento contaminado por enterotoxinas pré-formadas (BORGES et al., 2008). As enterotoxinas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis, resistentes a cocção e às enzimas proteolíticas do sistema digestivo como a pepsina. Por isso, mantém a atividade após a digestão do alimento (SILVA et al., 2010).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma doença comum, muitas vezes transmitida por alimentos submetidos ao manuseio inadequado, uma vez que os manipuladores de alimentos podem ser portadores de *Staphylococcus* spp. (PINTO et al., 2006).

A intoxicação geralmente não é letal, sendo os idosos mais susceptíveis à intoxicação via ingestão de alimentos do que os jovens. Somente em casos isolados, doses agudas de enterotoxinas podem causar a morte devido a complicações e à intensidade dos sintomas. A reação do indivíduo varia de acordo com o seu grau de susceptibilidade, com a concentração da enterotoxina presente no alimento e com a quantidade de alimento ingerida (BORGES et al., 2008).

Após a ingestão do alimento contendo a toxina estafilocócica, os sintomas começam de forma aguda, com náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, calafrios e presença ou não de febre. A duração dos sintomas é de aproximadamente 24-48 horas, quando há suporte e cuidados apropriados (VERAS et al., 2008). Na maioria dos casos, a intoxicação estafilocócica não é notificada no Brasil pela população e a classe médica aos órgãos de Vigilância Sanitária, pois se trata de uma doença de curso rápido e na maioria dos casos os indivíduos afetados não necessitam de atendimento médico (BORGES et al., 2008).

A produção de níveis de toxinas necessária para ocasionar a intoxicação ocorre com 10^5 a 10^6 micro-organismos por grama do alimento, no entanto este valor é afetado pela temperatura, pH, atividade de água, concentração de sal e disponibilidade de oxigênio (SILVA e GOMES, 2001; BORGES et al., 2008). Estas toxinas causam síndromes e têm sido associadas a surtos de intoxicação alimentar e causadoras de complicações do sistema auto-imune. As toxinas estafilocócicas representam a família dos principais grupos sorológicos de toxinas termoestáveis; elas agem como potentes toxinas gastrintestinais e também como superantígenos que estimulam a proliferação não-específica das células T (BALABAN e RASOOLY, 2000). A quantidade de toxina requerida para o aparecimento dos sintomas de intoxicação é baixo, da ordem de 20ng a 1µg (PELISSER et al., 2009).

Há cerca de 10 anos eram nove as toxinas estafilocócicas conhecidas: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ (BALABAN e RASOOLY, 2000), sendo a toxina SEC subdividida em SEC₁, SEC₂ e SEC₃ (CARMO et al., 2002). No entanto, novas toxinas foram isoladas em estudos recentes: SEK, SEL, SEM, SEN, SEN_v, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU, SEU_v (JERRAUD et al., 2001; FITZGERALD et al., 2001; ORWIN et al., 2001; YARWOOD et al., 2002, LETERTRE et al., 2003; OMOE et al., 2003; BLAIOTTA et al., 2004; SCHERRER et al., 2004; OMOE et al., 2005).

Apesar da variedade de enterotoxinas estafilocócicas existentes, 95% dos casos de intoxicação alimentar são causadas pelas enterotoxinas clássicas: SEA, SEB, SEC, SED e SEE (PELISSER et al., 2009). As toxinas SEC e SED estão associadas à contaminação animal, enquanto as toxinas SEA e SEB estão relacionadas à contaminação de origem humana (FREITAS et al., 2009; BERGDOLL et al., 1990).

2.5.3. *S. aureus* em leite e derivados

O *S. aureus* é a espécie contaminante de maior prevalência em leite e queijos, principalmente os artesanais, incluindo estirpes de estafilococos enterotoxigênicas e está frequentemente associado a surtos de intoxicação alimentar (VERAS et al., 2003; BORGES et al., 2008; FREITAS et al., 2009). O principal reservatório do *S. aureus* é o quarto de teto infectado de vacas com mastite, o que caracteriza fonte comum de contaminação do leite (AHMADI et al., 2010). O leite cru pode representar risco à saúde do consumidor, especialmente nos casos em que não há padrões sanitários adequados do leite e seus derivados ou em casos de pasteurização deficiente (SANTOS et al., 1981).

Em pesquisa realizada com o Queijo Canastra por Dores (2007), os níveis de *S. aureus* encontrados estavam acima do indicado pela legislação (MINAS GERAIS, 2002b) e somente aos 22 dias de maturação sob temperatura ambiente, atingiram os níveis microbiológicos recomendados. Neste mesmo trabalho, não foi detectada toxina estafilocócica, embora outros autores (ORNELAS, 2005; BORELLI et al., 2006) em trabalhos anteriores, nessa mesma região, tenham detectado a presença desta nos queijos avaliados. Em pesquisa realizada por Pinto (2004), o queijo Minas artesanal do Serro apresentou índices de *Staphylococcus* sp. acima de 10^6 UFC.g⁻¹, embora não tenha sido detectada a presença de enterotoxinas (PINTO, 2004).

Freitas et al. (2009) identificaram *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijo de coalho. As contagens variaram de 10^2 a 10^6 UFC.g⁻¹. Os genes toxigênicos SEG, SEH, SEI e SEJ foram identificados em 18 dos 20 isolados de *Staphylococcus* sp.

O queijo Minas artesanal do Serro pode oferecer risco à saúde do consumidor por apresentar média de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva de $1,2 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ (BRANT et al., 2007).

Feitosa et al. (2003) encontraram contagens de *S. aureus* variando de 10^7 a 10^8 UFC.g⁻¹ em amostras de queijo de coalho e contagens de 10^2 a 10^6 UFC.g⁻¹ em amostras de queijos manteiga comercializados no Rio Grande do Norte.

Recentemente, em estudos conduzidos por Borelli et al. (2011), em queijos Minas artesanais da região da Canastra foram encontradas contagens de *Staphylococcus* spp. entre 10^3 e 10^8 UFC.g⁻¹ ao longo dos 60 dias de maturação. Neste mesmo estudo, todos os isolados coagulase positivos nos testes fisiológicos apresentaram o gene *coa* e nenhum dos isolados de *Staphylococcus* apresentou os genes que codificam para a produção das enterotoxinas SEA, SEB, SEC ou SED. Como esperado, devido à ausência de genes que codificam as enterotoxinas, as mesmas não foram detectadas em nenhuma das amostras de queijo analisadas.

2.5.4. Técnicas moleculares para identificação de *S. aureus* e suas respectivas enterotoxinas

A identificação de *S. aureus* em alimentos pode ser feita com três objetivos diferentes: o primeiro, relacionado com a saúde pública, para confirmar o envolvimento em surtos de intoxicação alimentar. O segundo, relacionado com o controle da qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, em que *S. aureus* serve como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanitização das superfícies destinadas ao contato com alimentos. E o terceiro objetivo é verificar se o alimento é uma fonte potencial de *S. aureus* (SILVA et al., 2010).

Algumas técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são utilizadas para a identificação de isolados de *S. aureus* e seus respectivos genes específicos de enterotoxinas em estudos epidemiológicos. As técnicas bioquímicas (testes de produção de catalase, termonuclease, coloração de Gram) também são utilizadas para identificação de *S. aureus*. No entanto, requerem mais tempo e o baixo número de bactérias pode não ser detectado e conferir resultados falso negativos (AHMADI et al., 2010).

A PCR copia as fitas da sequência de DNA desejada, amplificando o DNA alvo. O processo envolve ciclos de variação da temperatura. Com o aquecimento, as fitas de DNA são separadas; em seguida, a temperatura é abaixada para que os primers anem-se ao DNA por complementariedade de bases. Em seguida, com

pequena elevação da temperatura, a enzima Taq DNA polimerase, em presença de outros fatores e dos dNTPs (nucleotídeos trifosfatados), copia a fita molde. Assim, novas fitas de DNA são produzidas a cada ciclo (BONETTI et al., 2006).

Na técnica de PCR todos os reagentes necessários são adicionados em um termociclador que ajusta temperatura, tempo e número de ciclos desejados. O processo ocorre exponencialmente e após 25 a 40 ciclos de amplificação (elevação e abaixamento da temperatura) são obtidas bilhões de cópias do segmento do DNA de interesse, material que pode, então, ser examinado com facilidade. A interpretação dos resultados é feita pela análise da amostra amplificada em eletroforese em gel de agarose (BONETTI et al., 2006).

A PCR é um método útil na detecção dos genes responsáveis pela identificação do patógeno e de enterotoxinas estafilocócicas, apresentando-se como uma técnica de rápida execução, que pode ser feita em horas, além de ser sensível, pois poucas células de patógenos são necessárias para produzir um diagnóstico positivo (AHMADI et al., 2010). A identificação do gene coagulase (*coa*) e do gene *femA* pela PCR é efetiva para comprovar a presença *S. aureus* em fontes humanas e animais. O gene *femA* codifica um fator essencial para a resistência a metilina e é universalmente presente em todos os isolados de *S. aureus* (MEHROTRA et al., 2000).

Ahmadi et al. (2010) detectaram o gene *coa* em amostras de leite cru como um método desenvolvido para identificação de *S. aureus*. Estes autores ressaltam que a técnica de PCR é um método rápido e de alta sensibilidade para diagnóstico de *S. aureus* em leite cru. Das 100 amostras de leite testadas, 14% foram positivos nas análises utilizando meio de cultura, enquanto 21% das amostras foram positivas usando a amplificação do gene *coa*, demonstrando maior sensibilidade de detecção da técnica de PCR.

A técnica de PCR-multiplex permite que numa mesma reação sejam detectados vários genes responsáveis pelas enterotoxinas (CREMONESI et al., 2005). A PCR-multiplex foi empregada para investigar a presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas (*SEA*, *SEB*, *SEC*, *SED* e *SEE*) e do gene *femA*, específico para *S. aureus*, em estirpes de estafilococos coagulase positiva isoladas de queijos e derivados cárneos comercializados em Santa Catarina. De 102 estirpes, 91 foram positivas para *femA*, 10 para *sea*, 12 para *sed* e 4 para *see*. Neste estudo também se verificou que produtos inspecionados pelo SIF (Serviço de Inspeção

Federal) apresentaram contagens de *S. aureus* inferiores (média de $1,4 \times 10^3$ UFC.g⁻¹) quando comparados a produtos inspecionados pelo SIE (Serviço de Inspeção Estadual) e SIM (Serviço de Inspeção Municipal), médias de $1,5 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ e $1,7 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ respectivamente (PELISSER et al., 2009).

Um estudo realizado por Freitas (2009) et al. comprovou que os genes toxigênicos *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* foram identificados em 18 dos 20 isolados de *Staphylococcus* spp. em queijo de Coalho, com os seguintes percentuais 5, 11, 9, 20, 16, 25 e 14% respectivamente.

2.6. Bacteriocinas de bactérias lácticas

As bactérias lácticas desempenham importante papel na fabricação da maioria dos queijos devido a produção de ácido láctico que auxilia na sinérese do gel e na desmineralização da coalhada. Além disso, essas bactérias possuem a capacidade de inibir ou reduzir a multiplicação de bactérias Gram-positivas, como importantes patógenos de veiculação alimentar como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *S. aureus*, por meio da produção de compostos antagônicos. Estes compostos são formados em pequenas quantidades a partir do catabolismo celular, dentre os quais estão as bacteriocinas (MORENO et al., 2008; LEROY & VUYST, 2010; MELLO et al., 2010).

As bacteriocinas são proteínas, complexos protéicos ou peptídeos biologicamente ativos sintetizados no ribossomo e liberados no meio extracelular. Têm ação em bactérias Gram-positivas, retardando ou inibindo sua multiplicação (CLEVELAND et al, 2001, NASCIMENTO et al., 2008).

O estudo das bacteriocinas começou em 1925, com a descoberta das colicinas produzidas por *Escherichia coli*. Apesar das limitações, como a bactéria em questão (não desejável em alimentos) e o foco das pesquisas serem os micro-organismos Gram- negativos, foi possível o desenvolvimento de métodos de detecção e isolamento de outras classes de bacteriocinas (ROSA e FRANCO, 2002).

Existem dois tipos de bacteriocinas. As mais comuns exibem um espectro de atividade apenas contra as espécies homólogas e as demais possuem ação contra uma variedade de micro-organismos Gram-positivos (MORENO et al., 2008). As bactérias lácticas, as bacteriocinas produzidas por elas e seu espectro de atividade estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas e que apresentam amplo espectro de atividade

Espécie produtora	Bacteriocina	Espectro de atividade
<i>L. lactis subsp. lactis</i>	Nisina	Bactérias Gram-positivas
	Lacticina 481	<i>Clostridium</i>
	Bacteriocina V e VII	<i>Clostridium</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactacina F	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. curvatus</i>	Curvacina A	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>L. carnis</i>	Bacteriocina S	<i>Enterococcus</i>
		<i>Listeria</i>
<i>L. sake</i>	Sakacina A	<i>Enterococcus sp.</i>
	Sakacina P	<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus sp.</i>	Bacteriocina	<i>Clostridium ramnosum H1</i>
<i>Leuconostoc</i>	Leucocina A-UAL 187	<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroide</i>	Mesenterocina 5	<i>Listeria monocytogenes</i>
	Mesenterocina Y105	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocina A	Bactérias Gram-positivas
<i>Pediococcus</i>	Pediocina PA1	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Streptococcus bovis HC5</i>	Bovicina HC5	<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>S. aureus</i>

(Fonte: Mantovani et al., 2002, Moreno et al., 2008, Pimentel Filho 2010a, Pimentel Filho 2010b).

Uma bacteriocina pode ser empregada na indústria de alimentos desde que a linhagem produtora tenha *status Generally Recognized as Safe* (GRAS). Deve apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos ou ser amplamente específica sobre algum deles, deve ser termoestável e não deve apresentar riscos ao consumidor. Deve também aumentar a segurança do alimento, sem afetar a qualidade nutricional e sensorial do mesmo (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

A nisina é a bacteriocina mais conhecida, aprovada para a conservação de alimentos há mais de 50 anos, em vários países. As outras bacteriocinas mais

estudadas são as pediocinas e as enterocinas, principalmente devido à sua ação anti-*Listeria* (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Outra bacteriocina estudada na inibição de bactérias deterioradoras e patogênicas veiculadas por alimentos é a bovicina HC5 (produzida por *Streptococcus bovis* HC5) e possui potencial inibidor igual ou maior do que o da nisina (PIMENTEL FILHO *et al.*, 2010).

2.7. Nisina

A nisina é uma bacteriocina naturalmente produzida em produtos fermentados, foi descoberta em 1928 e vem sendo consumida há séculos (MELO *et al.*, 2005). É utilizada em mais de 50 países, nos mais diversos produtos como queijos, inclusive queijos processados, vegetais, frutas enlatadas, produtos de padaria, cremes de confeitaria, leite, produtos lácteos, pudins, carne processada, embutidos (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 de 12,5 mg.kg⁻¹ de produto final para todos os tipos de queijos (BRASIL, 1996) e requeijão (BRASIL, 1997). Possui baixa toxicidade e eficiência como conservante de alimentos, além de ser considerada GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo comitê do *Codex Alimentarius* da FAO (*Food and Agriculture Organization*) (MELO *et al.*, 2005). Cleveland *et al.* (2001) avaliaram a produção de nisina por 40 estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis* e observaram que a bacteriocina foi produzida por 35 estirpes.

A molécula da nisina (Figura 3) é um peptídeo de 34 aminoácidos que possui peso molecular de 3,5 kDa, sendo formada por oito alaninas, quatro ácidos aminobutíricos (ABA), três glicinas, três isoleucinas, três lisinas, duas leucinas, duas histidinas, duas metioninas, uma serina, uma valina, uma prolina, uma asparagina e os aminoácidos incomuns deidroalanina (DHA) e deidrobutirina (DHB) (MELO *et al.*, 2005).

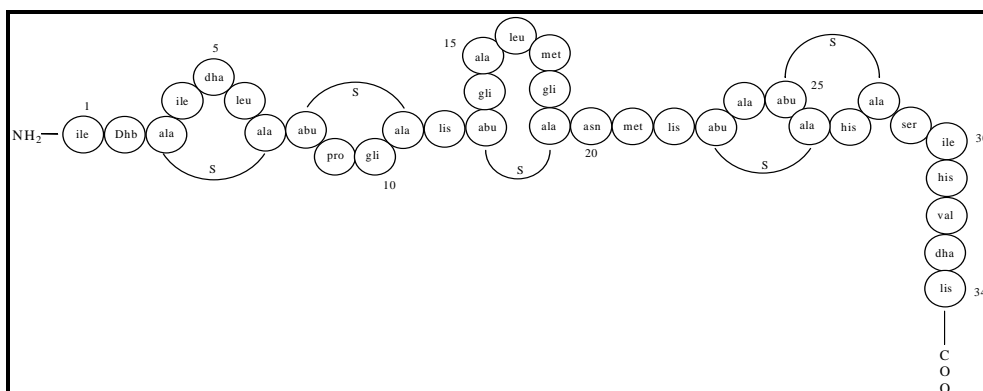


Figura 4. Representação da estrutura química da molécula de nisin (SEBTI e COMA, 2002; MELO, 2005).

Uma propriedade química importante da nisina é sua 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).

A nisina possui amplo espectro de ação contra a maioria das bactérias Gram-positivas, inclusive as formadoras de esporos, sendo seu principal mecanismo de ação relacionado à formação de poros na membrana citoplasmática, por meio da interação eletrostática com os fosfolípidos da membrana, resultando no extravasamento de material celular e conseqüentemente à morte (McAULIFFE et al., 1998; ADAMS, 2003).

Pinto et al. (2011) verificaram o efeito antagônico de nisina sobre *S. aureus* em queijo Minas artesanal do Serro. Neste estudo, a bacteriocina foi efetiva na redução da população de *S. aureus* entre a inoculação da nisina no leite até o momento da obtenção da massa. Houve uma redução de 1,2 e 2,0 ciclos log na contagem de *S. aureus* a partir do sétimo dia de maturação para os queijos contendo 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina, respectivamente, em comparação ao queijo controle.

Kykkidou et al. (2007) avaliaram 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 de nisina e foram armazenados em condições aeróbias, a 4°C, por 42 dias. Houve um aumento na vida de prateleira dos queijos de 21 dias no queijo controle, para 35 dias nos queijos adicionados de 50 UI.g⁻¹ de nisina e 42 dias naqueles adicionados de 150 UI.g⁻¹ (KYKKIDOU, et al., 2007).

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% *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e coalho, (2) 1% de fermento mesofílico e coalho, (3) 1% *Lactococcus lactis* subsp *lactis* + 1% de fermento mesofílico e coalho e (4) sem fermento e com coalho. Apenas nos queijos adicionados de *L. lactis* havia nisina detectável, sendo que no queijo adicionado apenas de *L. lactis* foi significativamente maior que quando em conjunto com fermento. A redução de *L. innocua* foi significativamente maior no tratamento em que se usou somente *L. lactis* (4,62 log UFC.g⁻¹).

Os estudos supracitados indicam que a nisina pode ser uma alternativa para inibir bactérias Gram-positivas, principalmente em leite e derivados, no entanto, é necessário que pesquisas sejam conduzidas em cada tipo de produto, pois a matriz dos diferentes alimentos pode influenciar a atuação da nisina, favorecendo ou inibindo sua capacidade bactericida. Estudos sobre aplicação de nisina em queijos artesanais ainda são limitados. As pesquisas nesta área podem avançar, principalmente em relação ao efeito da nisina sobre outras bactérias patogênicas em queijos artesanais fabricados nas diferentes regiões de Minas Gerais e do Brasil.

No caso dos queijos artesanais da região de Araxá, a inibição de *S. aureus* pelo uso de nisina seria uma forma de manter a segurança do produto, que não passa por tratamento térmico e é muito manipulado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As análises físico-químicas e microbiológicas deste estudo foram conduzidas nos laboratórios do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em Juiz de Fora – MG. As análises de PCR foram realizadas no Laboratório de BIOMOL - Departamento de Medicina Veterinária e as análises do perfil de textura e avaliação da cor foram feitas no Laboratório de Embalagens - Departamento de Tecnologia de Alimentos, ambos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. A análise de detecção de enteroxinas nos queijos foram realizadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Os experimentos *in loco* foram conduzidos em unidades produtoras de queijo artesanal da região de Araxá-MG e no laboratório de microbiologia do Laticínio Dona Beija, na cidade de Araxá-MG.

O experimento foi realizado em três etapas, três repetições e três tratamentos: controle (sem adição de nisina) e tratados em duas concentrações diferentes de nisina, definidas no teste *in vitro*. Os queijos foram maturados em temperatura ambiente, por 60 dias, conforme exigido na legislação para queijos produzidos com leite cru.

3.1. 1ª Etapa – Caracterização do queijo Minas artesanal da região de Araxá, isolamento de *S. aureus* e identificação de genes que codificam enteroxinas clássicas

3.1.1. Seleção das Propriedades

Foram selecionadas 5 unidades produtoras na região de Araxá cadastradas pelo IMA, num universo de 20 propriedades cadastradas. Outros critérios de escolha das propriedades foram adequação de instalação, sanidade do rebanho, as Boas Práticas de Fabricação, higiene na ordenha, salubridade da queijaria e o processo de fabricação em si. A escolha foi feita em conjunto com o IMA e a EMATER desta região.

3.1.2. Coleta dos queijos

Inicialmente, foram coletadas amostras de queijo de cada uma das 5 unidades produtoras da região de Araxá. Os queijos foram encaminhados para o laboratório de análises físico-químicas e microbiológicas do Instituto de Laticínios Cândido Tostes onde foram realizadas análises físico-químicas (descritas no item 4.1.3) e contagens de *S. aureus* (descritas no item 4.1.4) ao longo de 60 dias de maturação. Durante esse período, os queijos ficaram em câmara especial de maturação, à temperatura ambiente, simulando a fabricação artesanal de seu local de origem.

3.1.3. Análises físico-químicas dos queijos

O preparo das amostras foi realizado segundo Brasil (2006). As análises de composição centesimal dos queijos foram realizadas nos tempos 3, 7, 14, 30 e 60 dias de maturação. As análises dos queijos foram realizadas segundo as metodologias:

- 1) pH, teores percentuais de umidade e sólidos totais (m/m), gordura (m/m), cloreto de sódio (m/m) e resíduo mineral fixo (m/m) dos queijos foram realizadas de acordo com os métodos descritos na Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).
- 2) Teores percentuais (m/m) 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 (2001), para se calcular:
 - teor percentual (m/m) de proteína: com base no teor de nitrogênio total. O fator utilizado foi 6,38;
 - índice de extensão de proteólise (relação % de NS pH 4,6 / NT);
 - índice de profundidade de proteólise (relação % de NS TCA 12 % / NT).
- 3) Teor de GES ou percentual de gordura no extrato seco (relação % de teor de gordura / EST).

