

Artigo Técnico**EFEITO IN-VITRO DE NISINA SOBRE POOL DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE QUEIJOS MINAS ARTESANAL DA REGIÃO DO CAMPO DAS VERTENTES-MG****In-vitro effect of nisin on *Staphylococcus aureus* pool isolates from Minas traditional cheeses from Campo das Vertentes-MG**Bruna Amaral FELÍCIO¹Marcus Welbert LEMPK²Maximiliano Soares PINTO^{3*}Igor Viana BRANDI⁴Jaqueline de Paula REZENDE⁵**RESUMO**

Queijos artesanais têm atualmente papel de destaque no cenário científico em função da sua importância social e econômica para o País. Embora legalmente o queijo só possa ser comercializado dentro do Estado, é notória a sua presença fora de Minas Gerais. Pelo fato de ser elaborado com leite cru, o queijo apresenta risco para os consumidores por ser potencial carreador de micro-organismos patogênicos como *Staphylococcus aureus*. A obrigatoriedade da utilização de leite cru implica a necessidade de estudos para diminuir consideravelmente a contaminação dos mesmos por *S. aureus*. Estudos mostraram que a adição de nisina ao processo de fabricação dos queijos podem diminuir a contaminação consideravelmente. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da adição de nisina sobre pool de *S. aureus* isolados de queijos Minas artesanais do Campo das Vertentes. Foram testadas quatro doses (100; 200; 400 e 500 UI. mL⁻¹) do preparado comercial Nisaplin® em leite autoclavado desnatado reconstituído a 10%. As análises de *S. aureus* foram feitas utilizando-se Petrifilm nos tempos zero; 3, 5, 8, 10, 12, 16, 24, 36, 48, 72 e 96 de incubação. Não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre o controle e as doses de 200 UI mL⁻¹. No entanto foi observada diferença entre as demais doses ($p < 0,05$) em relação as duas mencionadas e também entre elas próprias. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram os já realizados em outras regiões mostrando que a nisina pode ser efetiva para redução das contagens de *S. aureus* em queijos elaborados com leite cru.

Palavras-chave: leite; leite cru; antimicrobiano natural.

1 Graduada em Nutrição. Mestranda em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. E-mail: bruniamaral@hotmail.com

2 Graduado em Biologia. Mestranda em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. E-mail: marcuslempk@yahoo.com.br

3 Doutor. Professor Adjunto, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. E-mail: maxonze@yahoo.com.br

4 Doutor. Professor Adjunto, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. E-mail: ibrandi@hotmail.com

5 Estudante de Ciência e Tecnologia de Laticínios, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: jaqueline.rezende@ufv.br

* Autor para correspondência: Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. Av Universitária, n. 1000, Bairro Universitário. Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. E-mail: maxonze@yahoo.com.br

ABSTRACT

Minas traditional cheeses currently have a prominent role in the scientific depending on their social and economic importance to the country legally. Although the cheese can be marketed within the state, is notorious its presence outside of Minas Gerais. Because it is made with raw milk, the cheese has a risk for consumers to be potential carrier of pathogens such as *Listeria*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*. The use of raw milk implies the need for studies to significantly decrease their contamination by *S. aureus*. Studies have shown that the addition of nisin to cheese manufacturing process can significantly reduce the contamination. The aim of this study was to evaluate the effect of Nisin on pool *S. aureus* isolates from traditional cheeses of Campo das Vertentes. Four levels (100, 200, 400 and 500 IU. mL⁻¹) of the commercial preparation Nisaplin ® in autoclaved reconstituted skim milk at 10%. The analysis of *S. aureus* were made using 3M Petrifilm at zero; 3, 5, 8, 10, 12, 16, 24, 36, 48, 72, and 96 of incubation. There was no significant difference ($p \geq 0.05$) between control and doses of 200 IU mL⁻¹. However differences were observed between the other doses ($p < 0.05$) in the two mentioned and also among themselves. The results of this study confirm those already made elsewhere showing that nisin can be effective in reducing counts of *S. aureus* in cheeses made with raw milk.

Keywords: milk; raw milk; natural antimicrobial.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os queijos artesanais têm sido objeto de pesquisa dada a sua importância econômica e social para as regiões onde são produzidos. 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. No entanto, não existe tecnologia disponível para fabricação e comercialização de queijos elaborados a partir de leite cru, que garanta a segurança do consumidor. De fato, vários produtores tradicionais europeus substituíram o processo artesanal por um semi-artesanal, objetivando atingir qualidade microbiológica desejável. Além disto, se o queijo artesanal deve continuar a ser produzido em virtude de suas características sensoriais únicas, ele não pode continuar sendo comercializado informalmente antes de atingir, no mínimo, uma semana de maturação.

