



**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, pH E NISINA
NO CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus*
EM RICOTA CREMOSA**

ANA CRISTINA RIBEIRO

2002



1943

54739
MFND46637

ANA CRISTINA RIBEIRO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, pH E NISINA NO CRESCIMENTO
DE *Staphylococcus aureus* EM RICOTA CREMOSA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Prof. Dr^a. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle

**LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2002**



Ribeiro, Ana Cristina

**Influência da temperatura, pH e nisina no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa / Ana Cristina Ribeiro. – Lavras : UFLA, 2002.
69 p. : il.**

**Orientadora: Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.**

**1. Queijo. 2. Ricota. 3. *Staphylococcus*. 4. Temperatura.
5. pH. 6. Nisina. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-637.3
-637.353**

ANA CRISTINA RIBEIRO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, pH E NISINA NO CRESCIMENTO
DE *Staphylococcus aureus* EM RICOTA CREMOSA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 14 de outubro de 2002

Prof. Fabiana Queiroz Ferrua **UFLA**

Prof. Luiz Ronaldo de Abreu **UFLA**

Prof. Henrique Cesar Pereira Figueiredo **UFLA**

Roberta H. P. do Valle

Prof. Dr. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

Dedicatória

À minha mãe (meu anjo), luz que iluminou meu caminho para que eu concluísse mais uma etapa de minha vida, sempre guiando meus passos nos momentos mais difíceis. Sem sua força talvez não teria realizado mais um sonho.

"Não desistam quando ainda são capazes de um esforço a mais. Nada termina até o momento em que se deixa de Tentar."

**Ofereço a
Fabrício Ribeiro de Castro**

Agradecimentos

À Deus, por ouvir minhas preces e estar sempre ao meu lado.

À Profª. Drª. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle, pela orientação, atenção e incentivo na realização deste trabalho e por quem tenho grande admiração.

À CNPq, pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

À Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande (CAARG), pela oportunidade da realização das produções deste experimento.

Aos funcionários da CAARG, obrigada pela ajuda (valeu!).

À FUNARBE-UFV (Fundação Arthur Bernardes – Universidade Federal de Viçosa), pela cooperação, mesmo que indiretamente, com este projeto.

À FUNED (Fundação Ezequiel Dias), pelo fornecimento da cepa utilizada neste experimento, e de fundamental importância.

Ao departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA (Universidade Federal de Lavras), pela boa convivência e oportunidade de realizar minha pesquisa.

Ao Profª. Dr. Luiz Ronaldo, pelos ensinamentos, opiniões e incentivo.

À Profª. Drª. Fabiana, pelo apoio quando mais precisei.

Ao Profª. Dr. Henrique, pelas importantes considerações.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Simone, Cleube, Flávia, Arthur, Cláudia, Carol, Carolina V. e Márcio, pelo grande apoio e também boas risadas.

À minha amiga Stella, pela grande ajuda e por me ouvir sempre que precisei.

À minha amiga Marlúcia (minha futura vizinha), Maluquinha obrigada pelos puxões de orelha e por me dizer sempre palavras tão iluminadas.

À minha amiga Simone, por ouvir minhas lamentações tantas vezes e por ser esta pessoa tão prestativa, obrigada por tudo.

À minha amiga Jupys, as verdadeiras amizades duram para sempre e voltam muitas vezes com mais intensidade, obrigada pela força nesta reta final e muita sorte, conte sempre comigo.

À minha amiga Val, por estar presente e me ajudando nesta reta final, conte sempre comigo.

Às minhas amigas de República (Vivy e Tia Neiva) minhas irmãzinhas, obrigada por estarem sempre ao meu lado.

À meu pai, minhas irmãs (Patty e Dedeia), minha sobrinha (Maria Luíza) e minha tia Márcia, Larissa e Giovanna, obrigada pelas preocupações. Amo muito todos vocês.