- 4) A a_a foi realizada utilizando-se medidor digital Aqualab modelo CX2T – Decagon Devices, Inc., Washington, USA, utilizando-se amostras coletadas em toda extensão dos queijos e conforme instruções do fabricante do equipamento.

3.1.4. Análises microbiológicas dos queijos

3.1.4.1. Preparo das amostras

As amostras de queijo foram pesadas assepticamente em porções de 25 gramas cada, transferidas para um copo de liquidificador estéril em que foram adicionadas 225 mL de água peptonada 0,1% também estéril, obtendo-se a primeira diluição 1:10. Após homogeneização no liquidificador, foram feitas as diluições subsequentes e posterior plaqueamento.

3.1.4.2. Análises de *S. aureus*

As análises de *S. aureus* foram feitas utilizando-se Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) Count Plate (AOAC 981.15) nos tempos 3, 7, 14 e 30 e 60 dias de maturação. A detecção é baseada na reação de nuclease termoestável (termonuclease) sendo que a placa é constituída do meio Baird-Parker modificado (sem telurito), goma guar, barreira de espuma e o disco reativo composto de DNA, azul de O-toluidina e indicadores TTC (cloreto de trifeniltetrazólio).

3.1.4.3. Obtenção das culturas puras de *S. aureus*

As estirpes bacterianas de *S.aureus* foram isoladas dos queijos das cinco propriedades selecionadas na região de Araxá. A seleção das estirpes oriundas dos queijos foi realizada de forma a contemplar 5 isolados por produtor, durante os tempos 3, 7, 14, 30 e 60 dias de maturação.

Para manter as culturas ativas, as estirpes selecionadas foram transferidas para tubos contendo 3,0 mL de caldo infusão de cérebro e coração (caldo BHI), sendo incubadas por 24 h a 37 °C. Após essa recuperação, as bactérias foram isoladas

em ágar infusão de cérebro e coração (ágar BHI), utilizando-se a técnica de semeadura em estrias por esgotamento, de modo a garantir a obtenção de colônias puras. Quando necessário, as bactérias foram reinoculadas e reincubadas às mesmas condições descritas acima. Após o isolamento, foi realizada uma confirmação das culturas por meio de plaqueamento em Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) Count Plate (AOAC 981.15), provas morfológicas e bioquímicas (coloração de Gram e catalase) e plaqueamento em meio Baird-Parker suplementado com acriflavina (7µg/mL). As culturas com resultado positivo em todas estas análises de confirmação foram mantidas congeladas a -80°C em meio BHI adicionado de 20% de glicerol.

3.1.4.4. Curva de crescimento

Todas as estirpes de *S. aureus* isoladas foram transferidas para o mesmo caldo BHI (*pool* de bactérias) e foram incubadas por 24h a 37°C.

Para construção da curva de crescimento foi colocado 2% do *pool* de bactérias em caldo BHI. Foram feitos plaqueamentos de 2 em 2 horas, durante um período de 24 horas para a elaboração da curva. As contagens foram feitas utilizando-se Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) Count Plate (AOAC 981.15).

3.1.5. Análises de PCR

Foram realizadas análises de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) das estirpes de *S. aureus* selecionadas dos queijos Minas artesanal de Araxá para a confirmação do potencial de produção de enterotoxinas e dos possíveis tipos de enterotoxinas produzidas. Para isso, as estirpes isoladas foram avaliadas quanto à presença do gene *femA*, e dos genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) com a finalidade de caracterizar as estirpes que posteriormente seriam utilizadas na segunda fase do projeto, ou seja, no teste *in vitro*.

As culturas congeladas foram repicadas e ativadas em caldo BHI a 37°C por 24h. Foi realizada extração de DNA por meio de kit específico Wizard® Genmic DNA Purification Kit - Promega® seguindo as instruções do fabricante e, em seguida, as reações de PCR foram realizadas em termociclador (Power Vision II ®

Interativo, SMS). A descrição dos *primers* para detecção dos genes que codificam enterotoxinas *estafilococicas* estão apresentados na Tabela 4.

Todas as análises de PCR foram realizadas acompanhadas de controles positivo e negativo. Como controles positivos para as reações foram utilizadas 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) (Tabela 4).

Tabela 4. *Primers* para detecção dos genes que codificam enterotoxinas em *S. aureus*.

Gene	Primer	Seqüência de oligonucleotídeos (5' - 3')	Produto (pb)	Tm	Referência
<i>sea</i>	SEA1	ACG ATC AAT TTT TAC AGC	544	46,9°C	Rosec e Gigoud (2002)
	SEA2	TGC ATG TTT TCA GAG TTA ATC		52°C	
<i>seb</i>	SEB1	GAA TGA TAT TAA TTC GCA TC	416	49,1°C	Rosec e Gigoud (2002)
	SEB2	TCT TTG TCG TAA GAT AAA CTT C		52,8°C	
<i>sec</i>	SEC1	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	257	49,1°C	Rosec e Gigoud (2002)
	SEC2	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CCA		50,1°C	
<i>sed</i>	SED1	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	317	54,2°C	Johnson et al. (1991)
	SED2	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG		50,2°C	
<i>see</i>	SEE1	ATA GAT AAA GTT AAA ACA AGC AA	170	50°C	Johnson et al. (1991)
	SEE2	TAA CTT ACC GTG GAC CC		52,8°C	
<i>femA</i>	FEMA1	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG	132	51,1°C	Mehrotra et al. (2000)
	FEMA2	GAT AAA GAA GAAACC AGC AG		53,2°C	

As reações de PCR foram conduzidas conforme já estabelecido no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa, MG, com combinações de dois pares de *primers* por reação, ou seja, o *primer* referente à identificação da enterotoxina, acompanhado do *femA*.

As condições de amplificação estabelecidas para todas as reações estão apresentadas na Tabela 5. A amplificação do DNA foi realizada com o seguinte perfil térmico: desnaturação inicial do DNA e ativação da polimerase a 95°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificação (95°C durante 45 segundos, 46,2°C

durante 45 segundos e 72°C durante 45 segundos), terminando com uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Tabela 5. Condições de amplificação estabelecidas para todas as reações de PCR.

Número de Ciclos	Temperatura	Tempo	Etapa
1	95°C	5 minutos	Desnaturação
	95°C	45 segundos	Desnaturação
35	46,2°C	45 segundos	Anelamento
	72°C	45 segundos	Extensão
1	72°C	10 minutos	Extensão final
----	4°C	----	Resfriamento

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose (1,0%, p/v) corado com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v) submetidos por eletroforese em aparelho Eletrophoresis Power Supply, Loccus biotecnologia®. O registro das imagens foi feito em transiluminador (L-PIX, Loccus Biotecnologia®) ligado a um notebook.

3.2. 2ª Etapa - Efeito antagônico *in vitro* da adição de nisina sobre o desenvolvimento de *S. aureus*

Os testes para nisina foram feitos utilizando o preparado comercial contendo Nisina (Chrisin® 2,5 % m/m), da empresa Christian Hansen (Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda. – Valinhos-SP - Brasil). A nisina foi adicionada diretamente ao leite desnatado reconstituído, até as concentrações desejadas, como indica Pinto et al. (2011).

Foram adicionadas quantidades de nisina separadamente em frascos de vidro com tampas rosqueáveis contendo 100 mL de LDR (leite desnatado reconstituído) 12% nas concentrações de 100, 200, 400 e 500 IU.mL⁻¹ de nisina. Os frascos contendo água para reconstituição do leite foram previamente autoclavados. Após adição do leite desnatado, os frascos foram tratados com vapor fluente por 100°C/20 minutos e somente após o resfriamento foi adicionado a nisina. As amostras foram homogeneizadas e transferidas em porções de 5 mL para tubos com tampas rosqueáveis estéreis. Imediatamente após adição da nisina, foram inoculadas com 2% do *pool* de bactérias, em duplicata, quantidades de cultura de *S. aureus* para que a concentração atingisse, aproximadamente, 10⁵ UFC.mL⁻¹. Após adição de nisina e do

pool, as amostras provenientes de todos os tratamentos foram plaqueadas nos tempos 0, 3, 5, 8, 10, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação. Os controles foram feitos sem a presença de nisina. As análises foram feitas utilizando-se Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) *Count Plate* (AOAC 981.15).

3.3. 3ª Etapa - Efeito antagônico *in loco* da adição de nisina ao processo de fabricação do queijo minas artesanal sobre o desenvolvimento de *S. aureus*

De acordo com os resultados obtidos na segunda etapa do projeto (pesquisa *in vitro*) foram escolhidas duas concentrações de nisina para continuidade dos experimentos, além do controle. A nisina foi adicionada diretamente ao leite durante o processo de fabricação do queijo Minas artesanal (Figura 5), em três unidades produtoras, em quantidade necessária para que atingisse as concentrações escolhidas. Durante a fabricação, foram retiradas amostras de leite e massa para análises de estafilococos e bactérias lácticas, que foram realizadas no Laticínios Dona Beija. Os queijos foram encaminhados ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes, onde foram analisados e maturados à temperatura ambiente por 60 dias.

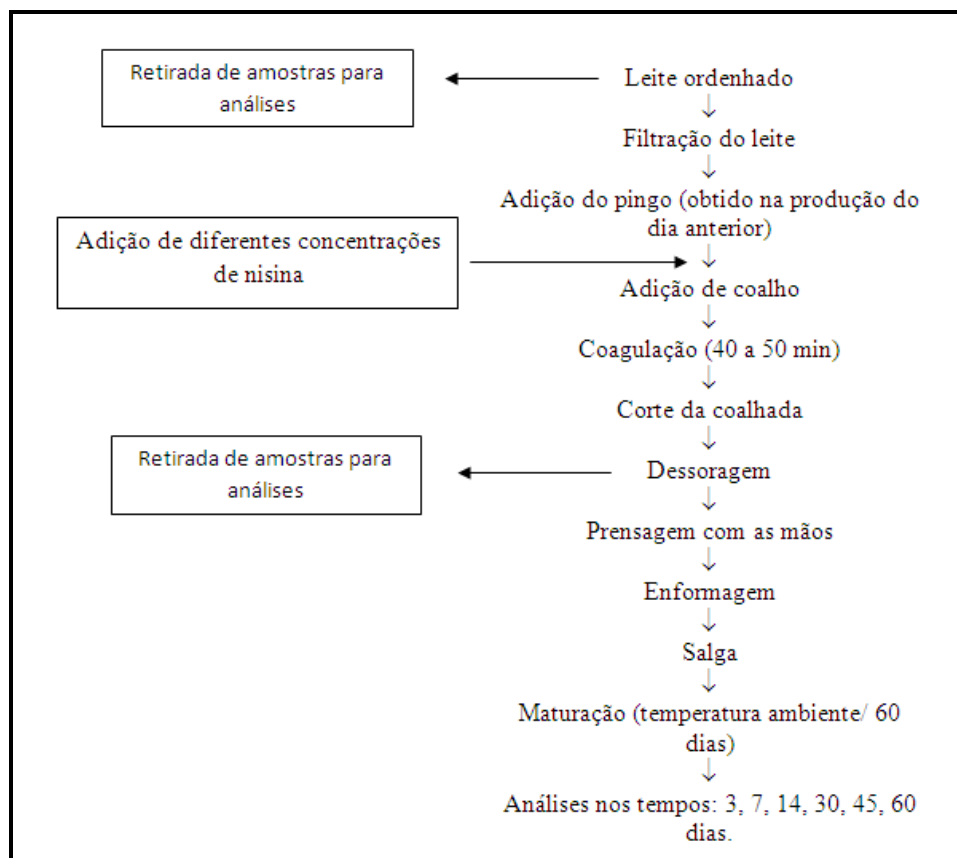


Figura 5 – Fluxograma de fabricação de Queijo Minas Artesanal de Araxá com adição de nisina.

3.3.1. Análises físico-químicas dos queijos

As análises de composição centesimal dos queijos da 3ª etapa foram realizadas nos tempos 3, 7, 14, 30, 45 e 60 dias de maturação. Os queijos foram maturados à temperatura ambiente, conforme utilizado na fabricação artesanal. As análises dos queijos foram realizadas segundo as metodologias descritas no item 3.1.3.

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

Foram realizadas análises de *Staphylococcus aureus* e bactérias lácticas do leite utilizado na fabricação dos queijos, bem como da massa, obtida após coagulação do leite pelo coalho e pelo fermento. As análises de *Staphylococcus aureus* foram realizadas utilizando-se Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) Count Plate (AOAC 981.15).

Nos queijos foram feitas análises de *S. aureus*, além de contagem de bactérias lácticas, aeróbios mesófilos, Coliformes Totais e *E. coli*. As análises microbiológicas dos queijos foram realizadas nos tempos 3, 7, 14, 30, 45 e 60 dias após a fabricação.

Para análises de *S. aureus*, aeróbios mesófilos, Coliformes Totais e *E. coli* foram utilizados, respectivamente, Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) Count Plate (AOAC 981.15), Petrifilm 3M – Aerobic (AC) Count Plates e Petrifilm 3M – *E.coli*/Coliformes (EC) Count Plate (AOAC 991.14) de acordo com os procedimentos determinados pelo fabricante. A contagem de bactérias lácticas (*Lactococcus* e *Lactobacillus*) nos queijos foi feita utilizando-se a metodologia descrita por Silva et al. (2010).

3.3.3. Análises de PCR

Análises idênticas ao item 3.1.5, descritas na primeira etapa do projeto.

3.3.4. Análise de enterotoxinas estafilocócicas

Foram realizadas análises de enterotoxinas estafilocócicas em amostras de queijo Minas artesanal de Araxá, utilizando o teste qualitativo imunoenzimático Vidas Staph enterotoxin II®. As pesquisas foram realizadas por meio da técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) em imunoanalisador Mini-Vidas®. O protocolo de extração foi seguido por meio de concentração pelo ácido tricloroacético, seguindo recomendação dadas pelo fabricante. Este protocolo é recomendado para aumentar as concentrações de toxinas para produtos lácteos e eliminar as interferências raras encontradas em alguns queijos de leite cru.

3.3.5. Perfil de textura instrumental

O perfil de textura das amostras foi determinado utilizando-se um Instron Universal Testing Machine, modelo 3367 (Instron Ltd., Norwood, Massachusetts, EUA). As condições de trabalho foram: pré-teste, teste e pós-teste nas velocidades de um mm/s, com distância de compressão de 40 % da parte superior da amostra. Uma

sonda cilíndrica de 55 mm foi usada juntamente com uma célula de carga de 1 KN, movida perpendicularmente através das amostras de queijos quadradas (25 mm de lado) que foram colhidas aleatoriamente do queijo inteiro. As resistências exercidas pelas amostras foram automaticamente registradas e a firmeza, fraturabilidade, gomosidade e mastigabilidade em Newton (N), elasticidade (mm) e coesividade foram o calculadas pelo software Blue Hill 2.0 (Instron - Norwood, Massachusetts, EUA), utilizando dados de força (N) x tempo (s) obtidos durante os ensaios. As análises do perfil de textura instrumental foram feitas nos tempos 3, 7, 14, 30, 45 e 60 dias de maturação.

3.3.6. Avaliação da Cor

Para a avaliação instrumental da cor foi utilizado um colorímetro da marca Hunterlab, modelo Color Quest II. A escala de cor utilizada foi CIE Lab ($L^*a^*b^*$), com iluminante D_{65} (6900°K), com abertura de 10°. O valor de L^* representa a luminosidade da amostra, variando de preto (0) a branco (100); o valor de a^* representa a cor, variando de vermelho (+) a verde (-); e o valor de b^* representa a cor, variando de amarelo (+) a azul (-). O aparelho foi calibrado no modo de reflectância especular excluída usando placas de referência branca (C6299 Hunterlab Color Standard) e cinza (C6299G Hunterlab Color Standard). Para a leitura, foi utilizada uma cubeta de quartzo de 10 mm. As análises de cor foram feitas nos tempos 3, 7, 14, 30, 45 e 60 dias de maturação.

3.4. Delineamento estatístico

O experimento foi conduzido em três repetições, formado por cada produtor de queijo, em delineamento em esquema fatorial, sendo os tempos de maturação e as concentrações de nisina os fatores estudados. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa MINITAB – versão 14 (*STATISTICAL SOFTWARE. MINITAB INC., 2003*). Os resultados foram 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.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados da 1ª etapa

4.1.1. Características físico-químicas do queijo Minas artesanal coletado nas propriedades selecionadas na região de Araxá

Os queijos foram coletados em março de 2011, em cinco propriedades diferentes na região de Araxá. Todas as queijarias escolhidas eram cadastradas pelo IMA, no programa Queijo Minas artesanal. A maturação foi realizada em câmara especial para maturação de queijos artesanais, no Instituto de Laticínios Cândido Tostes – Juiz de Fora - MG, em condições que simulam a maturação de origem, ou seja, em prateleiras de madeira e temperatura ambiente, porém sem controle de umidade. Os resultados médios referentes à composição físico-química dos queijos ao longo de 60 dias de maturação estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados médios e desvio padrão das análises físico-químicas do queijo Minas artesanal produzido nas 5 propriedades selecionadas na região de Araxá-MG.

Tempo de maturação	Umidade (% m/m)	RMF (% m/m)	GES	Cloretos (% m/m)
3 dias	49,77 ± 3,27	3,65 ± 0,59	49,37 ± 9,16	2,15 ± 0,71
7 dias	38,12 ± 1,48	4,70 ± 0,39	48,42 ± 4,92	1,96 ± 0,37
14 dias	31,11 ± 2,42	5,08 ± 0,35	45,64 ± 3,49	2,20 ± 0,30
30 dias	27,88 ± 5,00	5,01 ± 0,53	48,28 ± 5,04	1,97 ± 0,43
60 dias	20,10 ± 5,43	5,55 ± 0,77	55,81 ± 6,59	2,30 ± 0,56

*DP = desvio padrão

A Tabela 6 demonstra que os queijos não são padronizados e existe grande variação destes ao longo do período de maturação, o que pode ser comprovado pelos altos valores de desvio padrão descritos.

Houve grande variação na umidade dos queijos, principalmente entre os dias 30 e 60 de maturação. O teor médio de umidade do queijo Minas artesanal de Araxá com 7 dias de maturação foi de 38,12% (Tabela 6), o que permite classificá-lo como

sendo de média umidade (BRASIL, 1996). Este valor de umidade atende a Lei 14.185, modificada pela Lei 44.864, que exige até 45,9% de umidade para comercialização de queijos artesanais (MINAS GERAIS, 2008).

Martins et al. (2004a) encontraram valor de umidade médio de 45,05% para queijo Minas artesanal de Araxá com 8 dias de maturação, demonstrando que houve mudanças na umidade dos queijos de 2004 até os dias atuais. Não existe nenhuma lei que determina o período de maturação mínima dos queijos artesanais de cada região, esse período é regulado por meio da umidade do queijo, sendo necessário maturar o queijo até que o mesmo atinja valores até 45,9% de umidade que possam ser comercializados (MINAS GERAIS, 2008).

Com o decorrer da maturação, o queijo artesanal, por não ser embalado em película plástica impermeáveis, tem seu teor de umidade diminuído pela perda de água e, por conseguinte, os demais componentes do extrato seco aumentam.

O teor médio de gordura no extrato seco (GES) dos queijos artesanais de Araxá foi de 48,5%, o que o faz ser classificado como gordo pela portaria 146 (BRASIL, 1996). Valores de 51,5% de GES foram encontrados em queijos Minas artesanais da região de Araxá por Martins et al. (2004a) demonstrando resultados semelhantes ao deste estudo, sendo também classificados como gordo pela legislação vigente (BRASIL, 1996).

O teor de cloretos variou de 1,3% a 3,26% demonstrando a falta de padronização do processo de salga dos queijos e a variação de queijo para queijo. O teor de RMF aumentou com o decorrer da maturação, devido à perda de água por evaporação e concentração do extrato seco total do queijo.

4.1.2. Evolução da maturação dos queijos artesanais coletados na região de Araxá

Os valores médios dos índices de proteólise do queijo, assim como do pH e atividade de água estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7. Valores médios e desvio-padrão da extensão (%NS_{pH 4,6}/NT) de maturação, profundidade (%NS_{TCA 12%}/NT) de maturação, pH e atividade de água (Aa) do queijo Minas artesanal produzido nas propriedades selecionadas na região de Araxá

Tempo de maturação (dias)	pH	Aa	Extensão (%NS _{pH 4,6} /NT)	Profundidade (%NS _{TCA 12%} /NT)
3	5,07 ± 0,28	0,97 ± 0,006	8,54 ± 2,36	5,09 ± 1,68
7	4,95 ± 0,10	0,92 ± 0,041	11,12 ± 2,14	8,24 ± 2,28
14	4,90 ± 0,17	0,91 ± 0,025	13,19 ± 3,51	9,67 ± 2,70
30	5,15 ± 0,09	0,92 ± 0,017	18,57 ± 3,48	11,91 ± 2,88
60	5,00 ± 0,38	0,85 ± 0,050	21,19 ± 9,82	15,06 ± 8,11

*DP = desvio padrão.

Nota-se (Tabela 7) que nos primeiros dias de maturação ocorre redução do pH dos queijos, pois há produção de ácido láctico produzido pelas bactérias lácticas a partir da lactose (BERESFORD et al., 2001). A atividade de água do queijo reduziu com o decorrer da maturação (Tabela 7). Neste caso o que mais contribui para redução da atividade de água é perda de água do queijo para o ambiente, visto que este não foi embalado durante o período de maturação.

Houve um aumento gradual para os resultados médios dos teores de % NS_{pH 4,6}/NT e de % NS_{TCA 12%}/NT durante os 60 dias de maturação, conforme esperado (Tabela 7). A proteólise ocorre em vários estágios na degradação da proteína e dos peptídeos pela ação das enzimas do leite, do coagulante residual, das bactérias do fermento láctico, das bactérias não originadas do fermento (NSLAB) (FOX et al., 2004), por isso uma evolução dos índices de proteólise com o tempo é esperado. De acordo com a literatura, com o decorrer da maturação, ocorrem mudanças na textura do queijo apresenta-se mais macia como consequência da hidrólise da matriz de caseína, mudanças na capacidade de ligação de água e mudanças no pH (FOX et al., 2004).