Em trabalhos conduzidos por Martins, 2006 e Dore, 2007 queijos Minas artesanais maturados sob condições específicas apresentaram contagens microbiológicas abaixo daquelas preconizadas pela legislação antes de período de 60 dias de maturação (MINAS GERAIS, 2011). Entretanto não se pode concluir que tal fato seja regra já que nos trabalhos supracitados não houve amostragem representativa de produtores. Além disso, estudo conduzido por Pinto et al. (2011) mostrou que nas mesmas condições de maturação o queijo não se tornou seguro para consumo.

Resultados publicados até o momento mostram que o queijo apresenta altas contagens de *Escherichia coli* e *S. aureus* (CERQUEIRA et al. 1997; BORELLI, 2002; FARIA, 2003; PINTO, 2004; ORNELAS, 2005; BORELLI, 2006). No entanto, a ausência de enterotoxinas em queijos coletados diretamente nas unidades produtoras do Serro ainda não pode ser explicada.

A alta contagem de bactérias do grupo coliformes está associada às condições precárias de higiene e do processamento. Os altos números de *Staphylococcus* podem estar associados, além das razões anteriores, à manipulação inadequada e ao alto índice de mastite. A ideia de que controlando estes fatores seja possível a elaboração do queijo Minas artesanal com uma contagem de *S. aureus* e *E. coli*, que atendam à legislação vigente, não se mostra sustentável, uma vez que queijos de produtores cadastrados pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) apresentam altas contagens de *Staphylococcus*.

Estudos evidenciam que países da Europa, onde o leite possui qualidade microbiológica superior daquela encontrada no Brasil, não conseguiram produzir queijos com contagens aceitáveis de *Staphylococcus*. O que tem sido feito nestes países é um controle de enterotoxinas estafilocócicas. Este procedimento não se sustenta, uma vez que, não há estudos que comprovem que a ausência de enterotoxinas no produto final não vai se estender por toda a vida de prateleira do queijo.

No último ano foram realizadas duas pesquisas com queijos Minas artesanais de Araxá e Canastra relacionadas a inibição de *S. aureus* pela adição de nisin (SOBRAL, 2012; TEODORO, 2012). Os resultados mostraram a eficiência deste antimicrobiano frente as contagens de *S. aureus* e foram similares aos obtidos por Pinto (2011). A Portaria nº 29 de 22 de janeiro de 1996 determina o uso de 12,5 mg/kg de nisin para queijos pasteurizados (ANVISA, 1996). Em queijo Minas artesanal a utilização dessa substância não é permitida.

Recentemente todas as regiões de Minas Gerais foram consideradas como produtoras tradicionais de queijos Minas artesanais. O campo das vertentes é reconhecidamente uma tradicional região produtora de queijos (MINAS GERAIS, 2011). No entanto em função de entrar tardiamente no circuito não há

ainda trabalhos substanciais envolvendo os queijos ali produzidos. Após a inclusão desta região na Lei 14.185/2002, despertou-se maior interesse em pesquisas nos queijos. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da adição de diferentes doses de nisina sobre as contagens de um pool de *S. aureus* isolados de queijos Minas artesanais produzidos na região do Campo das Vertentes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado o preparado comercial contendo Nisaplin® Antimicrobial (Danisco Ind. e Com. Ltda. Cotia-SP-Brasil). O preparado comercial foi adicionado diretamente ao leite, até as concentrações desejadas, como indica o fabricante para os testes in vitro e in loco.

Foram adicionadas quantidades de nisina em tubos de vidro com tampas rosqueáveis contendo 200 mL de LDR 10 % nas concentrações de 100, 200, 400 e 500 IU/mL de nisina, sendo que 1 µg de nisaplin é equivalente a 1 IU. As amostras foram homogeneizadas e transferidas em porções de 15 mL para tubos com tampas rosqueáveis estéreis. Imediatamente após adição de nisina foram inoculadas, em duplicata, quantidades de cultura de *S. aureus* para que a concentração atingisse, aproximadamente, 10^6 UFC.mL⁻¹. Após adição de nisina, as amostras provenientes de todos os tratamentos foram plaqueadas nos tempos 0, 3, 5, 8, 10, 12, 16, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de incubação. O controle foi feito sem a presença de nisina.