Aos meus familiares que torceram por mim e suportaram minha ausência.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a alcançar este objetivo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E QUADROS.....	i
RESUMO GERAL.....	iii
GENERAL ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Importância da ricota como alimento.....	03
2.2 Fatores que interferem no crescimento microbiano em alimentos.....	05
2.2.1 Temperatura.....	07
2.2.2 pH.....	08
2.2.3 Atividade de água (aw).....	09
2.3 Staphylococcus aureus e sua importância na saúde pública.....	10
2.3.1 Enterotoxinas estafilocócicas.....	14
2.4 Aspectos gerais sobre a nisina.....	17
2.4.1 Estrutura química da nisina.....	17
2.4.2 Propriedades físico-químicas e bioquímicas da nisina.....	19
2.4.3 Espectro de Atividade.....	21
2.4.4 Mecanismos de ação antimicrobiana da nisina.....	23
2.4.5 Fatores que interferem na eficiência da nisina.....	23
2.4.6 Toxicidade da nisina.....	27

2.4.7 Emprego da nisina em alimentos	27
2.4.7.1 Alimentos crus.....	28
2.4.7.2 Alimentos pasteurizados.....	28
2.4.7.3 Alimentos esterilizados.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Microorganismo e padronização do inóculo	30
3.2 Condução do Experimento	30
3.3 Fabricação da ricota cremosa	34
3.4 Métodos e Análises	36
3.4.1 Controle microbiológico da ricota cremosa	36
3.4.1.1 Preparo da amostra	36
3.4.1.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais.....	36
3.4.1.3 Enumeração de estafilococos produtores e não produtores de coagulase.....	37
3.4.1.4 Enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos	7
3.4.2 pH da ricota cremosa	37
3.4.3 Acondicionamento da amostras	38
3.4.4 Adição de nisina comercial	38
3.4.5 Inoculação de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
3.4.6 Temperatura de armazenamento	39
3.4.7 Curva de crescimento	39
3.4.7.1 Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i>	39

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Controle microbiológico	41
4.2 Influência da nisina no crescimento de staphylococcus aureus em ricota cremosa.....	42
4.3 Efeito do ph da ricota cremosa no crescimento de staphylococcus aureus	48
4.4 Influência da temperatura no crescimento de staphylococcus aureus em ricota cremosa	52
4.5 Aspecto geral da ricota cremosa no decorrer do armazenamento	56
5 CONCLUSÕES	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

QUADRO 1 Composição média esperada da ricota padrão fabricada a partir de leite bovino.....	3
FIGURA 1 Curva de crescimento microbiano	7
FIGURA 2 Modo de ação dos ácidos orgânicos	9
FIGURA 3 Estrutura primária da nisina	18
FIGURA 4 Esquema da ação da nisina em células vegetativas.....	24
QUADRO 2 Tratamentos aplicados a ricota cremosa em cada repetição do experimento	31
FIGURA 5 Fluxograma do experimento	33
FIGURA 6 Fluxograma de fabricação da ricota cremosa	34
QUADRO 3 Resultados do controle microbiológico da ricota cremosa	42
FIGURA 7 Efeito da nisina no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em ricota cremosa, nos 3 níveis de pH a temperatura de 25 °C	44
FIGURA 8 Efeito da nisina no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em ricota cremosa, nos 3 níveis de pH a temperatura de 14 °C	45
FIGURA 9 Efeito da nisina no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em ricota cremosa, nos 3 níveis de pH a temperatura de 7 °C	46
FIGURA 10 Efeito do pH no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em ricota cremosa, a temperatura de 25 °C	49
FIGURA 11 Efeito do pH no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em ricota cremosa, a temperatura de 14 °C	50

FIGURA 12 Efeito do pH no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em ricota cremosa, a temperatura de 7 °C.....	51
FIGURA 13 Efeito da temperatura no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em ricota cremosa submetida a diferentes níveis de nisina em pH 5,5.....	53
FIGURA 14 Efeito da temperatura no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em ricota cremosa submetida a diferentes níveis de nisina em pH 5,0.....	54
FIGURA 15 Efeito da temperatura no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em ricota cremosa submetida a diferentes níveis de nisina em pH 4,5.....	55

RESUMO GERAL

RIBEIRO, Ana Cristina **Influência da Temperatura, pH e Nisina no Crescimento de *Staphylococcus Aureus* em Ricota Cremosa.** Lavras: UFLA, 2002. 69p. (Dissertação-Mestrado em Ciência dos Alimentos)¹