4.1.3. Contagem de *S. aureus* e identificação de genes que codificam enterotoxinas clássicas

Os queijos coletados nas cinco propriedades escolhidas foram analisados ao longo do período de maturação de 60 dias quanto à contagem de *S. aureus*. A Tabela 8 apresenta média da contagem, limite superior, limite inferior, desvio padrão e

coeficiente de variação para análise de *S. aureus* nos queijos Minas artesanais das propriedades selecionadas na região de Araxá.

Tabela 8. Média da contagem de *S. aureus* nas 5 queijarias artesanais de Araxá selecionadas

Tempo de maturação	Média do Log UFC.g ⁻¹ <i>S. aureus</i>	LS ¹	LI ²	DP ³	CV ⁴ (%)
3 dias	5,14	6,56	4,3	0,93	18,07
7 dias	4,36	6	3,3	0,99	22,68
14 dias	3,09	5,3	3	1,93	26,62
30 dias	0,4	2,3	<1	1,03	223,61
60 dias	<1	<1	<1	0	0

LS¹ = limite superior; LI² = limite inferior; DP³ = desvio padrão; CV⁴ = coeficiente de variação

O alto valor encontrado no coeficiente de variação das contagens ao longo do tempo demonstra que não existe padrão microbiológico dos queijos fabricados na região de Araxá. O elevado índice de *S. aureus* pode estar associado à mastite bovina, obtenção inadequada do leite e hábitos higiênicos insatisfatórios, principalmente na manipulação dos queijos durante o processo de fabricação (ARAÚJO et al., 2004). Apesar de o queijo atingir a umidade exigida pela legislação com apenas 7 dias, verifica-se que neste período, a média da contagem (Tabela 8) permanece superior à exigida por Lei que é menor que 3,7 Log UFC.g⁻¹ (MINAS GERAIS, 2008).

Araújo et al. (2004) analisaram 37 amostras de queijo artesanal de Araxá para *S. aureus* e em 89,2% das amostras foram encontradas contagens superiores a 10³ UFC.g⁻¹, valor máximo exigido pelo Decreto 44.864, 2008) e em 21,62% dos queijos foram encontradas contagens superiores a 10⁵, contagem em que já existe a possibilidade de produção de enterotoxinas por este micro-organismo.

A Figura 6 demonstra o comportamento da multiplicação de *S. aureus*. Notou-se a grande variação encontrada nas contagens de uma propriedade para outra, embora todas as propriedades selecionadas estejam cadastradas no programa Queijo Minas Artesanal.

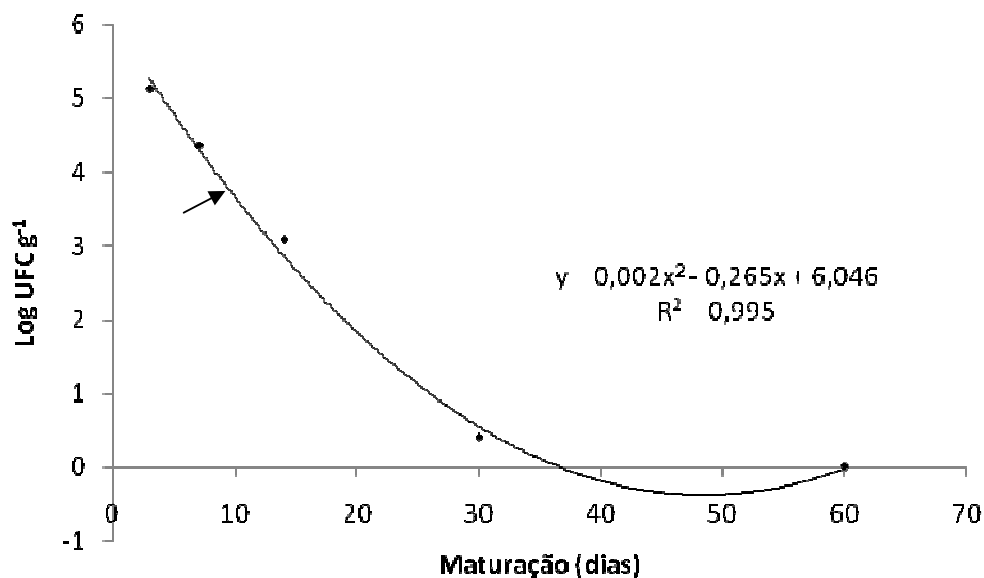


Figura 6. Comportamento da média das contagens de *S. aureus* nos queijos artesanais das 5 propriedades selecionadas na região de Araxá ao longo de 60 dias de maturação. A seta indica limite máximo permitido pela legislação (MINAS GERAIS 2008).

Pela análise de detecção do gene *femA* (Tabela 9), verificou-se que todos os isolados avaliados caracterizavam-se como *S. aureus*, tendo em vista que a presença do gene *femA* é específica para este micro-organismo (MEHROTRA et al., 2000).

A presença do gene é reconhecida pelo número de pares de bases (pb) que compõem o gene, sendo que 125 pb é característico para o gene *femA* (MEHROTRA et al., 2000).

Na detecção de genes que codificam enterotoxinas, das 12 amostras isoladas em queijos artesanais da primeira etapa do trabalho, em 5 propriedades diferentes (A, B, C, D, E) todas foram positivas para *femA*, 11 foram positivas para *sea*, 1 foi positiva para *seb*, 5 foram positivas para *sec*, 7 para *see* e nenhuma para *sed* (Tabela 9).

Tabela 9. Perfis dos genótipos encontrados para *S. aureus*, isolados dos queijos artesanais das 5 propriedades selecionadas (A, B, C, D e E).

Código/ propriedade	<i>femA</i> *	<i>sea</i> *	<i>seb</i> *	<i>sec</i> *	<i>sed</i> *	<i>see</i> *
1 / A	+	-	+	+	-	+
2 / A	+	+	-	-	-	+
3 / A	+	+	-	-	-	+
4 / B	+	+	-	-	-	+
5 / B	+	+	-	-	-	+
6 / B	+	+	-	-	-	-
7 / C	+	+	-	+	-	-
8 / C	+	+	-	-	-	-
9 / C	+	+	-	+	-	+
10 / D	+	+	-	-	-	-
11 / D	+	+	-	+	-	+
12 / E	+	+	-	+	-	-

* - não detectado; + detectado.

De acordo com o exposto na Tabela 9, pôde-se verificar que dentre os genes encontrados houve prevalência para o *sea* (91,97% dos isolados) e todas as estirpes isoladas possuíam algum gene que codificava para alguma das enterotoxinas clássicas. Os *S. aureus* enterotoxigênicos que são portadores dos genes *sea* e *seb* estão associados a humanos (FREITAS et al., 2009; BERGDOLL et al., 1990), portanto a origem mais provável dos isolados desta primeira etapa podem ser dos manipuladores dos queijos.

4.2. Resultados da 2ª etapa - Efeito *in vitro* da adição de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* em LDR 12%

O efeito de diferentes concentrações de nisina, adicionada ao LDR 12% sobre *S. aureus* está apresentado na Figura 7. Pode-se observar que as curvas de crescimento de *S. aureus* referentes a todas as doses utilizadas apresentaram efeito bactericida em relação a curva de crescimento da dose controle.

Estes resultados diferem dos apresentados por (PINTO et al., 2011) já que somente as doses de 400 e 500 UI.mL⁻¹ apresentaram efeito bactericida. Comparando-se os resultados dos dois trabalhos, é notória a evidência de que a nisina exerceu efeito em populações de *S. aureus*, embora haja diferenças entre o

efeito e as diferentes populações deste micro-organismo já que no presente trabalho foram utilizadas estirpes isoladas dos próprios queijos.

Utilizando-se as estirpes isoladas, observou-se que até mesmo as menores concentrações de nisina exerceram efeito bactericida nas primeiras 10 horas de incubação, sendo que as duas maiores doses (400 e 500 UI.mL⁻¹) ocasionaram maior inibição.

Pode ser observado também (Figura 7) que todas as doses de nisina resultaram em menor número máximo da população de *S. aureus*. Sabendo-se que a concentração máxima de *S. aureus* num queijo é determinada em parte pelo tamanho da concentração inicial, pode-se inferir que queijos elaborados com leite de melhor qualidade microbiológica, ainda que fresco, pode alcançar números próximos daqueles preconizados pela legislação vigente.

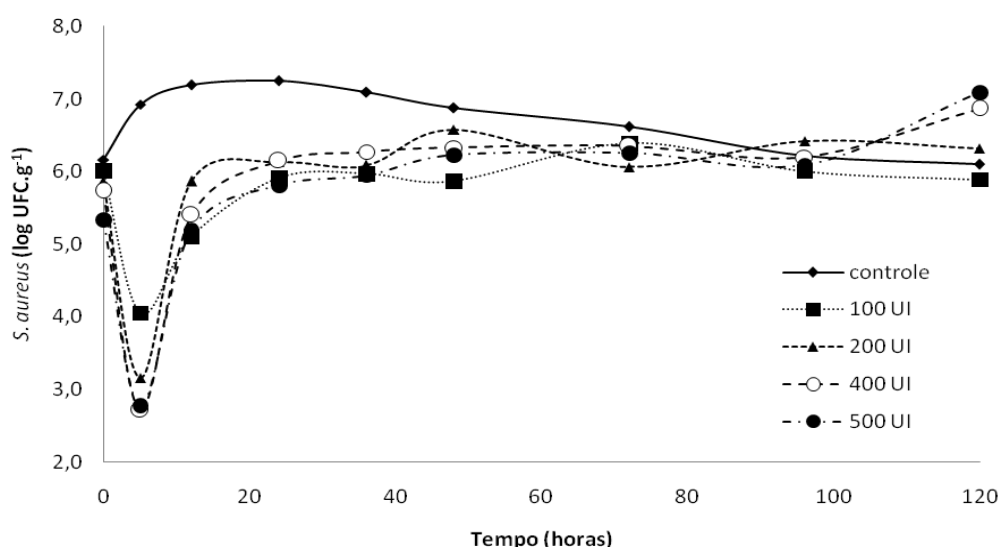


Figura 7. Efeito de diferentes doses de nisina em LDR 12 % sobre *S. aureus*.

Observou-se redução de aproximadamente 4 ciclos Log nas doses de 200, 400 e 500 UI.mL⁻¹ em relação ao controle e 3 ciclos Log nas doses de 100 UI.mL⁻¹ nas primeiras horas de incubação. Foi observado também, um efeito bactericida sobre *S. aureus* quando utilizadas as doses de 100, 200, 400 e 500 UI.mL⁻¹ nas primeiras 20 horas de incubação. A duração da fase estacionária de *S. aureus* no controle, 100UI e 200UI ocorreu entre 12h e 36h após a incubação. A fase estacionária observada na

presença de 400 IU. mL⁻¹ ocorreu entre 24 e 96h, enquanto para a dose de 500 IU.mL⁻¹ ocorreu entre 48h e 96h.

Não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre as doses de 200 UI, 400 UI, 500 IU.mL⁻¹ ao longo da incubação e ao mesmo tempo estas doses demonstraram maior efeito bactericida em relação a concentração de 100 IU.mL⁻¹ e controle ($P < 0,05$). O efeito bactericida da dose de 100 IU.mL⁻¹ foi diferente da dose controle ($P < 0,05$).

Apesar das doses de 200 UI, 400 UI, 500 UI.mL⁻¹ possuírem efeitos similares em LDR 12%, foi escolhida a dose de 400 UI.mL⁻¹ para ser utilizada no teste *in loco*. O queijo é uma matriz alimentar diferente do leite e seus constituintes, como a gordura, podem interferir diminuindo o efeito bactericida da nisina (CHOLLET et al., 2008), por isso a concentração de 200 UI.mL⁻¹ não foi escolhida por precaução.

A concentração de 500 UI.mL⁻¹ foi descartada baseada na possível inibição da bactérias lácticas pelo excesso de nisina e conseqüentemente podendo interferir na maturação do queijo, visto que as doses de 400 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ provavelmente possuem o mesmo efeito na redução da contagem de *S aureus* de acordo com o teste *in vitro*.

4.3. Resultados da 3ª etapa

4.3.1. Efeito *in loco* da nisina sobre a composição centesimal do queijo Minas Artesanal da região de Araxá

O resultado completo das análises físico-químicas dos queijos Minas artesanais da região de Araxá com diferentes concentrações de nisina ao longo dos 60 dias de maturação está apresentado na Tabela 10.

Tabela 10. Composição centesimal média (%m/m), pH e atividade de água (a_w) dos queijos com diferentes concentrações de nisina, nos diferentes tempos de maturação.

Maturação (dias)	Nisina (IU.mL ⁻¹)	pH	Aa	Cloretos (% m/m)	Umidade (% m/m)	GES	Gordura (% m/m)	Proteína total (% m/m)
3	0	5,06	0,97	1,79	56,74	47,66	20,60	16,13
	100	5,33	0,98	1,58	56,71	46,52	20,10	17,50
	400	5,99	0,98	1,74	58,48	47,75	19,83	15,80
7	0	4,92	0,97	1,99	50,13	50,25	25,10	18,52
	100	5,00	0,97	1,78	52,40	47,34	22,60	18,63
	400	5,57	0,97	1,87	53,22	43,43	20,33	19,17
14	0	4,88	0,98	2,11	48,14	58,04	30,10	19,36
	100	5,11	0,97	2,00	46,83	52,47	27,93	21,17
	400	5,39	0,97	1,95	47,90	51,05	26,60	21,59
30	0	5,09	0,96	2,27	42,88	57,70	32,93	21,54
	100	5,17	0,96	2,20	42,27	51,92	30,00	22,58
	400	5,68	0,97	2,21	44,00	53,06	29,67	22,16
45	0	5,11	0,93	2,64	31,83	52,69	35,93	25,85
	100	5,07	0,94	2,46	37,53	51,23	32,00	24,96
	400	5,45	0,94	2,47	34,18	47,37	31,17	26,76
60	0	5,19	0,91	2,48	29,29	53,76	38,00	27,32
	100	5,22	0,92	2,70	32,56	49,68	33,50	27,54
	400	5,41	0,90	2,55	30,39	51,78	36,00	27,39

Os valores de pH, atividade de água (a_w) e RMF apresentaram uma curva não-normal de distribuição, de acordo com o teste Ryan-Joiner, portanto, para estes resultados, adotou-se a estatística não paramétrica por meio do teste de Kruskal-Wallis e o teste de Tukey para comparação entre as médias (nível de 5% de significância).

A normalidade dos valores de cloretos, umidade, gordura, GES e proteína total desde estudo não foi rejeitada ao nível de 5% de significância, portanto, para estes resultados, adotou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparação entre as médias.

Os resultados apresentados na Tabela 10 serão discutidos separadamente nos itens subsequentes.

4.3.1.1. Teor de resíduo mineral fixo (cinzas)

A análise do teor de resíduo mineral fixo foi realizada apenas no terceiro dia de maturação e não ao longo dos 60 dias, pois o teor de cinzas do queijo não varia com o tempo, apenas muda de proporção de acordo com o aumento do extrato seco total.

As diferentes concentrações de nisina (0, 100 e 400 UI.mL⁻¹) não influenciaram significativamente ($P \geq 0,05$) o teor de RMF dos queijos (Tabela 11).

Tabela 11. Valores médios de cinzas para os queijos com diferentes concentrações de nisina.

Nisina (IU.mL ⁻¹)	Cinzas (%)
0	3,74 ^a
100	3,63 ^a
400	3,96 ^a

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey.

Os teores de RMF deste estudo variaram de 3,36% a 4,02% nos queijos. De acordo com Costa Junior et al. (2009a), em um estudo realizado em queijos artesanais da Serra da Canastra, ao longo das quatro estações do ano, foi observado que os teores de RMF variaram de 3,6% a 4,2%. Machado et al. (2004) encontraram valores de cinzas entre 3,19% e 4,36% em queijo Minas artesanal da região do Serro.

A porcentagem de sais e RMF no leite varia de acordo com os fatores como alimentação animal, estações do ano, estágios de lactação e doenças como a mastite. O conteúdo de sais é maior no início da lactação (colostró), em seguida diminui e depois volta a aumentar no final da lactação (SILVA, 2004).

4.3.1.2. pH durante a maturação

Houve efeito significativo das concentrações de nisina em relação ao pH dos queijos ($P < 0,05$), mas não houve efeito nos tempos de maturação que variaram de 3 a 60 dias ($P \geq 0,05$). O pH dos queijos artesanais com diferentes concentrações de nisina estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores médios de pH em todos os tempos para os queijos com diferentes concentrações de nisina*.

Nisina (IU.mL ⁻¹)	pH
0	5,04 ^b
100	5,15 ^b
400	5,58 ^a

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey.

A Tabela 12 mostra que a média do pH dos queijos com 400 UI.mL⁻¹ foi mais alta, se comparada aos queijos controle e com concentração de nisina de 100 UI.mL⁻¹. No entanto, o pH médio dos queijos com 100 UI.mL⁻¹ não diferiu significativamente ($P \geq 0,05$) do queijo controle.

As variações de pH em queijos artesanais podem ocorrer em função das doses e da atividade do fermento natural utilizado no processo de fabricação dos queijos (MACHADO et al., 2004). Neste estudo, as doses de fermento natural foram padronizadas para que interferissem o mínimo possível na variação de acidez dos queijos.

Como não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) na população de bactérias lácticas (ver item 4.3.3.5.4) entre os queijos com e sem nisina, não se pode dizer que a nisina inibiu a produção de ácido pela ação das bactérias lácticas. No entanto, diversos trabalhos comprovam a presença de leveduras endógenas em queijos artesanais e sabe-se que estas podem aumentar o pH dos queijos por meio do metabolismo do ácido láctico durante a maturação (LIMA et al. 2009; SÁ et al., 2008; GARDINI et al. 2006). No caso do presente estudo, não é possível afirmar que houve um favorecimento das leveduras endógenas por meio da nisina e conseqüentemente aumento do pH nos queijos com 400 UI.mL⁻¹, pois não foram feitas análises para verificar a presença das mesmas no queijo, mas o mesmo pode ser feito em trabalhos futuros.

Martins et al. (2004a) encontraram pH igual a 4,85 em queijos artesanais de Araxá com 8 dias de fabricação. Silva et al. (2011) encontraram pH 5,14 para queijos artesanais da região da Canastra com 8 dias de maturação no período da seca e 5,36 no período das águas. Costa Júnior et al. (2009a) encontraram pH 5,20 para queijos artesanais da região da Canastra com 2 dias de maturação no período da seca e pH 5,50 no período das águas. Machado et al. (2004) encontrou valor de pH 4,98 para queijos artesanais do Serro com 6 dias de fabricação e Martins et al. (2004c)

encontrou média de pH igual a 4,75 também em queijos artesanais do Serro. Estes estudos comprovam que há uma variação no pH dos queijos artesanais em função da queijaria (pois a dose de fermento não é padronizada), em função da região e da época do ano em que o queijo foi produzido.

Em um estudo realizado por Pinto et al. (2011) foi encontrado diferença significativa dos valores de pH em função do tempo (60 dias) de maturação de queijos artesanais do Serro, mas não em função das concentrações de 0, 100 e 500 IU.mL⁻¹ de nisina, diferindo do presente estudo.

Em estudo conduzido por kykkidou et al. (2007), com aplicação de nisina em queijo Galotyri, um queijo grego macio, também não foi encontrada diferença significativa entre os valores de pH dos queijos fabricados com e sem nisina. No entanto, tratava-se de um queijo fabricado por coagulação ácida e a nisina foi adicionada após o processo de fermentação do queijo, interferindo de forma menos intensa no processo de produção de acidez.

4.3.1.3. Umidade durante a maturação

Os resultados das análises de umidade dos queijos artesanais com diferentes concentrações nisina ao longo dos 60 dias de maturação estão apresentados na Figura 8. Houve efeito significativo das concentrações de nisina, do tempo de maturação e da interação entre estes dois fatores em relação ao teor de umidade dos queijos ($P < 0,05$).

A média dos queijos com e sem nisina mostraram que houve perda progressiva de umidade durante os 60 dias de maturação, sendo que as médias variaram de 58,48% (com 3 dias de maturação) a 29,29% (com 60 dias de maturação) (Tabela 10). A perda de umidade dos queijos ao longo do tempo é esperada, pois os queijos foram maturados sem embalagem, à temperatura ambiente e em uma câmara ventilada, o que ocasionou na perda de água por evaporação. Esta perda depende da umidade de cada queijo, da umidade relativa do ar no interior da câmara, da temperatura de maturação e do tratamento em que foi submetida à casca do queijo (FOX et al., 2004).

A classificação dos queijos artesanais de Araxá ao longo da maturação, de acordo com a portaria nº 146 de 1996 do MAPA (BRASIL, 1996), variou de muito

alta umidade (acima de 55%), em queijos com 3 dias de maturação, a queijos de baixa umidade (até 35,9%), em queijos com 45 e 60 dias de maturação.

A evolução do teor de umidade dos queijos artesanais para os diferentes tratamentos ao longo do tempo está demonstrada na Figura 8.

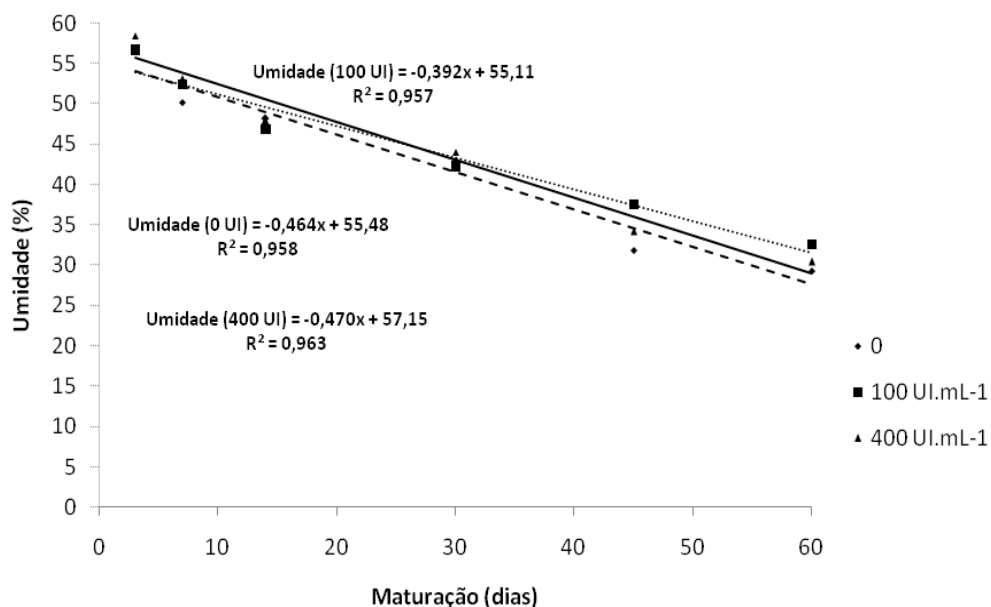


Figura 8. Valores do teor de umidade dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina: (---) 0; (—) 100 UI.mL⁻¹; e (....) 400 UI.mL⁻¹.