As culturas de *S. aureus* presente nos queijos foram plaqueadas em Agar Baird Parker adicionado de telurito de potássio. As colônias típicas foram submetidas ao teste da coagulase e posteriormente confirmou-se a termonuclease positiva utilizando-se Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) Count Plate (AOAC 981.15). Ao final selecionou-se 10 culturas de *S. aureus* provenientes de dois queijos de um mesmo produtor e de quatro queijos adquiridos no comércio local do município de São João Del Rei – MG pertencente a microrregião do Campo das Vertentes-MG.

O experimento foi conduzido com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, sendo o tempo e as concentrações de nisina os fatores estudados. Os logaritmos do número de UFC.g⁻¹ foram analisados por meio de regressão linear. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS) – versão 9.1. Para análise de regressão foram aceitos os modelos que apresentaram nível de significância igual ou menor que 5 % para modelo quadrático.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito de diferentes concentrações de nisina, adicionada ao LDR sobre *S. aureus* está apresentado

na Figura 1. Não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre o controle e as doses de 100 e 200 IU mL⁻¹. No entanto foi observada diferença entre as demais doses ($p < 0,05$) em relação às duas mencionadas e também entre elas próprias.

Observou-se redução similar a observada no controle quando no tratamento com a dose de 100 IU. mL⁻¹. Foi observado também, efeito bactericida sobre *S. aureus* quando foram utilizadas as doses 200; 400 e 500 IU. mL⁻¹ nas primeiras horas de incubação. Esse efeito foi diretamente proporcional às doses utilizadas. Somente após aproximadamente 10 h de incubação é que as contagens de *S. aureus* da dose de 200 IU.mL⁻¹ retornaram ao patamar inicial de 10^6 UFC. mL⁻¹, já a dose de 400 IU.mL⁻¹ o tempo para recuperação foi de aproximadamente 40h após a incubação. Durante as 96 horas as contagens de *S. aureus* da dose de 500 IU. mL⁻¹ não conseguiram atingir a população inicial. Estes resultados mostram que a utilização da nisina pode retardar a multiplicação de *S. aureus* sob as condições estudadas. Nota-se que as doses de 400 e 500 IU. mL⁻¹ podem ser efetivas para praticamente eliminar *S. aureus* se a contaminação inicial for baixa.

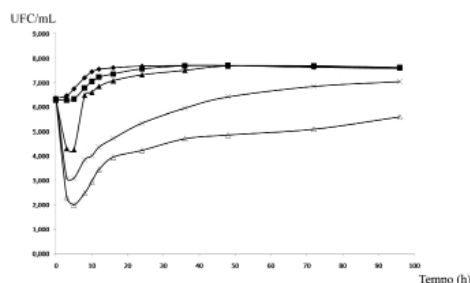


Figura 1 – Efeito de diferentes doses de nisina em LDR 12 % sobre *S. aureus*: (♦) 0, (■) 100 IU.mL⁻¹; (▲) 200 IU.mL⁻¹; (x) 400 IU.mL⁻¹; e (Δ) 500 IU.mL⁻¹.

A duração da fase estacionária de *S. aureus* no controle e nas doses de 100; 200 IU.mL⁻¹ apresentaram períodos similares enquanto que nas duas maiores doses há indícios de que a fase Log não terminou após 96h de incubação. Estes resultados diferem daqueles apresentados por Pinto (2011) no qual houve diferença entre os comportamentos de *S. aureus* nas doses de 100 e 200 IU. mL⁻¹ em relação ao controle e também as demais doses. Nota-se, no entanto que no trabalho supracitado as contagens iniciais de *S. aureus* foram de 104 UFC. mL⁻¹ e foi utilizada uma estirpe ATCC.

Outros estudos com queijos Minas artesanais de Araxá e da Canastra utilizando-se pool de *S. aureus* endógenos, apresentaram algumas diferenças em relação à eficiência da nisina (SOBRAL, 2012; TEODORO, 2012). Essas diferenças podem ser atribuídas às diferentes estirpes de *S. aureus* utilizadas nos experimentos. No entanto todos os resultados

mostraram que a nisina foi efetiva na redução das contagens de *S. aureus* em função do tempo em leite e também no queijo, o que não foi feito ainda na microrregião do Campo das Vertentes.

Estudos mostram que a efetividade de nisina diminui em função do aumento do tamanho da população do micro-organismo-alvo (RAYMAN et al., 1981; SCOTT; TAYLOR, 1981). Tal fato pode ser uma das explicações para o aumento da população de *S. aureus* após 24 horas em todos os tratamentos. Várias pesquisas relatam o uso de nisina na conservação de leite fluido. Takahashi et al. (2003) verificaram que 400 IU.mL⁻¹ de nisina inibiram 26,2 % da cultura de *S. aureus* FRI-196E.