De acordo com o decreto 44.864 (MINAS GERAIS, 2008), o queijo Minas artesanal deve possuir umidade máxima de 45,9%, isto significa que o queijo Minas artesanal de Araxá com ou sem nisina só poderia ser comercializado a partir de 30 dias de maturação, conforme mostrado na Figura 8.

4.3.1.4. Teor de cloretos durante a maturação

De acordo com a análise de variância, não houve efeito significativo das concentrações de nisina em relação ao teor de cloretos dos queijos ($P \geq 0,05$), mas houve efeito nos tempos de maturação ($P < 0,05$). Também não houve efeito significativo da interação tempo e tratamento ($P \geq 0,05$). A evolução do teor de cloretos dos queijos artesanais de Araxá com diferentes concentrações de nisina durante o período de maturação pode ser observada na Figura 9.

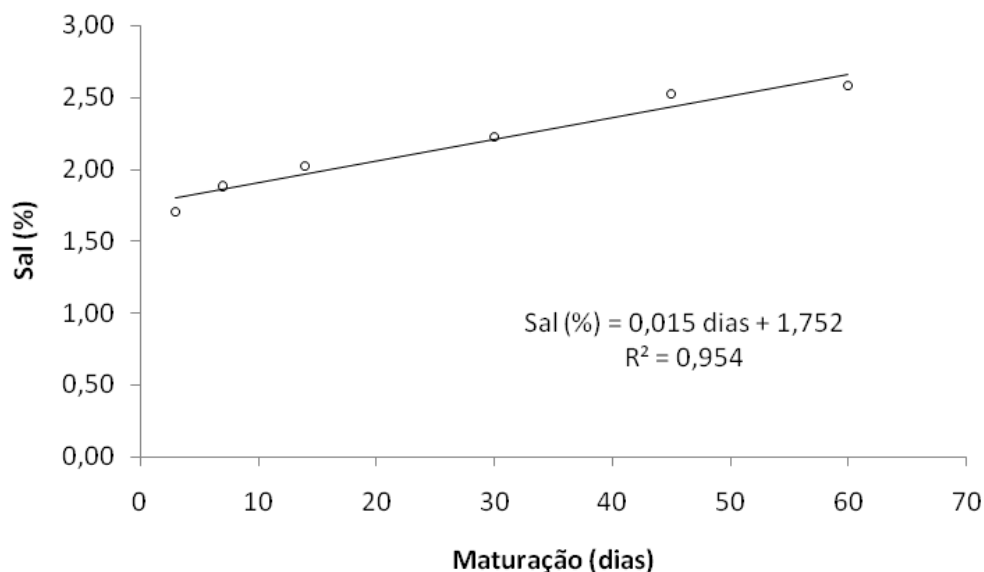


Figura 9. Média do teor de sal (cloretos) dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina.

O teor de cloretos dos queijos aumentou de forma linear com o decorrer da maturação (Figura 9). A tendência do aumento do teor de cloretos com a maturação do queijo ocorre devido à perda de umidade do queijo e aumento da proporção dos constituintes sólidos. No entanto, o teor de cloretos não foi influenciado pelas diferentes concentrações de nisina ($P \geq 0,05$). Este resultado contrasta com o encontrado por Pinto et al. (2011), onde nos queijos com 500 UI.mL^{-1} , foi encontrado maior teor de cloretos se comparados aos queijos controle e com 100 UI.mL^{-1} de nisina.

A adição de sal em queijos possui diversas finalidades, tais como, melhorar sabor, inibir a multiplicação de micro-organismos contaminantes, promover a sinérese da massa e ajudar no teor de umidade final (PAYNE e MORISON, 1999; MORRIS et al., 1985).

Martins et al. (2004a) encontraram média do teor de cloretos de 2,06% em queijos artesanais de Araxá após 8 dias de maturação. Costa Junior et al. (2009a) encontraram uma variação de aproximadamente 55% no teor de cloretos em queijos artesanais da região Canastra, nas diferentes estações do ano. Silva et al. (2011) encontraram 1,64% de cloretos na época das águas e 2,21% na época da seca em queijos artesanais da Canastra com 8 dias de maturação. Machado et al. (2004) encontraram 4,39% de cloretos em queijos artesanais do Serro com 6 dias de

maturação. Martins et al. (2004b) encontraram 1,74% em queijos artesanais do Cerrado com 8 dias de fabricação.

As diferenças nos teores de cloretos encontradas em trabalhos com queijos artesanais podem ser explicadas por dois fatores. O primeiro seria a falta de padronização da quantidade de sal utilizada por cada produtor na fabricação dos queijos artesanais, não existindo um medidor que determine a quantidade de sal utilizada. A salga de queijos artesanais é realizada por meio da salga a seco, que é a adição de sal grosso ou sal refinado na superfície do queijo, e a dosagem utilizada é diferente de queijaria para queijaria. Outro fator que influencia na falta de padronização de sal dos queijos artesanais seria o diferente tempo de salga utilizado por cada produtor e por cada região, contribuindo na variação final (COSTA JUNIOR et al., 2009a; SILVA et al., 2011).

O teor de sal dos queijos pode causar a inibição de micro-organismos. No entanto, no caso do *S. aureus* (micro-organismo foco do presente estudo), este pode tolerar até 20% de sal no seu desenvolvimento e até 10% de sal para produção de enterotoxinas (BORGES et al., 2008), considerado halotolerante.

Em relação ao efeito do sal na atividade da nisina, teores de sal acima de 2% no queijo podem aumentar a eficiência da nisina contra *S. aureus*, principalmente em baixas temperaturas (THOMAS e WIMPENNY, 1996). Chollet et al (2008) também verificaram que um aumento no teor de sal de queijo Emmental aumenta a bioatividade da nisina contra o micro-organismo indicador *Micrococcus luteus*.

4.3.1.5. Atividade de água (a_w) durante a maturação

Não houve efeito significativo das concentrações de nisina em relação à atividade de água (a_w) dos queijos ($P \geq 0,05$), mas houve efeito nos tempos de maturação ($P < 0,05$). A evolução da a_w dos queijos artesanais de Araxá com diferentes concentrações de nisina, durante o período de maturação, pode ser observada na Figura 10.

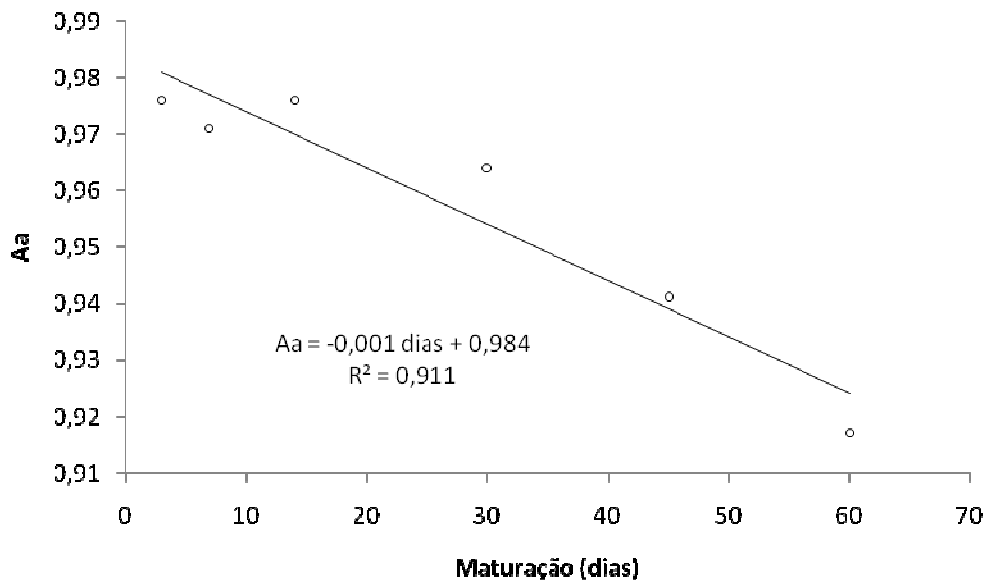


Figura 10. Média da atividade de água (A_a) dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina.

Durante o período de maturação ocorreu redução na atividade de água dos queijos em todos os tratamentos (Figura 10), no entanto não houve influência da nisina nesta redução. Resultados semelhantes foram encontrados por Pinto et al. (2011) em queijo Minas artesanal do Serro com e sem nisina, ou seja, houve diferença na atividade de água dos queijos nos tempos de maturação, mas não em relação ao tratamento. Nesse mesmo estudo (Pinto et al., 2011), foram encontrados valores de atividade de água que variaram de 0,94 a 0,83 durante um período de 7 a 60 dias de maturação.

Os queijos artesanais de Araxá foram maturados a temperatura ambiente e sem embalagem, o que resultou em grande perda de água por evaporação e conseqüentemente reduziu a atividade de água dos mesmos durante os 60 dias de maturação (Figura 10).

Martins et al. (2004a) encontraram 0,97 de atividade de água para queijos artesanais de Araxá com 8 dias de maturação, resultado semelhante ao do presente estudo.

Os valores de atividade de água encontrados nos queijos artesanais de Araxá com e sem nisina ao longo da maturação são favoráveis à multiplicação de patógenos como o micro-organismo foco deste estudo: o *Staphylococcus aureus* (FAVARO et al., 2006; BORELLI et al., 2011), que é capaz de produzir de enterotoxinas em

valores de atividade de água de até 0,83, apesar do ótimo ser 0,99 (BORGES et al., 2008).

A maturação, o teor de umidade e o teor de sal influenciam a atividade de água (a_w) dos queijos de uma maneira geral. Algumas frações de aminoácidos, liberados durante a proteólise a partir de nitrogênio solúvel em TCA 12%, possuem cadeias laterais com grupos polares ou ionizáveis que se integram facilmente a água, abaixando a atividade de água durante o período de maturação do queijo (BERESFORD et al., 2001; SOUSA et al., 2001). O sal diminui a atividade de água devido ao seu baixo peso molecular e sua alta solubilidade e em queijos maturados sem embalagem ou sem qualquer outra película de proteção, existe redução da atividade de água pela perda de umidade por evaporação. (BERESFORD et al., 2001).

4.3.1.6. Teor de gordura e gordura no extrato seco (GES) durante a maturação

Houve efeito significativo das concentrações de nisina e do tempo de maturação em relação ao teor de gordura e GES dos queijos artesanais ($P < 0,05$), mas não houve efeito da interação tempo x nisina ($P \geq 0,05$).

A Tabela 13 apresenta os valores médios do teor de gordura e de GES para os queijos fabricados com as três concentrações diferentes de nisina.

Tabela 13: Valores médios do teor de gordura e GES em todos os tempos de maturação para os queijos com diferentes concentrações de nisina*.

Nisina (IU.mL ⁻¹)	GES	Gordura (%m/m)
0	53,35 ^a	30,44 ^a
100	49,86 ^{ab}	27,69 ^b
400	49,07 ^b	27,26 ^b

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey.

Quanto maior foi a concentração de nisina utilizada, menor foi a porcentagem de gordura e GES do queijo (Tabela 13).

Martins et al. (2004a) encontram teor de gordura médio de 28,29% em queijos artesanais de Araxá. Silva et al. (2011) encontraram 27,59% de gordura em queijos artesanais da Canastra no período das águas e 28,51% no período da seca.

Pinto et al. (2011) encontraram 27,83% de gordura em queijos artesanais do Serro. Martins et al. (2004c) encontraram 26,5% de gordura em queijos artesanais do Alto Paranaíba. Estes resultados demonstram que os queijos artesanais das diferentes regiões possuem porcentagens de gordura semelhantes, apesar das fontes de variação como estações do ano, alimentação animal, heterogeneidade racial do rebanho leiteiro e variações de manejo que podem afetar o teor de gordura do leite (COSTA JUNIOR et al., 2009a; SILVA et al., 2011).

Os queijos controle, com 100 IU.mL⁻¹ e 400 IU.mL⁻¹ de nisina apresentaram valores médios de porcentagem de gordura no extrato seco (GES) de 53,35%, 49,85% e 49,07% respectivamente (Tabela 13). Estes resultados médios classificam estes queijos como gordos de acordo com a Portaria 146/96 (BRASIL 1996). A portaria 146/96 (BRASIL 1996) classifica os queijos de acordo com o teor de gordura no extrato seco (GES), sendo denominados gordos quando apresentam um GES entre 45 a 59,9%. No entanto, a Lei 14.185/2002 (MINAS GERAIS, 2002b) que é específica para queijos artesanais, não estabelece nenhum critério para queijos artesanais quanto ao teor de gordura.

A evolução do teor de gordura e do GES dos queijos artesanais com e sem nisina ao longo da maturação estão demonstrados na Figura 11.

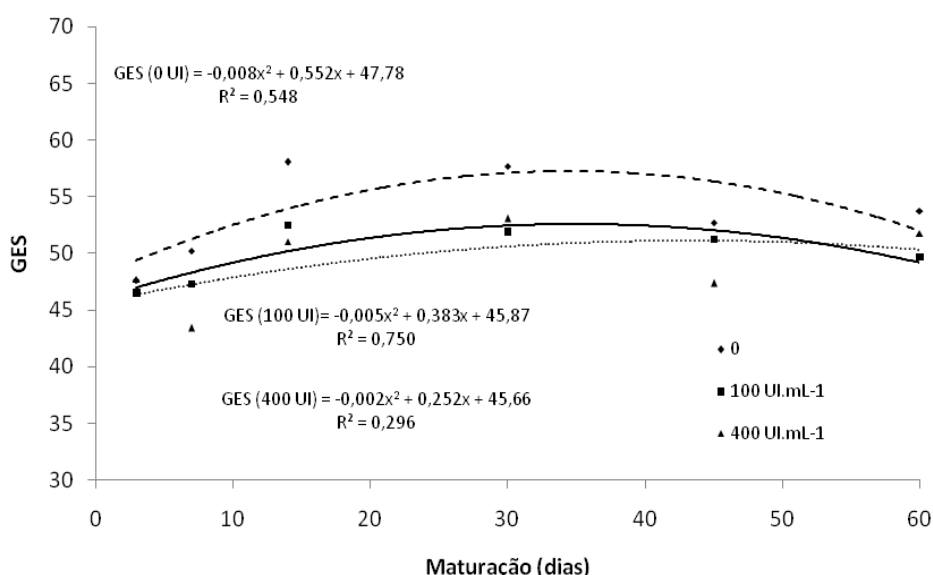


Figura 11 – Valores de GES dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina: (---) 0; (—) 100 IU.mL⁻¹; e (...) 400 IU.mL⁻¹.

A Figura 11 demonstra que os queijos controle foram mais gordos ao longo de toda maturação se comparados aos queijos com nisina. O aumento no teor de gordura dos queijos ao longo do tempo é esperado, devido à perda de umidade por evaporação e aumento da proporção dos constituintes sólidos, no entanto o GES tende a se manter constante.

Em um estudo realizado por Pinto et al. (2011) o teor de gordura dos queijos artesanais do Serro com 100UI.mL^{-1} e 500UI.mL^{-1} não apresentam diferença significativa em relação ao queijo controle ($P \geq 0,05$), diferindo do presente estudo. Este resultado comprova que a nisina influencia a composição centesimal de queijos artesanais de forma diferente de acordo com a região onde é utilizada.

4.3.1.7. Evolução do teor de proteína total durante a maturação

Não houve efeito significativo das concentrações de nisina em relação à proteína total dos queijos ($P \geq 0,05$), mas houve efeito nos tempos de maturação ($P < 0,05$). Também não houve efeito significativo da interação tempo x nisina ($P \geq 0,05$).

A evolução do teor de proteínas dos queijos artesanais da região de Araxá está apresentada na Figura 12.

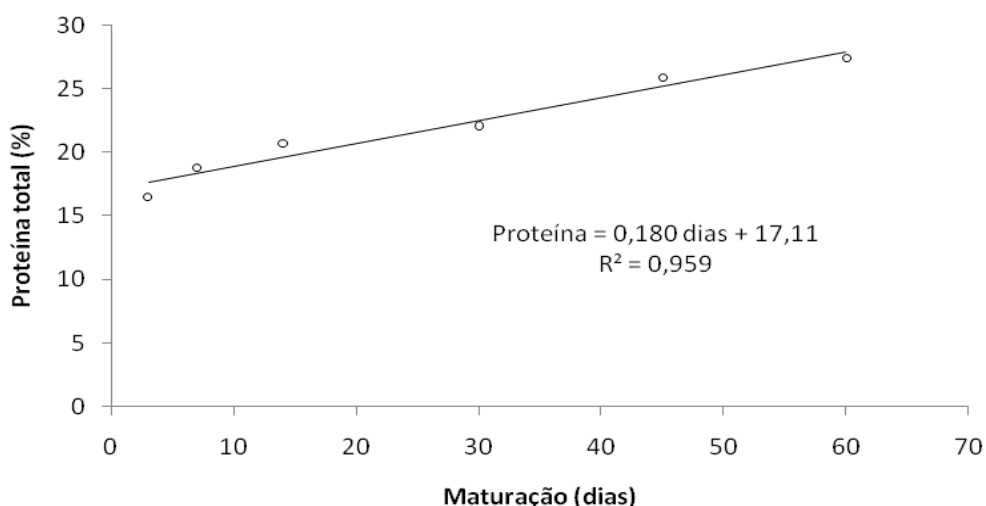


Figura 12. Valores médios do teor de proteína total dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina.

Houve aumento progressivo e linear do percentual de proteína dos queijos ao longo dos 60 dias de maturação (Figura 12). A concentração da proteína total dos queijos ao longo do tempo é esperada, assim como a gordura e o teor de cloretos, devido à perda e umidade por evaporação, pois há um aumento do extrato seco total dos queijos, os quais são maturados sem embalagem e à temperatura ambiente (FOX et al., 2004).

Martins et al. (2004a) encontraram teores de proteína total que variaram de 21,83 a 29,26% em queijos artesanais da região de Araxá com 8 dias de maturação, de diferentes queijarias, demonstrando a falta de padronização dos queijos desta região.

Fatores como a quebra da massa com pás de madeira (e não liras) e o fato do leite ser coagulado em bombonas (o que dificulta o corte da coalhada) podem ser os motivos por perdas de proteína (popularmente chamado de “finos”) no soro e, conseqüentemente, motivo de tanta variação no teor de proteína de queijos artesanais (MARTINS et al., 2004a).

4.3.2. Efeito *in loco* da nisina na proteólise do queijo Minas Artesanal da região de Araxá

A maturação envolve uma série de complexos eventos bioquímicos que resultam nas características de sabor, aroma e textura típicas de cada variedade de queijo. O mais complexo desses eventos bioquímicos, a proteólise, é causada por agentes que são oriundos de variadas fontes: coagulante residual (geralmente quimosina), enzimas endógenas do leite, fermentos lácteos, microbiota não originária do fermento e, em muitas variedades, as enzimas da microbiota secundária (por exemplo, *Penicillium* sp. nos queijos maturados por fungos ou *Propionibacterium* sp. nos queijos tipo Suiço) (SOUSA et al., 2001).

No presente estudo, os índices de proteólise % NS_{pH 4,6}/NT (extensão da maturação) e %NS_{TCA 12%}/NT (profundidade da maturação) apresentaram uma curva não-normal de distribuição, de acordo com o teste Ryan-Joiner, portanto, para estes resultados, adotou-se a estatística não paramétrica por meio do teste de Kruskal-Wallis (nível de 5% de probabilidade).

Não houve efeito significativo das concentrações de nisina em relação à % $NS_{pH\ 4,6}/NT$ e $NS_{TCA\ 12\%}/NT$ ($P \geq 0,05$) dos queijos, mas houve efeito nos tempos de maturação ($P < 0,05$).

As Figuras 13 e 14 apresentam a evolução dos índices de proteólise dos queijos com o decorrer dos 60 dias de maturação dos queijos artesanais da região de Araxá.

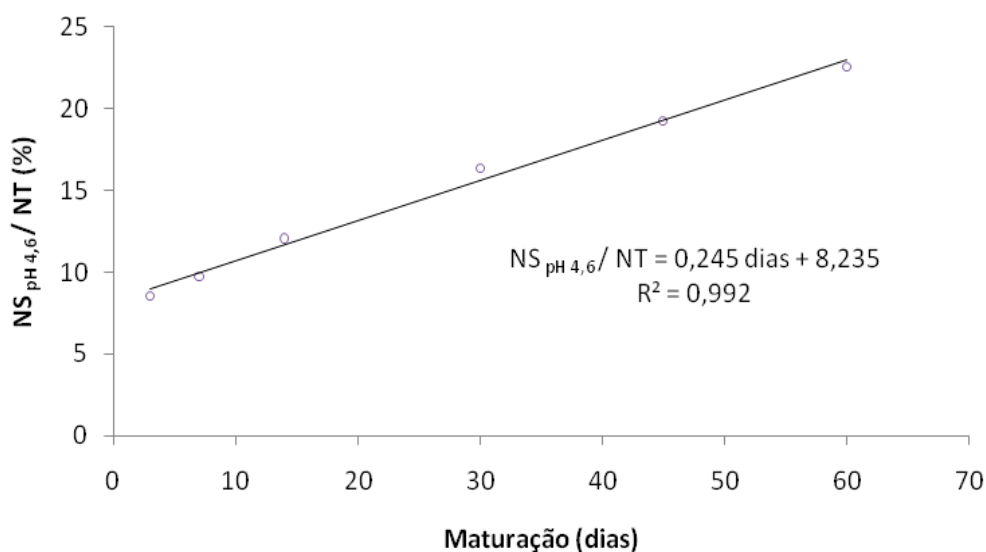


Figura 13. Média da porcentagem de $NS_{pH\ 4,6}/NT$ dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina.

O % $NS_{pH\ 4,6}/NT$ se deve principalmente a ação proteolítica do coalho residual sobre a caseína do queijo (POMBO e LIMA, 1989). Silva et al. (2011) e Costa Junior et al. (2009b) encontraram valores de, respectivamente, 12,28% e 9% de % $NS_{pH\ 4,6}/NT$ para queijos artesanais da Canastra e Pinto et al. (2011) encontraram valores próximos de 12% para queijos artesanais do Serro, todos com 8 dias de maturação.

No presente estudo, houve um aumento gradual do % $NS_{pH\ 4,6}/NT$ e do % $NS_{TCA\ 12\%}/NT$ durante o período de maturação para todos os queijos (Figuras 13 e 14).

O % $NS_{TCA\ 12\%}/NT$ se deve a compostos característicos como aminoácidos, oligo-peptídeos, aminas produzidos durante a maturação dos queijos (POMBO e LIMA, 1989). Em outros estudos, foram encontrados médias de 4,66% (COSTA JUNIOR et al., 2009b) e 9,47% (SILVA et al., 2011) de % $NS_{TCA\ 12\%}/NT$ para queijos

artesanais da Canastra e aproximadamente 7% de $\%NS_{TCA12\%}/NT$ para queijos artesanais do Serro (PINTO et al., 2011), também com 8 dias de maturação.

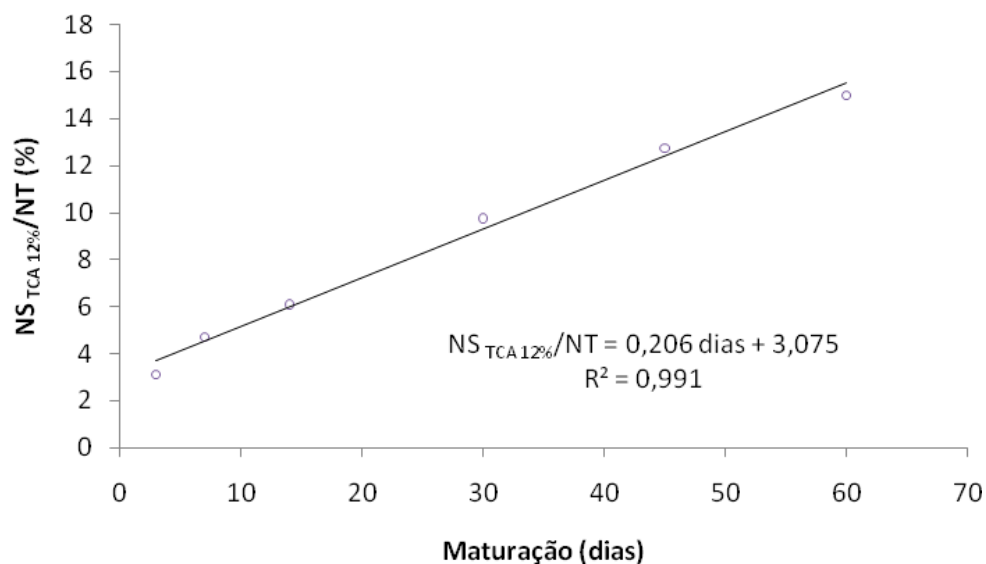


Figura 14. Média da porcentagem de $NS_{pH\ 4,6}/NT$ dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina.

Os resultados dos trabalhos supracitados demonstram que há variação nos índices de proteólise dos queijos de cada região. Comparar a maturação dos queijos artesanais de diferentes regiões é difícil, pois existem muitas fontes que modificam a proteólise do queijo de maneira direta ou indireta, como a microbiota acidificadora de cada região, a quantidade de pingo utilizada, a umidade diferente dos queijos, as desigualdades nos teores de cloretos, as variações de temperaturas de maturação e umidade relativa do ar das câmaras.

Em um estudo realizado por Chollet et al. (2008) com queijo Emmental adicionado de nisina, verificou-se que as enzimas proteolíticas presentes no queijo não foram capazes de hidrolisar a nisina e conseqüentemente não diminuíram sua capacidade antimicrobiana, no entanto, a nisina pode inibir as bactérias lácticas que influenciam nos índices de maturação.

4.3.3. Análises Microbiológicas

O resultado completo das contagens microbiológicas dos queijos Minas artesanais da região de Araxá com diferentes concentrações de nisina ao longo dos 60 dias de maturação está apresentado na Tabela 14.

Tabela 14. Médias das contagens microbiológicas do queijo Minas artesanal da região de Araxá fabricado com diferentes concentrações de nisina ao longo de 60 dias de maturação.

Maturação (dias)	Nisina (UI.mL ⁻¹)	<i>S. aureus</i> Log UFC.g ⁻¹	Aeróbios Mesófilos Log UFC.g ⁻¹	Coliformes totais Log UFC.g ⁻¹	<i>E. coli</i> Log UFC.g ⁻¹	Bactérias lácticas Log UFC.g ⁻¹
3	0	4,76	9,28	5,95	3,61	8,50
	100	< 1	8,99	6,98	3,96	8,26
	400	< 1	8,70	8,03	5,35	8,83
7	0	4,84	9,33	5,62	3,46	8,09
	100	< 1	8,90	6,35	3,07	7,55
	400	< 1	8,56	8,24	5,27	8,23
14	0	3,09	9,34	4,73	2,45	7,97
	100	< 1	8,83	6,26	3,04	8,40
	400	< 1	8,52	7,95	5,77	8,09
30	0	3,80	9,56	5,12	2,50	8,13
	100	< 1	8,82	5,66	2,80	8,07
	400	< 1	8,81	7,49	5,84	8,42
45	0	1,51	7,92	3,51	1,13	7,92
	100	< 1	8,38	4,45	2,72	8,19
	400	< 1	8,22	6,52	5,07	8,13
60	0	1,87	8,59	3,17	1,14	7,73
	100	< 1	8,92	4,36	2,39	7,76
	400	< 1	8,75	5,62	4,57	7,96

Os dados apresentados na Tabela 14 serão discutidos nos itens abaixo.

4.3.3.1. Contagens de *S. aureus* e bactérias lácticas no leite e na massa

Foram analisadas amostras do leite e da massa de cada propriedade quanto à contagem de *S. aureus* e bactérias lácticas com o intuito de verificar as contagens iniciais de cada um desses micro-organismos.

A Tabela 15 apresenta a média das contagens de *S. aureus* no leite e na massa, durante o processo de fabricação dos queijos artesanais.

Tabela 15. Contagens médias de *S. aureus* em função das diferentes doses de nisina adicionadas no leite e na massa durante o processo de fabricação dos queijos artesanais.

Micro-organismo	Nisina (IU.mL ⁻¹)	Leite Log UFC.mL ⁻¹	Massa Log UFC.g ⁻¹
<i>S. aureus</i>	0	2,537 ^a	2,25 ^a
	100	1,633 ^a	< 1 ^b
	400	2,293 ^a	< 1 ^b

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey em cada coluna separadamente.

Neste estudo, como esperado, as contagens iniciais de *S. aureus* no leite não foram diferentes estatisticamente ao nível de 5% de significância ($P \geq 0,05$) para os diferentes tratamentos. A igualdade dos resultados era esperada, pois se partiu do mesmo leite para a fabricação dos queijos artesanais com diferentes concentrações de nisina.

A Lei 14.185 (MINAS GERAIS, 2002b), específica para queijos artesanais, preconiza valores de *Staphylococcus aureus* menores iguais a 10^2 UFC.mL⁻¹ ou 2 Log UFC.mL⁻¹ no leite cru destinado a fabricação de queijos. Com base nos limites exigidos por essa lei, conclui-se que o leite utilizado no presente estudo, destinado para a fabricação dos queijos controle e de 400 UI.mL⁻¹ (Tabela 15) estava fora dos padrões exigidos.

No entanto, os queijos artesanais de Araxá possuem potencial para obter sucesso com a utilização de nisina, pois as contagens iniciais de *S. aureus* no leite foram inferiores a 10^3 UFC.mL⁻¹. Apenas a utilização de nisina no leite não garante que os queijos artesanais sejam seguros. Para que isso ocorra, é necessário que a contagem inicial de *S. aureus* no leite seja baixa e que se pratique as boas práticas de fabricação, pois a eficácia da nisina depende da contagem inicial (PINTO et al., 2011).

Resultado semelhante ao do atual estudo foi encontrado por Borelli et al. (2006), em que as contagens de *S. aureus* no leite variaram de 2,0 a 4,9 Log UFC.mL⁻¹ na região da Canastra, também produtora de queijos artesanais. Contagens iniciais acima de 4 ciclos logarítmicos foram encontradas por Pinto et al. (2011) no leite utilizado para a fabricação de queijos na região do Serro. Rall et al. (2008) encontraram *S. aureus* em 70,4% das amostras de leite cru de 5 fazendas do estado de São Paulo, com contagens acima de 10^5 UFC.mL⁻¹.

Para análise da massa (Tabela 15), verificou-se imediata inibição de *S. aureus* na fabricação dos queijos adicionados de nisina, o que também comprova o potencial de utilização de nisina na inibição de *S. aureus* em queijos artesanais da região de Araxá. A coleta da massa foi feita no início da etapa de enformagem e antes da salga dos queijos.

Em um estudo na região da Canastra, Borelli et al. (2006) encontraram contagens de *S. aureus* na massa que variaram de 4,3 a 6,4 log UFC.g⁻¹, médias superiores a dos queijos de Araxá.

A Tabela 16 mostra as contagens de bactérias lácticas para o leite e a massa durante o processo de fabricação dos queijos artesanais.

Tabela 16. Contagens médias de bactérias lácticas em função das diferentes doses de nisina adicionadas no leite e na massa durante o processo de fabricação dos queijos artesanais.

Micro-organismo	Nisina (UI.mL ⁻¹)	Leite Log UFC.mL ⁻¹	Massa Log UFC.g ⁻¹
	0	1,937 ^a	4,300 ^a
Bactérias lácticas	100	2,070 ^a	3,013 ^a
	400	2,890 ^a	2,433 ^a

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey em cada coluna separadamente.

O objetivo da análise de bactérias lácticas no leite foi verificar se as contagens iniciais eram semelhantes, já que se trabalhou com o mesmo leite para as diferentes fabricações dos queijos artesanais. Como esperado, a contagem de bactérias lácticas foi igual estatisticamente ao nível de 5% de significância ($P \geq 0,05$) para os diferentes tratamentos.

No caso da análise de bactérias lácticas na massa, a finalidade era verificar se haveria inibição destas bactérias em função da adição de nisina no leite. Apesar da tendência de redução das bactérias lácticas em função da adição de nisina, as contagens de bactérias lácticas na massa foram estatisticamente iguais para todos os tratamentos ao nível de 5% de significância. As bactérias lácticas catalisam reações bioquímicas que promovem sabor e textura característicos das inúmeras variedades de queijo (McSWEENEY, 2004), portanto, neste estudo, é desejável que a nisina não iniba o desenvolvimento de tais bactérias.

4.3.3.2. Contagem de *S. aureus* do queijo Minas Artesanal da região de Araxá

A análise de variância demonstrou que as concentrações de nisina influenciaram significativamente as contagens de *S. aureus* dos queijos artesanais ($P < 0,05$) (Tabela 17), no entanto não houve efeito do tempo ($P \geq 0,05$) e nem da interação tempo *versus* tratamento ($P \geq 0,05$) ao nível de 5 % de significância.

Tabela 17. Valores médios das contagens de *S. aureus* para os queijos com diferentes concentrações de nisina em todos os tempos de maturação.

Nisina (IU.mL ⁻¹)	Log UFC.g ⁻¹ *
0	3,31 ^a
100	0 ^b
400	0 ^b

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey.

Apesar da média das contagens dos queijos controle apresentar um valor aceitável de 3,31 log UFC.g⁻¹ (Tabela 17), alguns queijos no início da maturação atingiram valores de 10⁶ UFC.g⁻¹, o que demonstra a necessidade do uso de nisina para fabricar os queijos desta região.

Nos queijos em que foi adicionado 100 e 400 UI.mL⁻¹ de nisina não foi detectada a presença de *S. aureus* ao longo dos 60 dias de maturação, ou seja, apresentaram contagens inferiores a 1 log UFC.g⁻¹ em todas as análises, ao longo do tempo.

Este resultado evidencia a atividade bactericida da nisina em relação ao desenvolvimento de *S. aureus*, mesmo utilizando baixas concentrações de nisina, como 100 UI.mL⁻¹. Este resultado difere de Pinto et al. (2011), em que a nisina reduziu as contagens de *S. aureus*, mas não inibiu o totalmente o desenvolvimento destes, como ocorreu nos queijos artesanais de Araxá. Tal fato pode ser explicado devido às estirpes de *S. aureus* da região de Araxá serem mais sensíveis à nisina se comparadas às dos queijos artesanais da região do Serro, como comprovado nos testes *in vitro* dos respectivos estudos.

A Figura 14 demonstra a evolução da contagem de *S. aureus* para os queijos controle, ou seja, sem adição de nisina, do presente estudo. Nota-se que o queijo controle chegou a atingir médias de aproximadamente 5 log UFC.mL⁻¹ de *S. aureus*, valor superior ao exigido por Lei (as contagens devem ser menores que 3,7 log

UFC.g⁻¹) (MINAS GERAIS, 2008), o que comprova a necessidade do uso de nisina como um agente antimicrobiano. Resultados semelhantes para estudos com queijos artesanais foram encontrados por Borelli et al. (2006), ou seja, contagens acima de 5,0 log UFC.g⁻¹ de *S. aureus* nos queijos artesanais da região da Canastra.

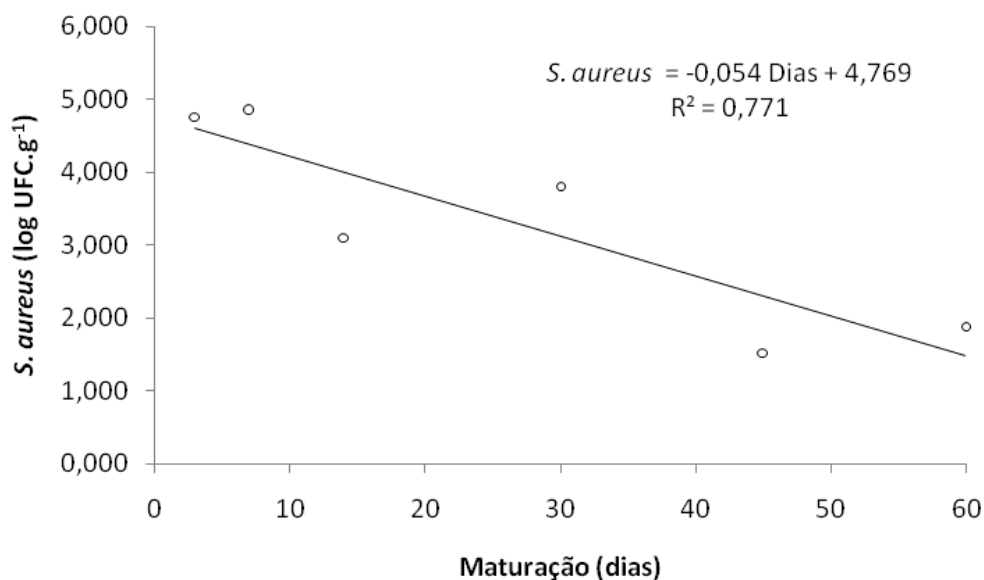


Figura 14. Evolução da contagem de *S. aureus* em função do tempo para queijo Minas artesanal da região de Araxá fabricado sem a adição de nisina.

A produção de toxinas necessárias para ocasionar a intoxicação ocorre quando se atinge contagens de 10⁵ a 10⁶ micro-organismos por grama do alimento (SILVA e GOMES, 2001; BORGES et al., 2008). No presente estudo, nos tempos 3 e 7 dias de maturação, para contagens do queijo controle, se atingiu valores próximos de 10⁵, o que indica a potencial presença de enterotoxinas, suficientes para causar uma intoxicação e também indicando a necessidade do uso de nisina.

Borelli et al. (2006) encontraram contagens de *S. aureus* nos queijos artesanais com cinco dias de fabricação que variaram de 2,0 a 6,3 log UFC.g⁻¹ na região da Canastra. Em um estudo realizado com queijo Minas frescal produzido em Uberlândia-MG, Komatsu et al. (2010) reportaram que 88% das 50 amostras avaliadas estavam contaminadas com *S. aureus* apresentando médias superiores a 10⁵ UFC.g⁻¹. Estes estudos comprovam que os queijos podem ser um risco para intoxicação por *S. aureus*, assim como os queijos controle do presente estudo e deve-se procurar alternativas para combater este problema.

4.3.3.3. Detecção de genes que codificam para a produção de enterotoxinas de *S. aureus*

A presença do gene *femA* (que identifica *S. aureus*) e a presença dos genes que codificam para a produção de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) em linhagens de *S. aureus* isoladas dos queijos foi analisada e os resultados estão demonstrados na Tabela 18. Apenas os queijos controle foram analisados, pois não houve multiplicação de *S. aureus* nos queijos adicionados de nisina.

Tabela 18. Presença do gene *femA* e dos genes que codificam para a produção de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) em linhagens de *S. aureus* isoladas dos queijos artesanais da região de Araxá por PCR.

Identificação da cultura	Presença dos genes*					
	<i>femA</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>
A1	+	+	-	+	-	+
A 2	+	-	-	+	-	+
A 3	+	+	-	-	-	+
A 4	+	+	-	-	-	-
A 5	+	+	-	-	-	+
B 2	+	+	-	-	-	+
B 3	+	+	-	-	-	-
B 4	+	+	-	-	-	+
B 5	+	+	-	-	-	+
C 1	+	+	-	-	-	+
C 2	+	+	-	+	-	-
C 3	+	+	-	+	-	+
C 4	+	+	-	-	-	+
C 5	+	+	-	-	-	+

* -, não detectado; + detectado.

O gene *femA* codifica um fator essencial para a resistência a meticilina e é universalmente presente em todos os isolados de *S. aureus*. Por este motivo sua presença é utilizada para identificação deste micro-organismo (MEHROTRA et al., 2000). Na Tabela 18 verificou-se que todos os isolados escolhidos da terceira etapa eram *S. aureus*, pois possuíam o gene *femA*.

Na Figura 15, observa-se a presença de banda específica para o gene *femA* nos isolados de *S. aureus*. A presença do gene é reconhecida pelo número de pares de bases (pb) que compõem o gene. Dessa forma, observamos a presença de 125 pb que é característico para o *femA*.

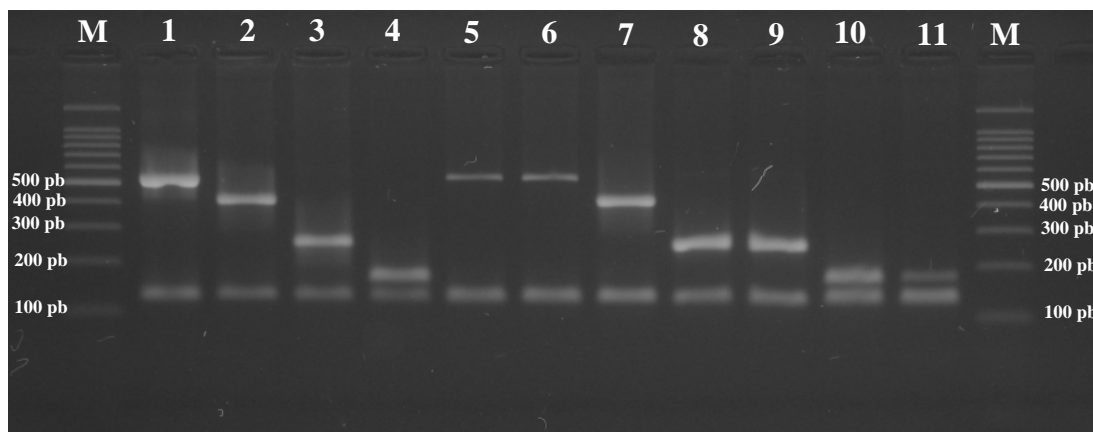


Figura 15 – Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *S. aureus* isolados do queijo Minas artesanal da região de Araxá. Pistas M: marcador. Pista 1: controles positivos *femA* (132 pb) e *sea* (544 pb). Pista 2: controles positivos *femA* (132 pb) e *seb* (416 pb). Pista 3: controles positivos *femA* (132 pb) e *sec* (257 pb). Pista 4: controles positivos *femA* (132 pb) e *see* (170 pb). Pista 5: amostra A1 - positiva para *femA*(132 pb) e *sea* (544 pb). Pista 6: amostra C2 - positiva para *femA* (132 pb) e *sea* (544 pb). Pista 7: amostra 1A (isolada na primeira etapa) - positiva para *femA* (132 pb) e *seb* (416 pb). Pista 8: amostra A2 - positiva para *femA* (132 pb) e *sec* (257 pb). Pista 9: amostra C3 - positiva para *femA* (132 pb) e *sec* (257 pb). Pista 10: amostra B2 - positiva para *femA* (132 pb) e *see* (170 pb). Pista 11: amostra B5 - positiva para *femA* (132 pb) e *see* (170 pb). As identificação das culturas são as mesmas da Tabela 18, com exceção da pista 7, pois foi usado material isolado da primeira etapa do projeto.

Os genes mais freqüentes nos isolados de *S. aureus* foram o *sea* (92,9%) e o *see* (78,6%), enquanto os genes *seb* e *sed* não foram positivos em nenhum dos *S. aureus* isolados dos queijos artesanais de Araxá (Figura 16).

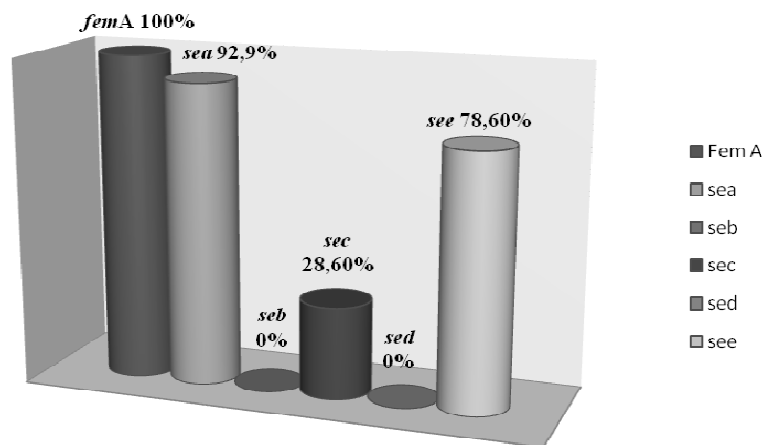


Figura 16. Porcentagem de ocorrência do gene *femA* e de genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, em linhagens de *S. aureus* isoladas de queijo Minas artesanal da região de Araxá.