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

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

Wirjantoro; Lewis (1996) verificaram aumento da vida de prateleira de leite com 40 IU. mL⁻¹ de nisina. Em estudo anterior, Fowler e Gasson (1991) relataram a extensão da vida de prateleira de leite pasteurizado integral por mais de 6 dias, com a adição de 20 a 400 IU. mL⁻¹ de nisina. Wajid e Kalra (1976) reportaram a validade de 60 dias em leite de vaca esterilizado adicionado de 30 a 50 IU. mL⁻¹ nisina em comparação a validade de 3 a 7 dias do leite sem nisina.

4 CONCLUSÃO

A adição de nisina ao processo de fabricação de queijos Minas artesanais é proibida. No entanto é passível de questionamentos. A nisina é um composto já utilizado pela indústria de laticínios, é natural e geralmente reconhecido como sendo seguro (GRAS). Além disso, estudos mostram que o seu efeito sobre os perfis de textura e físico-químicos são mínimos durante a maturação. O mercado dá preferência aos queijos frescos e nesse caso não existe diferença entre os queijos elaborados com e sem nisina. A disponibilidade de queijos Minas artesanais frescos a partir de leite cru, obtido de vacas sadias e elaborados com boas práticas de fabricação torna-se alternativa de pesquisa para a produção de queijos de melhor qualidade microbiológica.

Sugere-se a continuidade de estudos no Campo das Vertentes para a certificação de que a nisina tem efeito sobre *S. aureus* no queijo tal como já foi realizado nas regiões de Araxá, Canastra e Serro.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARQUÉS, J. L. et al. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. **Food Control**, Oxford, v. 22, n.3/4, p. 457-461. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Portaria nº 29 de 22 de janeiro de 1996. Aprova a extensão de uso da NISINA com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/kg. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 jan. 1996.

BORELLI, B. M. **Quantificação dos indicadores higiênico-sanitários e da diversidade de leveduras durante a fabricação do queijo Minas curado da Serra da Canastra-MG**. 2002. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

_____; et al. Enterotoxigenic of *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.37, n. 4, p. 545-550, 2006.

CERQUEIRA, M. M. O. P. et al. Frequência de *Listeria* sp e de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 52, n. 299, p. 17-20, 1997.

DORES, M. T. de. **Queijo Minas artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração**. 2007. 91 f. Dissertação. (Mestrado em Ciência e tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

FARIA, L. M. **Perfil microbiológico do queijo Minas fresco e após maturação de 30 e 60 dias em câmara fria produzido a partir de leite cru na região do Serro em Minas Gerais**. 2003. 43 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

FOWLER, G. G.; GASSON, M. J. Antibiotics - nisin. In: RUSSELL, N. J.; GOULD, G. W. (Ed.). **Food preservatives**. London, UK: Blackie Academic and Professional, 1991. p. 135-153.

GARCÍA, P. et al. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n.3, p. 151–155. 2010.

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

MINAS GERAIS (Estado). Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto no 42.645, de 5 de junho de 2002. Regulamento da Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, alterada pela Lei 19.492 de 13 de janeiro de 2011. Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas Artesanal. **Diário do Executivo**, 6 jun. 2011.

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.

PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal do Serro**. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

_____; et al. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 21, n.2, p. 90-96, 2011.

RAYMAN, M. K. et al. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. **Applied and Environmental Microbiology**,

Washington, v. 41, n.2, p. 375-380, 1981.

SCOTT, V. N.; TAYLOR, S. L. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, n.1, p. 117-120, 1981.

SOBRAL, D. **Efeito da nisina na contagem de *Staphylococcus aureus* e nas características do queijo Minas artesanal da região de Araxá – MG**. 2012. 100f. Tese. (Doutorado em Ciência e tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

TAKAHASHI, H. T. et al. Aplicação da nisina em leite cru para inibição de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, n.333, p. 78-84, 2003.

TEODORO, V. A. M. **Efeito da nisina na multiplicação de *Staphylococcus aureus* e nas características físico-químicas, reológicas e microbiológicas do queijo Minas artesanal da serra da Canastra – MG**. 2012. 122f. Tese. (Doutorado em Ciência e tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

WAJID, H. R. A.; KALRA, M. S. Nisin as an aid for extending shelf life of sterilized milk. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 13, n.1, p. 6-8, 1976.

WIRJANTORO, T. I.; LEWIS, M. J. Effect of nisin and high temperature pasteurization on the shelf life of whole milk. **Journal of Society of Dairy Technology**, Wembley, v. 49, n.4, p. 99-102, 1996.