Em estudo realizado em queijo artesanais da região da Canastra (BORELLI et al., 2011) não foi encontrado a presença de genes que codificam para a produção de enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, resultados que diferem do presente estudo.

4.3.3.4. Detecção de enterotoxinas de *S. aureus*

A detecção de enterotoxinas foi realizada em queijos com contagens de *S. aureus* acima de 10^2 UFC.mL⁻¹. Apenas os queijos controle foram analisados, pois os queijos com 100 UI.mL⁻¹ e 400 UI.mL⁻¹ de nisina apresentam contagens < 10 UFC.g⁻¹. O resultado pode ser demonstrado na Tabela 19.

Tabela 19. Contagens de *S. aureus*, período de maturação e presença de enterotoxinas nos queijos artesanais das 3 propriedades selecionadas (A, B, C).

Produtor	Tempo de maturação (dias)	Contagem UFC.g ⁻¹	Presença de enterotoxina
A	3	2,8 x 10 ⁵	negativo
A	7	5,3 x 10 ⁵	negativo
A	14	1,2 x 10 ³	negativo
A	30	4,3 x 10 ⁴	negativo
B	3	3,2 x 10 ⁵	negativo
B	7	8,1 x 10 ⁵	negativo
B	14	1,6 x 10 ⁶	negativo
B	30	5,8 x 10 ⁶	negativo
B	45	3,5 x 10 ⁴	negativo
B	60	4,2 x 10 ⁵	negativo
C	3	2,1 x 10 ³	negativo
C	7	8,0 x 10 ²	negativo

De acordo com a Tabela 19, verifica-se que não foi encontrada a presença de enterotoxinas nos queijos artesanais da região de Araxá.

Borelli et al. (2011) não encontraram a presença das enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED em queijos artesanais da região da Canastra, durante 45 dias de maturação.

Araújo et al. (2004) também não encontraram a presença de enterotoxinas nas amostras de queijo artesanais de Araxá analisadas, apesar da elevada contagem de *S. aureus* (21,62% dos queijos acima de 10⁵ UFC.g⁻¹). Resultado semelhante foi encontrado por Pinto et. al. (2004) em queijos artesanais produzidos na região do Serro em que 21% das amostras apresentaram contagens entre 10⁶ - 10⁷ UFC.g⁻¹ e não foi detectada a presença de enterotoxina.

Borelli et al. (2006) encontraram as enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED em um “pool” de *S. aureus* isolados de queijos artesanais da região da Canastra, sendo as enterotoxinas SEB e SEC as mais frequentes.

4.3.3.5. Demais análises microbiológicas

O logaritmo da contagem de aeróbios mesófilos, coliformes totais e bactérias lácticas apresentaram uma curva normal de distribuição, de acordo com o teste Ryan-

Joiner. Portanto, para estes resultados, adotou-se a análise de variância e o teste de Tukey para comparação entre as médias (ambos com nível de 5% de probabilidade).

No entanto, o logaritmo da contagem de *E. coli* do presente trabalho apresentou uma curva não-normal de distribuição e para este resultado, adotou-se a estatística não paramétrica por meio do teste de Kruskal-Wallis e o teste de Tukey para comparação entre as médias (ambos com nível de 5% de probabilidade).

4.3.3.5.1. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos

Houve efeito significativo das concentrações de nisina (Tabela 20) e do tempo em relação à contagem total de aeróbios mesófilos ($P < 0,05$), mas não houve efeito significativo da interação tempo e das concentrações nisina ($P \geq 0,05$).

Tabela 20. Contagem de aeróbios mesófilos em função das diferentes doses de nisina para todos os tempos de maturação dos queijos artesanais.

	Nisina (UI.mL ⁻¹)	Média Log UFC.g ⁻¹
Aeróbios mesófilos	0	9,00 ^a
	100	8,81 ^{ab}
	400	8,59 ^b

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey em cada coluna separadamente.

Quanto maior foi a dose de nisina utilizada, menor foi a contagem de aeróbios mesófilos (Tabela 20), indicando que a nisina inibiu este grupo de micro-organismo. A nisina tem efeito bactericida no grupo de bactérias Gram-positivas, sendo assim este efeito inibitório pode ter influenciado na contagens de aeróbios mesófilos de uma maneira geral.

Em um estudo realizado por Pinto et al. (2009b) em queijos artesanais do Serro com sete dias de maturação, em queijarias consideradas adequadas e não adequadas, observou que a média das contagens de mesófilos aeróbios situaram-se entre 8,25 e 8,37 Log UFC.g⁻¹, valores próximos ao do presente estudo.

Neste estudo (Pinto et al., 2009b), verificou-se que a contagem total de mesófilos não é fator relevante para se avaliar a adequação da produção de queijos artesanais do Serro baseado na salubridade da queijaria, presença de animais domésticos e hábitos higiênicos do queijeiro.

A Tabela 21 mostra a equação da evolução das contagens de aeróbios mesófilos de acordo com as diferentes doses de nisina ao longo da maturação. O r^2 baixo é explicado devido à dispersão dos dados dentro de cada nível, no entanto verifica-se que há uma tendência de comportamento justificada pela significância dos coeficientes de regressão.

Tabela 21. Equação do comportamento de aeróbios mesófilos nos queijos com diferentes doses de nisina ao longo da maturação.

Micro-organismos	Equação*	r^2
Aeróbios mesófilos	$y = 9,34 - 0,00195x - 0,0142z + 0,000038xz$	26,0

* a variável x é a concentração de nisina (IU.mL⁻¹) e a variável z é o tempo de maturação.

4.3.3.5.2. Contagem de coliformes totais

Houve efeito significativo das concentrações de nisina e do tempo em relação à contagem de coliformes totais ($P < 0,05$), mas não houve efeito significativo da interação entre tempo e concentrações de nisina ($P \geq 0,05$).

A Tabela 22 apresenta os valores médios da contagem de coliformes totais para os diferentes tratamentos do queijo Minas artesanal, para todos os tempos avaliados, demonstrando o efeito da nisina.

Tabela 22. Contagem de coliformes totais em função das diferentes doses de nisina para todos os tempos de maturação dos queijos artesanais.

Nisina (IU.mL ⁻¹)	Média Log UFC.g ⁻¹
0	4,69 ^c
100	5,68 ^b
400	7,31 ^a

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey em cada coluna separadamente.

Apesar das doses de nisina inibirem a multiplicação de *S. aureus* nos queijos, nota-se que quando maior a concentração de nisina, maior é a contagem de coliformes totais (Tabela 22).

Este fato pode ter ocorrido devido ao efeito bactericida da nisina sobre bactérias que competem pelo mesmo substrato com o grupo coliformes totais,

favorecendo conseqüentemente sua multiplicação, já que os coliformes totais são bacilos Gram-negativos e não são inibidos pela ação da nisina.

Portanto, o uso de nisina não garante a qualidade do queijo, faz-se necessário manter as condições de higiene e Boas Práticas na fabricação e também na obtenção do leite. A presença de coliformes indica a qualidade higiênico-sanitária deficiente do produto.

De acordo com o Decreto 44.864 de 08 de agosto de 2008 (MINAS GERAIS, 2008), o limite máximo de coliformes totais permitido em queijos artesanais é de 4 Log UFC.g⁻¹, demonstrando que a média dos queijos artesanais de Araxá (Tabela 22) com e sem o uso de nisina estão inadequadas em relação a contagem de coliformes totais.

Em um estudo com queijo Minas artesanal fresco da região do Serro (FARIA et al., 2002) 21 % dos queijos analisados apresentaram contagens de coliformes totais acima de 4 log coliformes.g⁻¹, sendo que em 50% destas amostras a contagem foi reduzida para menos que 10³ com a maturação do queijo por 30 dias a 12 °C.

Pinto et al. (2009b) encontraram valores de médios de 3,6 a 5,47 log UFC.g⁻¹ de coliformes totais em queijarias consideradas adequadas e inadequadas, tomando como base a salubridade da queijaria, a presença de animais domésticos e hábitos higiênicos do queijeiro. Estes valores são inferiores ao do presente estudo, em que a média das contagens de coliformes totais dos queijos artesanais de Araxá com 7 dias de maturação foi de 6,73 log UFC.g⁻¹.

Araujo et al. (2004) encontraram contagens de 10⁴ coliformes.g⁻¹ em 48,65% das amostras de queijos artesanais de Araxá e 3 log UFC.g⁻¹ em 37,84% das amostras analisadas para *E. coli*, enquanto Borelli et al. (2006) encontraram contagens de coliformes totais nos queijos artesanais com cinco dias de fabricação que variaram de 240 a 11000 NMP.g⁻¹ na região da Canastra.

Comparando-se os resultados obtidos por esses pesquisadores, pode-se verificar que existe uma discrepância em relação à presença dos coliformes totais nas amostras estudadas, demonstrando que as condições higiênico-sanitárias podem ser diferentes para cada estabelecimento produtor.

A equação do comportamento de coliformes totais em função das diferentes concentrações de nisina ao longo do tempo pode ser observada na Tabela 23.

Tabela 23. Equação do comportamento de coliformes totais nos queijos com diferentes doses de nisina ao longo da maturação.

Micro-organismos	Equação*	r ²
Coliformes totais	$y = 6,05 + 0,00629x - 0,0455z$	69,4

* a variável x corresponde à concentração de nisina (UI.mL⁻¹) e a variável z corresponde ao tempo de maturação.

De acordo com análise de variância, os queijos artesanais demonstraram tendência ao decréscimo ao longo do tempo de maturação, como pode ser visto na equação da Tabela 23, pois nota-se coeficiente correspondente ao tempo de maturação é negativo e o inverso ocorre em relação a dose de nisina.

A Figura 16 mostra o comportamento de coliformes totais nos queijos artesanais com diferentes concentrações de nisina separadamente ao longo do tempo.

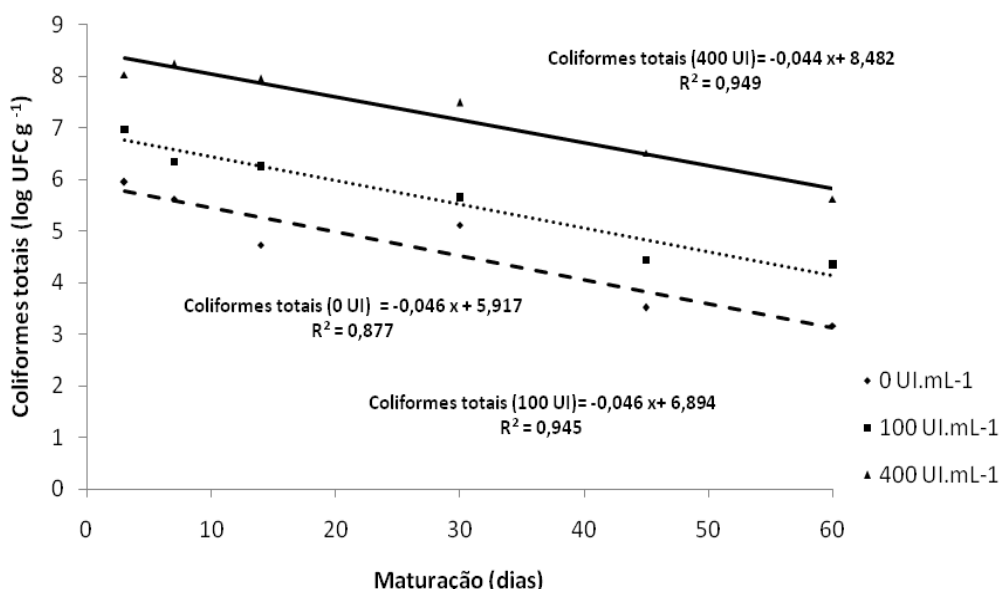


Figura 16. Contagem de coliformes totais dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina: (---) 0; (....) 100 UI.mL⁻¹; e (___) 400 UI.mL⁻¹.

A Figura 16 demonstra que há uma tendência ao decréscimo de coliformes totais em função do tempo e também que quanto maior é a dosagem de nisina utilizada, maior é a contagem. A diferença média para a contagem de coliformes dos queijos controle ao longo da maturação foi de 1 e 2,6 ciclos logarítmicos para queijos com 100 UI.mL⁻¹ e 400 UI.mL⁻¹ respectivamente.

4.3.3.5.3. Contagem de *E. coli*

Houve efeito significativo das concentrações de nisina ($P < 0,05$) em relação à contagem de *E. coli* nos queijos artesanais com diferentes concentrações de nisina (Tabela 24), mas não houve efeito em relação ao tempo de maturação ($P \geq 0,05$).

Tabela 24. Contagem de *E. coli* em função das diferentes doses de nisina para todos os tempos de maturação dos queijos artesanais.

Nisina (UI.mL ⁻¹)	Média log UFC.g ⁻¹
0	2,37 ^b
100	2,75 ^b
400	5,50 ^a

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey em cada coluna separadamente.

De acordo com a Tabela 24, verifica-se que não houve diferença nas contagens de *E. coli* nos queijos com 0 e 100 UI.mL⁻¹, no entanto a contagem dos queijos com 400 UI.mL⁻¹ foi superior as demais. A mesma justificativa para a maior contagem de coliformes pode ser utilizada para justificar a maior contagem de *E. coli* nos queijos com 400 UI.mL⁻¹ de nisina. A nisina pode ter efeito bactericida em bactérias Gram-positivas que competem pelo mesmo substrato com o grupo *E. coli*, favorecendo conseqüentemente sua multiplicação, já que a *E. coli* é Gram-negativa e não é inibida pela ação da nisina.

A Figura 17 demonstra que os queijos com concentrações de 400 UI.mL⁻¹ apresentam tendência quadrática de comportamento ao longo do tempo, enquanto para 0 e 100 UI.mL⁻¹ existe uma tendência linear. No entanto, de acordo com a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, não há efeito significativo ($P \geq 0,05$) de tempo no desenvolvimento de *E. coli*.

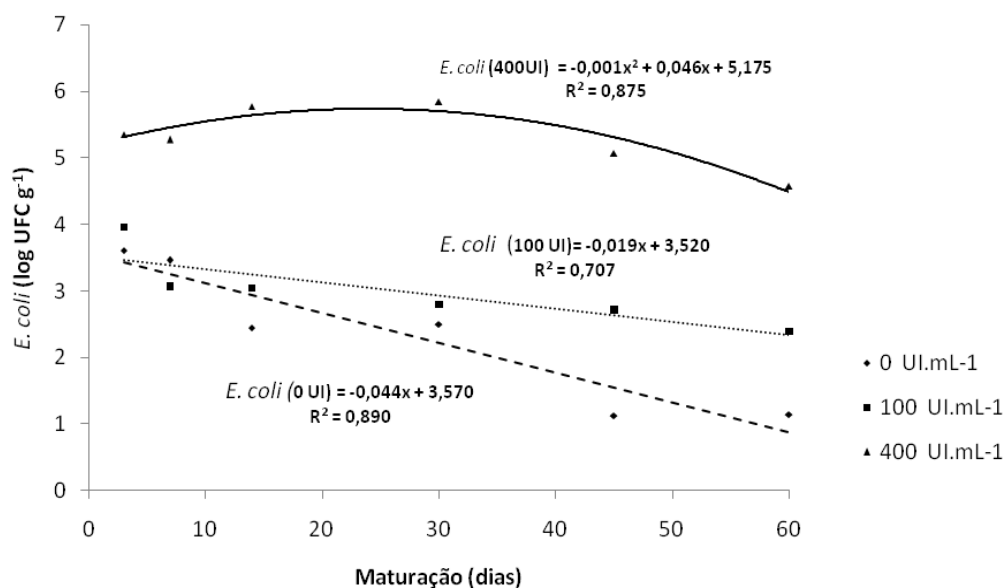


Figura 17. Contagem de *E. coli* dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina: (---) 0; (....) 100 UI.mL⁻¹; e (___) 400 UI.mL⁻¹.

Como ambas as dosagens de nisina de 400 UI.mL⁻¹ e 100 UI.mL⁻¹ foram eficientes para inibir *S. aureus*, conclui-se que é recomendado utilizar 100 UI.mL⁻¹ em queijos artesanais da região de Araxá para manter as contagens de *E. coli* semelhantes às do queijo controle.

4.3.3.5.4. Contagem de bactérias lácticas

Não houve efeito significativo das concentrações de nisina, do tempo e da interação do tempo e concentrações de nisina em relação à contagem de bactérias lácticas ($P \geq 0,05$) nos queijos artesanais.

Tabela 25. Contagem de bactérias lácticas em função das diferentes doses de nisina durante o processo de fabricação dos queijos artesanais.

Nisina (IU.mL ⁻¹)	Média Log UFC.g ⁻¹
0	8,05 ^a
100	8,03 ^a
400	8,28 ^a

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey em cada coluna separadamente.

Este resultado (Tabela 25) pode ser considerado satisfatório, pois significa que não houve efeito bactericida da nisina em relação às bactérias lácticas, que influenciam positivamente na proteólise do queijo e conseqüentemente nas características de textura e sabor dos queijos artesanais da região de Araxá. A microbiota específica local é responsável pelas características do queijo artesanal de cada região e por isso deve ser mantida.

A evolução das médias das contagens de bactérias lácticas ao longo do período de maturação está apresentado na Figura 18.

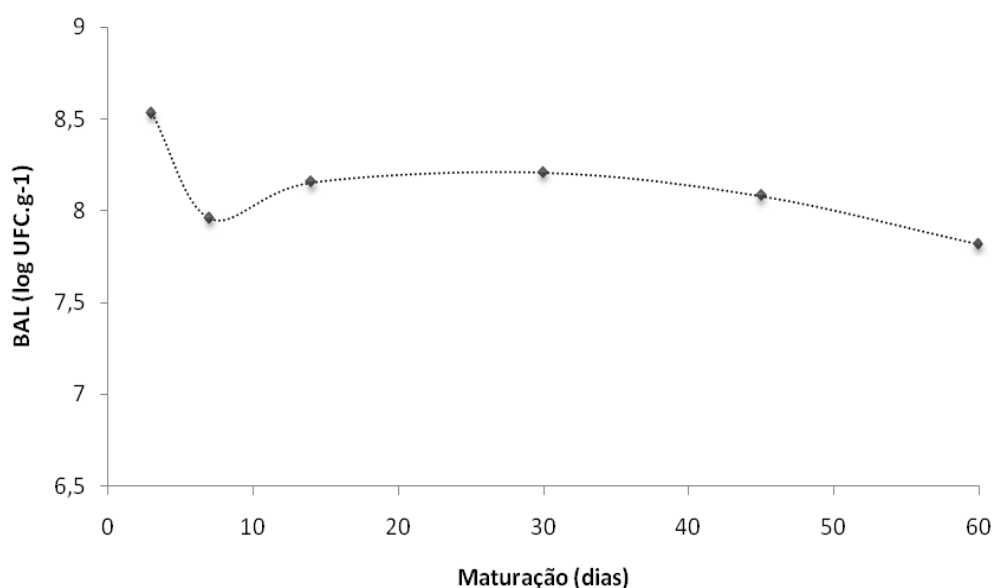


Figura 18. Média das contagens de bactérias lácticas (BAL) dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina.

Em um estudo realizado por Kykkidou et al. (2007), foi comprovado que diferentes concentrações de nisina (0, 50 e 150 IU g⁻¹) afetaram a contagem de lactococos somente após 14 dias de maturação de um queijo ácido macio (Galotyri) sob refrigeração a 4°C. Após 14 dias, quanto maior a dose de nisina, menor foi a população de lactococos. Já a população de lactobacilos decresceu até 21 dias de maturação e após esta data a população aumentou, sendo que quanto maior a concentração de nisina, menor a população de lactobacilos. Este resultado diverge do presente estudo, pois por se tratar de um queijo ácido (Galotyri), esta acidez pode ter auxiliado positivamente no efeito bactericida da nisina nas bactérias lácticas do queijo, o que não ocorreu nos queijos artesanais de Araxá.

Durante o período de maturação, os queijos artesanais desenvolvem características típicas de cada região devido principalmente à microbiota específica do leite cru e do pingo. Um queijo fabricado com leite cru tende a desenvolver um sabor característico se comparado ao queijo de leite pasteurizado (BACHMANN et. al., 1996).

As bactérias lácticas têm a função de produzir ácido láctico a partir da lactose e causar mudanças bioquímicas no queijo por meio de suas enzimas durante a maturação, determinando as características de sabor e aroma dos queijos. As bactérias lácticas são chamadas de culturas primárias ou iniciadoras, pois iniciam a produção de ácido láctico a partir da lactose (FOX et al, 2004).

4.3.4. Efeito *in loco* da nisina sobre o perfil de textura do queijo Minas Artesanal da região de Araxá

A análise do perfil de textura é uma importante ferramenta para a caracterização do queijo. No caso dos queijos artesanais, esta análise pode contribuir para a reivindicação do selo de “designação de origem protegida” que valoriza o produto e tradição do local onde é produzido (PINTO et al., 2011).

O resultado completo das análises do perfil de textura dos queijos Minas artesanais da região de Araxá com diferentes concentrações de nisina ao longo dos 60 dias de maturação está apresentado na Tabela 26.

Tabela 26. Análise do perfil de textura do queijo Minas Artesanal da região de Araxá fabricado com diferentes concentrações de nisina durante a maturação.

Maturação (dias)	Nisina (UI.mL ⁻¹)	Firmeza (N)	Fratura-bilidade (N)	Mastiga-bilidade (N)	Coesi-vidade (taxa)	Gomo-sidade (N)	Elasti-Cidade (mm)
3	0	22,49	17,31	130,4	0,7520	13,03	7,650
	100	25,76	19,67	146,4	0,7600	14,64	7,417
	400	28,26	24,42	111,0	0,8643	19,80	7,783
7	0	39,99	28,01	184,6	0,7113	18,45	7,534
	100	32,97	23,25	161,9	0,7420	16,19	7,554
	400	31,88	27,21	204,7	0,8347	20,47	7,815
14	0	32,31	20,09	118,5	0,6263	11,85	6,075
	100	44,39	28,74	176,1	0,6640	17,61	6,525
	400	37,20	31,29	226,0	0,8220	22,61	7,294
30	0	77,50	44,70	297,0	0,6280	29,70	4,344
	100	68,30	40,10	247,1	0,6373	24,71	4,720
	400	68,50	56,10	379,0	0,8093	37,40	6,150
45	0	84,10	48,10	318,0	0,6123	31,70	3,733
	100	77,40	51,80	478,3	0,6147	47,82	4,207
	400	117,00	95,20	598,6	0,8120	59,90	5,970
60	0	53,99	34,09	207,5	0,6573	20,74	4,764
	100	59,80	38,70	236,3	0,6653	23,62	5,188
	400	51,52	42,74	278,0	0,8143	27,80	6,340

Os dados do perfil de textura do presente trabalho apresentaram uma curva não-normal de distribuição, portanto, para esses resultados, adotou-se a estatística não paramétrica por meio do teste de Kruskal-Wallis (nível de 5% de probabilidade).

4.3.4.1. Coesividade

A coesividade é a força dos laços internos que compõem o corpo do produto. Corresponde a área da segunda mordida sobre a área da primeira mordida no gráfico TPA (FOX et al., 2000). Para a variável coesividade, o teste de Kruskal-Wallis indicou diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$) para os tratamentos (Tabela 27), no entanto não houve efeito do tempo ($P < 0,05$).

Tabela 27. Valores médios de coesividade para os queijos com diferentes concentrações de nisina em todos os tempos de maturação.

Nisina (IU.mL ⁻¹)	Coesividade*
0	0,665 ^b
100	0,681 ^b
400	0,826 ^a

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey.

O queijo com concentração de 400 UI.mL⁻¹ de nisina alcançou maior valor de coesividade se comparados ao controle e 100 UI.mL⁻¹ (Tabela 27). Os queijos com 400 UI.mL⁻¹ de nisina, também foram os que alcançaram maiores valores de pH (Tabela 12), se comparados aos demais. O pH pode ter influenciado a coesividade dos queijos. Com o pH mais alto, acredita-se que os queijos estão mais mineralizados, com maior quantidade de cálcio ligado à caseína (FOX et al., 2004) e portanto, o queijo possui consistência menos quebradiça, com maior coesividade se comparados aos queijos com pH mais baixo.

4.3.4.2. Firmeza, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade

Neste estudo, a firmeza, a fraturabilidade, a mastigabilidade e a gomosidade apresentaram comportamento semelhante, por isso, foram agrupados no mesmo item.

A firmeza é força necessária para a deformação do alimento; a fraturabilidade é tendência dos queijos duros a romper; a gomosidade é a energia necessária para desintegrar um alimento semi-sólido, ou seja, tornar um pedaço de queijo, para um estado pronto para engolir (FOX et al., 2002).

A mastigabilidade é o esforço necessário para que o alimento sólido esteja pronto para ser deglutido e resulta do produto entre gomosidade e elasticidade (FOX et al., 2002).

Não houve efeito significativo das concentrações de nisina em relação à firmeza, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade dos queijos ($P \geq 0,05$), mas houve efeito nos tempos de maturação ($P < 0,05$) (Figura 19).

No presente estudo a firmeza, a fraturabilidade, a gomosidade e mastigabilidade dos queijos aumentaram até os 45 dias de maturação (figura 19) devido provavelmente à perda de umidade por evaporação e também a intensa proteólise do queijo. Este fato contribuiu para a concentração dos constituintes

sólidos dos queijos e conseqüentemente aumento destes parâmetros do perfil de textura.

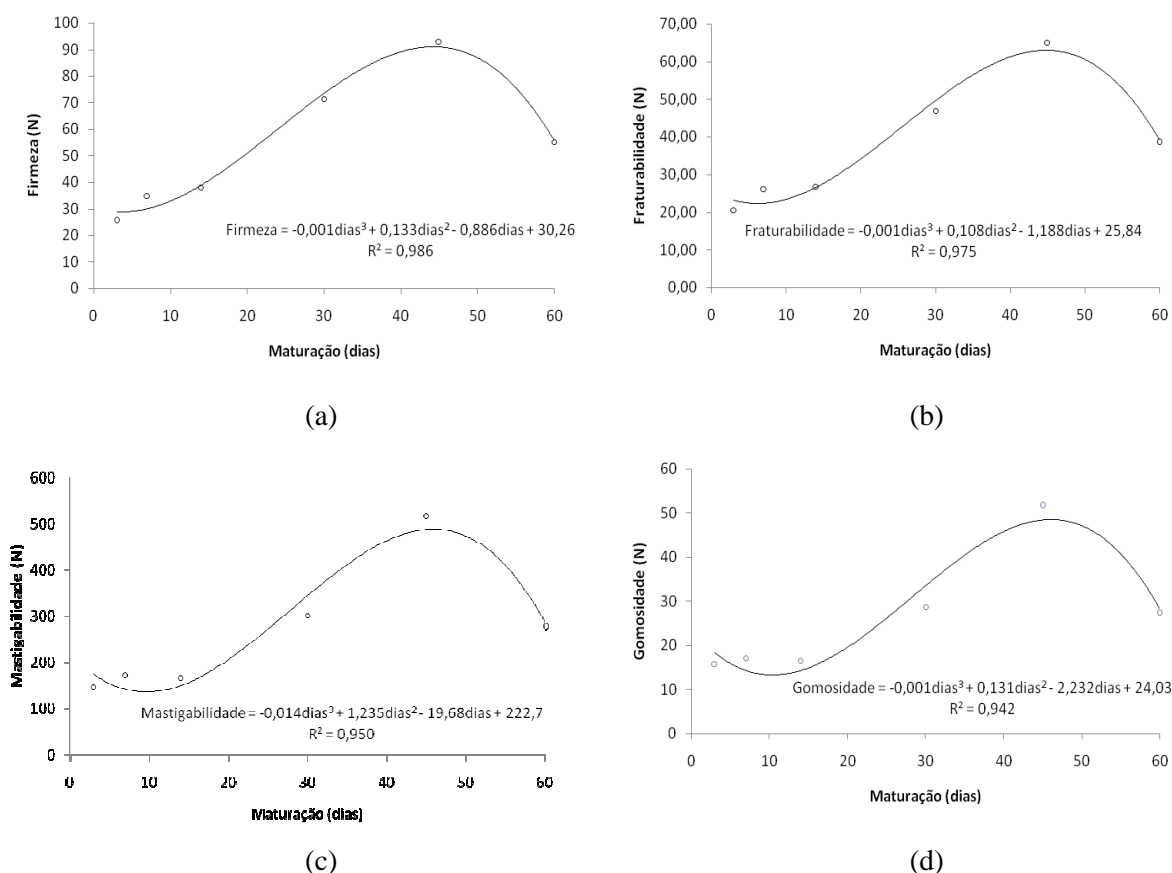


Figura 19. Média da firmeza (a), fraturabilidade (b), mastigabilidade (c) e gomosidade (d) dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina.

Resultados semelhantes ao do presente trabalho foram encontrados por Pinto et al. (2011) em queijos artesanais do Serro, com diferentes concentrações de nisina.

Em um estudo com queijo Castelmagno (BERTOLINO et al., 2011), um queijo italiano fabricado com leite cru de vaca, a firmeza aumentou até os 30 dias de maturação e se manteve constante até os 60 dias, já a gomosidade e a mastigabilidade aumentou até os 60 dias de maturação.

Awad (2006) verificou que a firmeza e a mastigabilidade do queijo Ras, um queijo egípcio, aumentou nos primeiros 60 dias de maturação e este fato ocorreu em função da redução de umidade com o tempo.

4.3.4.3. Elasticidade

A elasticidade é tendência do queijo a recuperar sua forma original e dimensões após a remoção de uma tensão aplicada (FOX et al., 2002). Houve efeito significativo do tempo e dos tratamentos ($P \geq 0,05$) em relação à variável elasticidade nos queijos artesanais de Araxá.

Tabela 28. Valores médios de elasticidade para os queijos com diferentes concentrações de nisina.

Nisina (IU.mL ⁻¹)	Elasticidade*
0	5,683 ^b
100	5,935 ^{ab}
400	6,892 ^a

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey.

Houve uma tendência de aumento da elasticidade dos queijos de acordo com o aumento da concentração de nisina (Tabela 28).

A elasticidade dos queijos artesanais com e sem nisina diminuiu até 45 dias de maturação como pode ser visualizado na Figura 20. Resultado semelhante foi encontrado por O'Mahony et al. (2005) em um estudo com queijo Cheddar. Sabe-se que a perda de umidade dos queijos e o enfraquecimento da matriz protéica devido à proteólise influenciam nas características reológicas do queijo (FOX et al., 2000) e podem ter contribuído para a perda de elasticidade dos queijos artesanais até 45 dias de maturação. Os queijos com menor concentração de nisina também foram os com menores valores de pH (Tabela 10). Queijos mais ácidos tendem ser mais quebradiços e desmineralizados (FOX et al., 2004) e conseqüentemente menos elásticos.

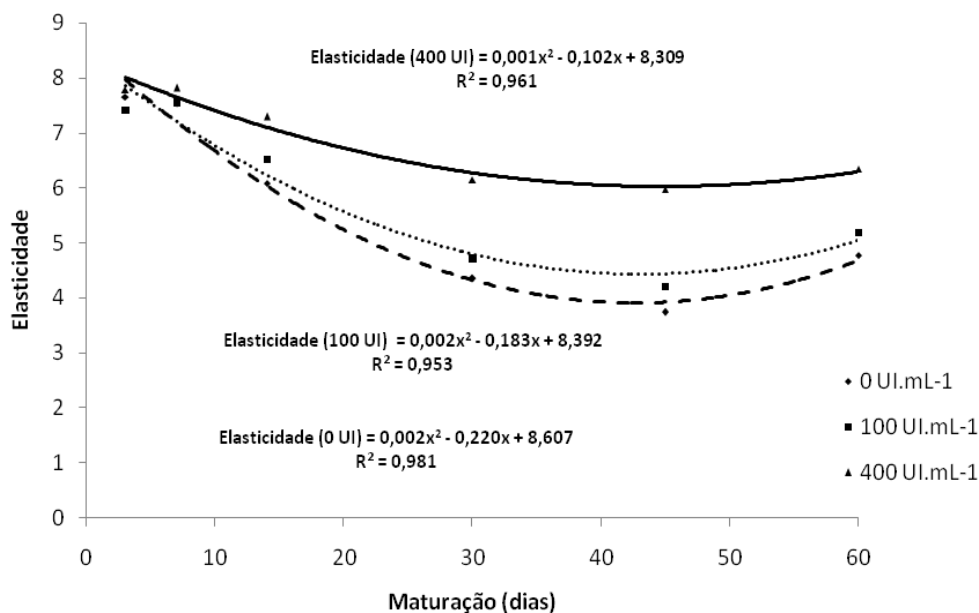


Figura 20. Elasticidade dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina: (---) 0; (....) 100 UI.mL⁻¹; e (—) 400 UI.mL⁻¹.

Resultado contrário ao do presente estudo foi encontrado por Pinto et al. (2011) em queijos artesanais do Serro com diferentes concentrações de nisina, em que houve aumento da elasticidade com o decorrer da maturação.

No queijo do Serro com nisina (PINTO et al., 2011) houve redução das bactérias lácticas em função das doses de nisina adicionadas, o que não ocorreu em Araxá, onde as bactérias lácticas foram mais resistentes à nisina. Sendo assim, a proteólise dos queijos do Serro com nisina ocorreu principalmente função do coagulante residual e com menores valores de %NS_{TCA12%}/NS (que em excesso pode diminuir a elasticidade do queijo). Este fato pode explicar a menor elasticidade dos queijos do Serro com nisina se comparados aos queijos de Araxá.

4.3.5. Efeito da nisina sobre a cor do queijo Minas artesanal da região de Araxá

A análise da cor foi feita por meio de um colorímetro Color Quest II, marca Hunterlab. A determinação foi baseada no sistema de cor CIE Lab (L*a*b*). Neste sistema, L* indica a luminosidade que varia de zero (preto) a 100 (branco); enquanto que a* e b* representam as coordenadas de cromaticidade, sendo que valores de a* positivos indicam tendência ao vermelho e valores de a* negativos tendência para o verde; b* positivos indicam tendência para o amarelo e b* negativos indicam

tendência para o azul. A cor dos queijos analisados é a combinação dos parâmetros a^* e b^* e do fator luminosidade (L^*).

Os dados do perfil da cor do presente trabalho apresentaram uma curva não-normal de distribuição, portanto, para esses resultados, adotou-se a estatística não paramétrica por meio do teste de Kruskal-Wallis (nível de 5% de probabilidade).

Para melhor compreensão dos resultados tratados, a Tabela 29 apresenta valores obtidos para a variável L^* e para as coordenadas cromáticas a^* e b^* da análise de cor dos queijos artesanais nos diferentes tempos e tratamentos.

Tabela 29. Valores obtidos para a variável L^* e para as coordenadas cromáticas a^* e b^* da avaliação da cor dos queijos artesanais com diferentes concentrações de nisina

Maturação (dias)	Nisina (IU.mL ⁻¹)	L^*	a^*	b^*
3	0	81,70	2,90	12,79
	100	80,15	2,48	12,27
	400	80,14	2,69	12,07
7	0	82,35	2,77	13,10
	100	80,93	2,51	12,66
	400	81,37	2,69	13,37
14	0	82,33	2,70	13,92
	100	79,36	2,66	14,03
	400	79,42	2,77	14,54
30	0	83,80	0,82	15,23
	100	83,49	0,65	17,55
	400	81,10	0,98	17,65
45	0	80,60	3,33	17,79
	100	75,42	2,22	14,51
	400	74,78	2,41	15,46
60	0	79,22	2,72	17,28
	100	72,89	1,94	14,24
	400	71,84	2,28	16,14

4.3.5.1. Luminosidade (L^*)

Não houve efeito significativo das concentrações de nisina em relação à luminosidade dos queijos (L^*) ($P \geq 0,05$), mas houve efeito nos tempos de maturação ($P < 0,05$). A evolução da luminosidade dos queijos está demonstrada na Figura 21.

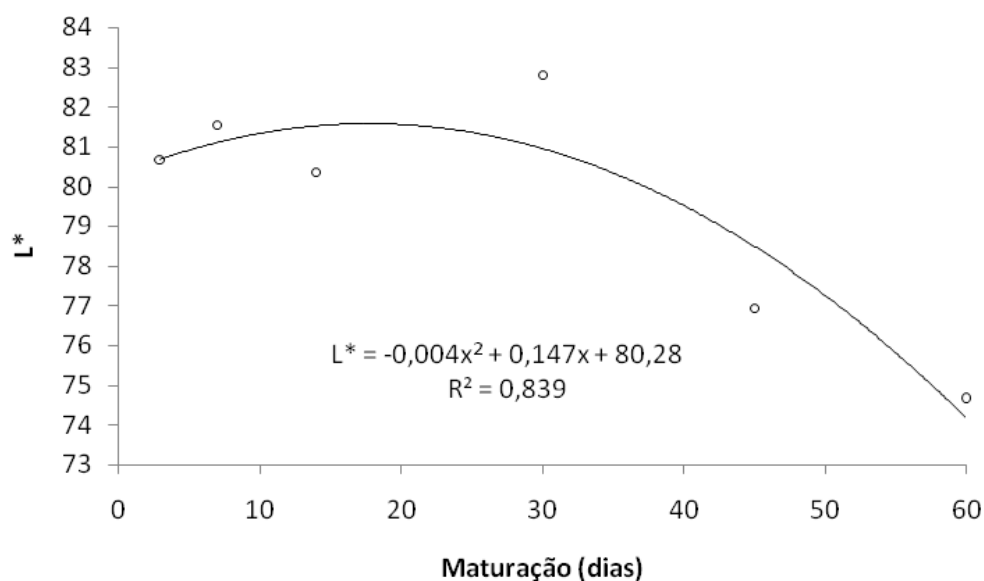


Figura 21. Média da luminosidade (L^*) dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina.

Pinto et al. (2011) não encontraram diferença significativa para queijos artesanais do Serro com e sem nisina, mas houve diferença em relação ao tempo, resultado semelhante ao do presente estudo.

4.3.5.2. Coordenada cromática a^*

O comportamento da coordenada cromática a^* dos queijos artesanais com diferentes concentrações de nisina ao longo dos 60 dias de maturação estão demonstrados na Figura 22. Houve efeito significativo das concentrações de nisina e do tempo de maturação em relação à coordenada cromática a^* dos queijos ($P < 0,05$).

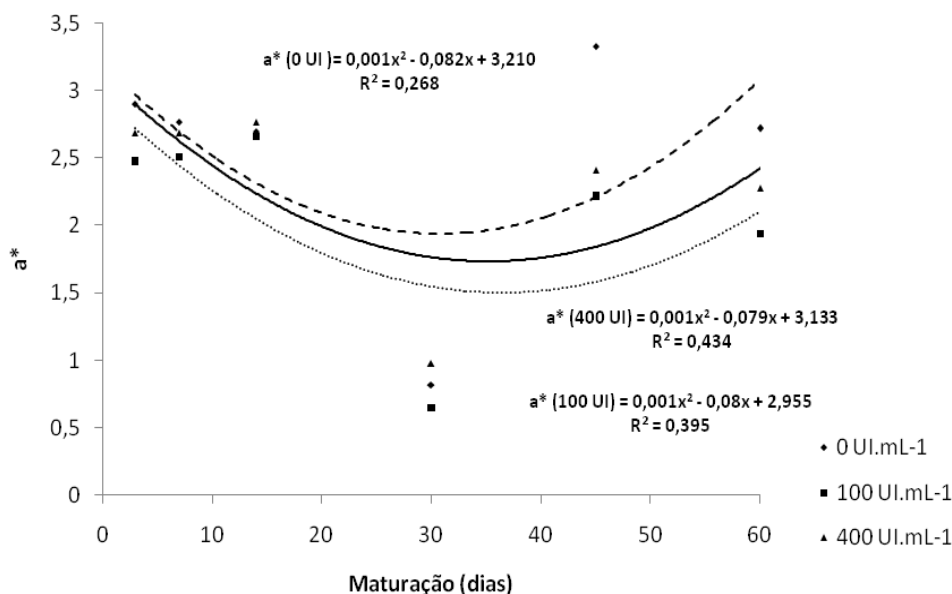


Figura 22. Coordenada cromática a^* da avaliação da cor dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina: (---) 0; (....) 100 UI.mL⁻¹; e (—) 400 UI.mL⁻¹.

Pela análise gráfica (Figura 22), verifica-se que o efeito da nisina nos queijos é mínimo e que os queijos ficaram menos vermelhos até 30 dias de maturação. A partir de 30 dias todos os queijos ficaram mais vermelhos, sendo o queijo controle, aquele que atingiu maior valor desta coordenada cromática, comparados aos queijos com 100 e 400 UI. mL⁻¹ de nisina.

Em estudo realizado em queijos artesanais com nisina (PINTO et al., 2011) foi observado que as diferentes concentrações de nisina não alteraram a coordenada cromática a^* dos queijos, mas houve alteração ao longo do tempo. Neste mesmo trabalho, a cor vermelha dos queijos aumentou gradativamente ao longo do tempo, diferindo do presente trabalho.

4.3.5.3. Coordenada cromática b^*

Pela análise de variância não houve efeito significativo das concentrações de nisina em relação à coordenada cromática b^* dos queijos (b^*) ($P \geq 0,05$), mas houve efeito nos tempos de maturação ($P < 0,05$). A evolução da cor amarela dos queijos, representada pela coordenada cromática b^* , está demonstrada na Figura 23.

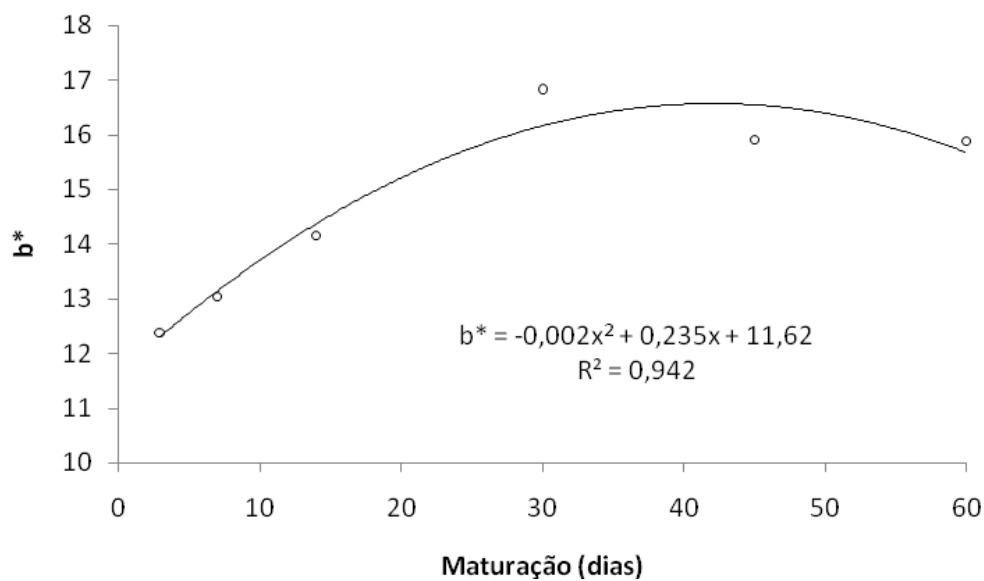


Figura 23. Média dos valores da coordenada cromática b^* na avaliação da cor dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina.

Pela Figura 23, nota-se um aumento da cor amarela dos queijos com o decorrer da maturação. Tal fato pode ocorrer devido a concentração dos constituintes sólidos ao longo do tempo, devido à perda de água do queijo por evaporação.

Pinto et al. (2011) não encontraram diferença na coordenada cromática b^* para queijos artesanais do Serro com diferentes concentrações de nisina, no entanto verificaram que a cor amarela dos queijos se intensifica com o decorrer da maturação, resultados semelhantes ao do presente estudo.

5. CONCLUSÃO

Nas condições empregadas neste experimento, a aplicação de ambas as doses de nisina escolhidas (100 UI.mL^{-1} e 400 UI.mL^{-1}) para a fabricação de queijos artesanais da região de Araxá foi eficiente na redução de *S. aureus*, ao longo do período de 60 dias de maturação. As contagens foram inferiores a 10 UFC.g^{-1} em todos os queijos com nisina ao longo de todos os tempos de análise. Este resultado corrobora a atividade bactericida da nisina em relação ao desenvolvimento de *S. aureus*, mesmo utilizando baixas concentrações de nisina como 100 UI.mL^{-1} .

Estes resultados diferem dos apresentados por (PINTO et al., 2011) em queijos artesanais do Serro, trabalho utilizado como base para o presente estudo. Pinto et al. (2011) encontrou efeito bactericida contra *S. aureus* somente nas doses de 400 e 500 UI.mL^{-1} , demonstrando que a população de *S. aureus* da região do Serro é mais resistente à nisina se comparado a da região de Araxá. Comparando-se os resultados dos dois trabalhos, é notória a evidência de que a nisina exerceu efeito diferenciado em ambas as populações de *S. aureus* (do Serro e Araxá) e que cada região deve ser estudada separadamente.

No presente estudo, a aplicação de nisina favoreceu a multiplicação de outros grupos de bactérias indesejáveis, como o grupo de Coliformes Totais e *E. coli*. Quanto maior a dose de nisina utilizada, maior foi a multiplicação destes microorganismos. A dose de 400 UI.mL^{-1} favoreceu a multiplicação de *E. coli* nos queijos artesanais, no entanto, para a dose 100 UI.mL^{-1} , as contagens de *E. coli* foram semelhantes a do queijo controle. Este fato pode ter ocorrido devido ao efeito bactericida da nisina sobre bactérias que competem pelo mesmo substrato com o grupo de coliformes totais e *E. coli*, favorecendo conseqüentemente sua multiplicação nos queijos com nisina. Portanto, para a aplicação de nisina em queijos artesanais, é necessário que as condições de higiene sejam mantidas ou até mesmo melhoradas, reduzindo a possibilidade de que outros grupos de microorganismos indesejáveis sejam favorecidos nos queijos.

Não foram encontradas enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas nos queijos artesanais, no entanto, em todas as estirpes de *S. aureus* isoladas dos queijos, se detectou algum gene que codifica para alguma enterotoxina, sendo os genes *sea* e

o *see* os mais frequentes. Isto demonstra que os queijos artesanais de Araxá possuem potencial para causar intoxicação por *S. aureus* e por isso, alguma medida deve ser tomada para o controle dos mesmos em queijos artesanais, como o uso de nisina, controle da mastite e a aplicação das Boas Práticas de Fabricação.

A nisina não influenciou o desenvolvimento de bactérias lácticas e os índices de proteólise dos queijos, apresentando resultados semelhantes ao queijo controle, este fato pode ser considerado um resultado positivo deste estudo. Nas características físico-químicas, a nisina influenciou apenas o pH, a umidade e a gordura dos queijos, no entanto, essas diferenças, apesar de significativas, não foram tão expressivas, levando em consideração que já existe grande variação na composição de queijos artesanais entre os próprios produtores e nas diferentes regiões caracterizadas.

Na textura dos queijos apenas a coesividade e a elasticidade do queijo foram influenciadas pela dose 400 UI.mL^{-1} de nisina. Na cor, a variação dos queijos artesanais com nisina foi mínima, o que demonstra a possibilidade de aplicação de nisina nos queijos artesanais da região de Araxá.

A conclusão final deste estudo é que a dose de 100 UI.mL^{-1} é a mais indicada para a utilização em queijos Minas artesanais de Araxá, pois possui o mesmo efeito bactericida da dose de 400 UI.mL^{-1} contra *S. aureus* e ainda mantém o queijo com menores contagens de coliformes totais e *E. coli* e com características mais próximas do queijo artesanal da região de Araxá sem nisina. A utilização da dose de 100 UI.mL^{-1} ainda possibilita menor custo com a compra de nisina pelo produtor de queijo, visto que a quantidade utilizada é bem reduzida.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a realização deste experimento, surgiram alguns questionamentos que poderiam servir como base para pesquisas futuras. Estas incógnitas e sugestões serão relatadas nos próximos parágrafos deste item, com o intuito de dar continuidade ao trabalho realizado.

Espera-se que os queijos artesanais da região de Araxá fabricados com o uso da nisina sejam semelhantes em sabor, aroma e textura, se comparados aos queijos artesanais fabricados sem nisina. Neste trabalho, no entanto, não foi realizado um estudo da análise sensorial dos queijos, para que os provadores pudessem identificar essas diferenças entre os queijos com e sem nisina, assunto que pode ser pesquisado em ocasiões futuras.

Outro assunto para pesquisas vindouras é a análise do resíduo de nisina no soro e no queijo, ou seja, a cifra de transição destes componentes na fabricação do queijo. Quanto de nisina adicionada ao leite fica na massa de queijo e quanto de nisina se perde no soro.

Neste estudo estudou-se a influência da nisina no desenvolvimento de bactérias lácticas no leite, na massa e no queijo, no entanto, não foi estudado o efeito do resíduo de nisina no pingo. As bactérias lácticas presentes no pingo podem ser inibidas ou não pela ação da nisina e este fato pode alterar as características dos queijos artesanais, visto que o pingo utilizado no presente estudo não possuía nenhum resíduo de nisina e pode ter direcionado a fermentação do queijo.

As doses de nisina utilizadas no teste *in vitro* do presente estudo foram de 100, 200, 400 e 500 UI.mL⁻¹ e verificou-se que a dose mais recomendada para a fabricação de queijos artesanais foi a de 100 UI.mL⁻¹. Talvez uma dose de 50 UI.mL⁻¹ pudesse trazer ainda mais benefícios para a utilização em queijos artesanais de Araxá e deveria ser estudada.

Por fim, a utilização de nisina ainda não é permitida em queijo Minas artesanal pela legislação vigente, no entanto, este estudo pode ser utilizado para o requerimento do uso desta substância, pois é uma prova científica que identifica quais alterações ocorrem nos queijos Minas artesanais da região de Araxá quando se faz a utilização de nisina.

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.

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.

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

AWAD, S. Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk. **Food Chemistry**, v. 97, p. 394-400, 2006.

ARAÚJO, R. A. B. M. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá**. 136 p., 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa-MG.

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**. Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios. Instituto de Laticínios Cândido Tostes, n. 339, v. 59, p. 93-96, Juiz de Fora, jul./ago. de 2004.

BACHMANN, H. P.; FRÖHLICH-WYDER, M. T.; JAKOB, E.; ROTH, E.; WECHSLER, D. Raw Milk cheeses. In: **Encyclopedia of dairy science**. London: Elsevier, p. 652-660, 2011.

BACHMANN, H. P.; McNULTY, D. A; McSWEENEY, P. L. H.; RÜEGG, M. Experimental Designs for studying the influence of the raw milk flora cheese characteristics: a review. **Jornal of the Society of Dairy Technology**, n. 49, p. 53-56, 1996.

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

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.

BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: CLIVER, D.O. (Ed.). *Foodborne diseases*. London: Academic, p.87-106, 1990.

BERTOLINO, M.; DOLCI, P.; GIORDANO, M.; ROLLE, L.; ZEPPA, G. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1001–1011, 2011.

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-8802. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 97, n. 5, p. 719-730, May 2004.

BONETTI, A. M.; VIEIRA, C. U.; SIQUIEROLI, A. C. S. **Amplificação de DNA**. SBG. 01.02, p. 63-65, 2006.

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 of *Staphylococcus* spp. And other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 545-550, 2006.

BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; BRANDÃO, L. R.; VIANNA, C. R.; FERREIRA, M. C.; GOMES, F. C. O.; CARMO, L. S.; HENEIDE, L. D. G.; ROSA, C. A. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.481-487, 2011.

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

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C.; Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011. Permite que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 dias. Brasília, 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** de 16/12/2011, Seção 1, página 23.

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. Brasília, 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** de 14/12/2006, Seção 1, página 8.

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, 08 de setembro de 1997. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, portaria nº 451 de 19/09/1997, **Princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos de alimentos**. Republicada no Diário Oficial n. 124-E de 02/07/1998.

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, 3977-3986, 11 de março de 1996. Seção 1.

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. do.; 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.

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. 983-989, 2008.

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.

COMA, V.; SEBTI, I.; PARDON, P.; DESCHAMPS, A.; HAM-PICHAVANT, F. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acid, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, v.64, p. 470-475, 2001.

COSTA JUNIOR, L. C. G.; COSTA, R. G. B.; MAGALHÃES, F. A. R.; VARGAS, P. I. R.; FERNANDES, A. J. M.; PEREIRA, A. S. Variações na composição do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra nas quatro estações do ano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, nº 371, v. 64, p. 13-20, 2009a.

COSTA JUNIOR, L. C. G.; COSTA, R. G. B.; MAGALHÃES, F. A. R.; VARGAS, P. I. R.; FERNANDES, A. J. M.; PEREIRA, A. S. Avaliação da proteólise de queijo artesanal de uma unidade produtora da Serra da Canastra nas quatro estações do ano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, nº 371, v. 64 ,p. 62-69, 2009b.

COTON, E.; DESMONTS, M.; LEROY, S.; COTON, M.; JAMET, E.; CHRISTIEANS, S.; DONNIO, P.; LEBERT, I.; TALON, R. Biodiversity of coagulase-negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n.2–3, p. 221-229, 2010.

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.; MASSIMO, L.; BRASCA, L.; MORANDI, S.; LODI, V.; 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 and Cellular Probes**, v.19, p. 299-305, 2005.

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.

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. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F.; NOBREGA, J. E., DOMINGO, E. C.; CHAVES, K. S.; CUNHA, L. R. Evolução da proteólise durante a maturação do queijo Minas artesanal da região da serra da Canastra. **Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios. Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 357, v. 62, p. 446-450, Juiz de Fora, jul./ago., 2007.

EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSAO RURAL DE MINAS GERAIS – EMATER-MG. **Programa Queijo Minas Artesanal/Mapa do Queijo**. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/MAPA_QUEIJO/mapa%20do%20araxá.doc>. Acesso em: 23 março 2012.

EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSAO RURAL DE MINAS GERAIS – EMATER-MG. 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. 2003a.

EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSAO RURAL DE MINAS GERAIS – EMATER-MG. **Caracterização da Microrregião de Araxá como produtora de Queijo Minas Artesanal.** Araxá. 2003b. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO_HISTORICO/caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20do%20queijo%20canastra.pdf>. Acesso em: 23 de março 2012.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus Staphylococcus.** Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 05 de maio de 2012.

FARIA, L. M.; FONSECA, L. M.; CABRAL, M. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; MACHADO, E. C. Avaliação microbiológica de queijos Minas Artesanal fresco e maturado produzido na região do Serro-MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes.** Anais do XIX Congresso Nacional de Laticínios. Instituto de Laticínios Cândido Tostes, n. 327, v. 57, p. 66-70, Juiz de Fora, jul./ago. de 2002.

FAVARO, C. F. AMAKU, A.; BALIAN, S. C.; TELLES, E. O. Determination of water activity, pH, coagulase positive *Staphylococcus* counts, total and fecal coliform counts in Minas Meia Cura sold in street markets in the southern region of the city of São Paulo. **Veterinária e zootecnia**, v.13, p.201-207, 2006.

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

FERREIRA, E. G.; FERREIRA, C. L. L. F. Implicações na madeira na identidade e segurança de queijos artesanais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 381, v. 66, p. 13-20, 2011.

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. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 5, ed. 152, art. 1021, 2011.

FITZGERALD, J. R.; MONDAY, S. R.; FOSTER, T. J.; BOHACH, G. A.; HARTIGAN, P.J.; MEANEY, W.J.; SMYTH, C. J. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 63-70, Jan. 2001.

FREITAS, M. F. L.; 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. isoladas de queijos de coalho. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v.29, p. 375-379, abr.-jun., 2009.

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. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Aspen Publishers, Inc. Gatherburg, Maryland, 544p. 2000.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: Tradição e história do povo mineiro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, n. 210, p. 33-36, 1980.

GARDINI, F.; R. TOFALOA, N. BELLETTI, L. IUCCI, G. SUZZI, S. TORRIANI, M.E. GUERZONI, R. LANCIOTTI. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. **Food Microbiology**, v. 23, p. 641-648. 2006.

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.

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.

IEPHA. Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e artístico de Minas Gerais. **Caracterização**. Disponível em: <http://www.iepha.mg.gov.br/component/content/article/16/27-caracterizacao>. Acesso em: 12 nov. 2011.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Produtores de Queijo Minas Artesanal**. 2012. Acesso em: 09/05/2012. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/680-produtores-queijo-minas-artesanal-

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Produtores de Queijo Minas Artesanal**. 2011. Acesso em: 20/10/2011. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/search/?searchword=queijo+artesanal&ordering=newest&searchphrase=all>.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Queijo Minas Artesanal possui 155 queijarias cadastradas**. 2010. Acesso em: 04/01/2011. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/acontece-no-ima/1171-queijo-minas-artesanal-possui-155-queijarias-cadastradas>.

JERRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *Cgc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 166, n. 1, p. 669-677, Jan. 2001.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6º ed. Tradução: Eduardo César Tondo...[et al]. Porto Alegre: Artmed. 711 p. 2005.

JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, F.E.; ASHTON, F.R.; 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**, v.29, p. 426–430, 1991.

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

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.

LEROY, F.; VUYST, L. D. Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 3, p. 143-149, 2010.

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**, Belfast, v. 95, n. 1, p. 38-43, Jan. 2003.

LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.266-272, 2009.

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

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; JUNIOR, F. N. P. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do serro, minas gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 24(4), p. 516-521, out.-dez., 2004.

MAGALHÃES, J.; MALTA, H. L.; FERREIRA, C. L. L. F.; YBARRA, L. M. Avaliação tecnológica de queijo tipo Minas utilizando culturas lácticas da região do Serro – MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, nº 319, v. 56, p. 32-36, 2001.

MANTOVANI, H. C., HU, H.; WOROBO, R. W.; RUSSEL, J. B. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, **Microbiology**, v. 148, p. 3347-3353, 2002.

MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULOU, E.; KANDARAKIS, I. G.; ANIFANTAKIS, E. M. Evolution

of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 153-161, 2003.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Ministério Regulamenta produção artesanal de queijo**. 2011. Acesso em: 30/04/2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2011/12/ministerio-regulamenta-producao-artesanal-de-queijo>.

MARTINS, J. M.; PINTO, M. S.; ARAÚJO, R. A. B. M.; CUNHA, L. R.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Características físico-químicas dos queijos artesanais produzidos na região de Araxá. **Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios. Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 339, v. 59, p. 317-320, Juiz de Fora, jul./ago. de 2004a.

MARTINS, J. M.; PINTO, M. S.; BARBOSA, T. S.; SILVA, T. T.; OLIVEIRA, R. C.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Características físico-químicas dos queijos artesanais produzidos na CIDADE DE Serra do Salitre. **Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios. Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 339, v. 59, p. 320-324, Juiz de Fora, jul./ago. de 2004b.

MARTINS, J. M.; PINTO, M. S.; BARBOSA, T. S.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C.; RIBEIRO JUNIOR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Características físico-químicas dos queijos artesanais produzidos na região do Serro. **Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios. Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 339, v. 59, p. 331-334, Juiz de Fora, jul./ago. de 2004c.

McAULIFFE, O.; RYAN, M. P.; ROSS, R. P.; HILL, C.; BREEUWER, P.; ABEE, T. Lacticin 3147, a broadspectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 439. 1998.

McSWEENEY, P. L. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n. 2/3, p. 127-144, 2004.

MEHROTA, 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**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, Mar. 2000.

MELLO, M. B.; SILVA, G. P. F.; SANT'ANNA, V.; JANTZEN, M. M.; MOTTA, A S. Avaliação da inativação térmica da pediocina *in vitro* e no alimento. **XIX ENPOS. II Mostra científica**. 2010.

MELO, R. N.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p. 321-338, 2005.

MENESES, J. N. C. Modos de fazer e a materialidade da cultura “imaterial”: o caso do queijo Minas Artesanal de Minas Gerais. **UNESP-FCLAS-CEDAP**, v. 5, n. 2, p. 27-41, dez., 2009.

MINAS GERAIS. Decreto 19.492 de 13 de janeiro de 2011. 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. **Minas Gerais Diário do Executivo**, pag. 1, 13 de janeiro de 2011.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria 1.022 de 03 de novembro de 2009. Identifica a microrregião do Campo das Vertentes. **Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária**, 2009. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/>>. Acesso em: 24 de dezembro de 2010.

MINAS GERAIS. 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. **Minas Gerais Diário do Executivo**, pag. 1, col. 2, 02 de agosto de 2008.

MINAS GERAIS. 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. 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.

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

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F. F. **Bacteriocinas de bactérias lácticas: utilização em laticínios e fatores que afetam a sua eficiência**. 2008. Artigo em Hipertexto. Disponível em: <[HTTP://WWW.infobios.com/Artigos/2008_3/bacteriocinas/index.htm](http://WWW.infobios.com/Artigos/2008_3/bacteriocinas/index.htm)>. Acesso em: 22/03/2011.

MORRIS, H.A; GUINNE, T.P.; FOX, P.F. Salt diffusion in cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, p. 1851-1858, 1985.

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

NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F.; DAS DORES, M. T.; FERREIRA, E. M.; DOMINGO, E. C.; SANTOS, J. P. Diferenças sazonais no fermento endógeno utilizado na produção do queijo Minas Artesanal fabricado na Serra da Canastra, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 63, n. 363, p. 26-30, 2008.

OLARTE, C.; SANZ, S.; GONZALEZ-FANDOS, E.; TORRE, P. Microbiological and physicochemical characteristics of Cameros cheese. **Food Microbiology**, v. 16, p. 615-621, 1999.

O'MAHONY, J. A.; LUCEY, J. A.; McSWEENEY, P. L. H. Chymosin-Mediated Proteolysis, Calcium Solubilization, and Texture Development During the Ripening of Cheddar Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 88, 3101-3114, 2005.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters, Amsterdam**, v. 246, n. 2, p. 191-198, May 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. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 6, p. 6088-6094, Jun. 2003.

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

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. I.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 3, p. 360-366, Mar. 2001.

PAULA, N. R. F.; SILVA, J. G.; SILVA, B. C.; ABREU, L. R.; PICOLLI, R. H. Qualidade microbiológica de queijo Minas artesanal da Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 62, n. 357, p. 52-58, 2007.

PAYNE, M.R.; MORISON, K.R. A multi-component approach to salt and water diffusion in cheese. **International Dairy Journal**, London, v.9, p. 887-894, 1999.

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.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T. R.; ARISI, A. P. M. Occurrence of *staphylococcus aureus* and multiplex pcr detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 145-148, 2009.

PIENSSENS, V.; VliegHER, S.; VERBIST, DE B.; BRAEM, G.; VAN NUFFEL, A.; DE VUYST, L.; HEYNDRIKX, M.; VAN COILLIE, E. Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative *Staphylococcus* species causing bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, v.155, n. 1, p. 62-71, 2012.

PIMENTEL FILHO, N. de J.; MANTOVANI, H. C.; CARVALHO, A F.; DIEZ-GONZALEZ, F.; VANETTI, M. C. Atividade das bacteriocinas bovina HC5 e nisina sobre *Listeria*. **Congresso ALAM (Asociación Latino Americana de Microbiología)**, D-075, Montevideo, 2010a.

PIMENTEL FILHO, N. de J.; MANTOVANI, H. C.; CARVALHO, A F.; DIEZ-GONZALEZ, F.; VANETTI, M. C. Atividade inibitória dos lantibióticos bovina HC5 e nisina sobre *Staphylococcus aureus*. **Congresso ALAM (Asociación Latino Americana de Microbiología)**, D-076, Montevideo, 2010b.

PIMENTEL FILHO, N. J. P.; MARTINS, J. M.; CUNHA, L. R.; LOPES, J. P.; FERNANDES, P. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Modulação de parâmetros microbiológicos e do pH pelo cloreto de sódio, no fermento endógeno utilizado na produção de queijo Minas artesanal do Alto do Paranaíba. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, nº 345, v. 60, jul./ago., p. 295-298, 2005.

PINTO, A. de F. M. A. **Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos**. Disponível em: <www.ipv.pt/millennium/ect4_1.htm>. Acesso em: 22 out. 2004.

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**. Food Control, v. 20, p. 1167-1170, 2009a.

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

PINTO, M. S.; PIRES, A. C. S.; SOBRAL, D., PAULA J. C. J. *Staphylococcus* sp. em alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.61, n. 352, p. 9-11, 2006.

PINTO, M. S.; MARTINS, J. M.; ARAÚJO, R. A. B. M.; PIRES, A. C. S.; DUARTE, G. K.; CUNHA, L. R.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Programa de apoio ao queijo Minas Artesanal produzido no estado de Minas Gerais. Diagnóstico sócio-econômico e cultural dos produtores e avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal da região do Serrro-MG. **Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios. Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 339, v. 59, p. 86-92, Juiz de Fora, jul./ago. de 2004.

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

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 isolated from raw and pasteurized Milk. **Veterinary Microbiology**, v. 132, 408-413, 2008.

RIBEIRO, L. M. Produtores rurais de queijos em busca de uma nova realidade. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 44, n. 261-266, p. 86-89, jan./dez, 1989.

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.

ROSA, C. M., FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Revista Científica UNINOVE**, São Paulo. V. 1, p. 09-15, 2002.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 1/2, p. 61-70, Jan./Feb. 2002.

SA, J. F. O.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B.; BADARÓ, A. C. L. Leveduras endógenas em queijo Minas artesanal. **Anais do XXVII Congresso Nacional de Laticínios**. Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 2008.

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

SANTOS, E. C. dos; GENIGEORGIS, C. Potencial for presence and growth of *Staphylococcus aureus* in brazilian Minas cheese whey. **Journal of Food Protection**, n. 3, v. 44, p. 185-188, 1981.

SEBTI, I.; COMA, V. Active edible polyssacharide coating and interactions between solution coating compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p.139-144, 2002.

SCHERRER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J. E.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 101–107, 2004.

SILVA, P. H. F. Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação. Juiz de Fora: Templo, v. 1, 124 p., 2004.

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.

SILVA, J. G.; ABREU, L. R.; FERREIRA, E. B.; MAGALHÃES; F. A. R.; PICCOLI, R. H. Perfil sensorial do queijo Minas artesanal da Canastra. . **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 62, n. 357, p. 71-76, 2007.

SILVA, J. G.; ABREU, L. R.; FERREIRA, E. B.; MAGALHÃES; F. A. R.; PICCOLI, R. H. Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. . **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 66, n. 380, p. 16-22, 2011.

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.

SOUSA, M. J.; ARDÖ, Y.; McSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 327-345, 2001.

SOUZA, C. F. V.; ROSA, T. D.; AYUB, M. A. Z. Changes in microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 34, p. 260-266, 2003.

THOMAS, L. V.; WIMPENNY, J. W. T. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **American Society for Microbiology**, 62, p. 2006-2012, 1996.

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.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Bactérias.** In: Microbiologia. 8. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

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**, São Paulo, v.17, n. 104/105, p. 218-119, jan./fev. 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.

YARWOOD, J. M.; MCCORMICK, J. K.; PAUSTIAN, M. L.; ORWIN, P. M.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity Island 3: implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. **Journal Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 13138-13147, Apr. 2002.