O *Staphylococcus aureus* continua sendo uma das principais causas de intoxicações alimentares no mundo todo, sendo incriminados diversos tipos de alimentos, dentre estes os produtos lácteos. Para prevenir o crescimento microbiano e desenvolver processos de tratamento adequados, torna-se importante o estudo dos fatores que interferem neste crescimento no alimento, limitando o risco potencial e permitindo a obtenção de alimentos mais seguros. Buscou-se, desta maneira, avaliar o efeito da nisina, pH e temperatura de armazenamento de queijos tipo Ricota Cremosa no crescimento do patógeno *Staphylococcus aureus*. Para a condução deste experimento, a ricota, produzida sob condições higiênicas, foi inoculada com *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina A (SEA) a 10^3 UFC/g de Ricota cremosa. As ricotas receberam como tratamento 3 níveis de pH (5,5; 5,0 e 4,5); 2 de nisina, sendo um o controle (0g de nisina/ kg de ricota) e o outro com 0,1g de nisina/kg de ricota; e 3 temperaturas de armazenamento, 7, 14 e 25 °C, sendo analisadas por um período de 20 dias. Durante este período, observando as curvas de crescimento obtidas, demonstrou-se que a nisina comercial, na concentração utilizada, não foi eficaz. Em pH de 4,5 levou a um declínio acentuado da curva de crescimento (morte celular), principalmente nas temperaturas 7 e 14 °C. A 25 °C, com pH 4,5, o tempo da fase log aumentou em 2 a 3 dias. O efeito inibidor do ácido láctico teve grande importância, sem, no entanto, colaborar no efeito da nisina. A temperatura de 7 °C apresentou os melhores resultados na inibição do crescimento do microrganismo estudado, levando-se a reforçar que temperaturas de refrigeração ainda são consideradas a principal arma contra o crescimento microbiano, principalmente com o advento da cadeia de frio.

¹ Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle - UFLA

GENERAL ABSTRACT

RIBEIRO, Ana Cristina **Influence of the Temperature, pH and Nisin in the *Staphylococcus Aureus* Growth in Creamy Ricotta.** Lavras: UFLA, 2002. 69p. (Dissertation –Master Program in Food Science)¹.

Staphylococcus aureus continues to be one of the main causes of food poisonings in the world, being incriminated in diverse types of foods amongst these the dairy products. To prevent the microbial growth and to develop adequate treatment processes, the study of these factors becomes important to intervene with this growth in the food, limiting the potential risk and permitting safer food attainment. Research was carried out, in this way, to evaluate the effect of the nisin, pH and storage temperature of creamy ricotta type cheeses in the growth of the pathogen *Staphylococcus aureus*. To carried out this experiment, ricotta, produced under hygienic conditions, was inoculated with producing *Staphylococcus aureus* of enterotoxin A (SEA- staphylococcal enterotoxin A), at 10^3 UFC/g creamy Ricotta. The Ricotta had received as treatment 3 levels of pH (5,5; 5,0 and 4,5); 2 of nisin, one being the control (0g of nisin/kg) and the other with 1 g of nisin/10kg of ricotta; and 3 storage temperatures, 7 °C, 14 °C and 25 °C, were analyzed for a period of 20 days. During this period, observing the growth curves, obtained demonstrated that the commercial nisin, used in the concentration, was not efficient. A pH of 4,5 led to an accented decline in the growth curve (cellular death), mainly at 7 °C and 14 °C. At 25 °C, with pH 4,5, the time of the phase log increased in 2 to 3 days. The inhibiting effect of the latic acid had great importance, without, however, collaborating in the effect of the nisin. Temperature of 7 °C presented the best results in the inhibition of the growth of the studied microorganisms, reaffirming that refrigeration temperatures are still considered the main weapon against the microbial growth, mainly with the advent of the cold chain.

¹ Adviser: Prof^ª. Dr^ª. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A demanda cada vez mais crescente dos consumidores por alimentos convenientes, frescos, naturais, semi processados e com menor quantidade de conservantes e aditivos muitas vezes resulta na obtenção de produtos com reduzida vida de prateleira.

Devido à globalização, à entrada do Brasil no Mercosul e ao Código de Defesa do Consumidor, amplamente divulgados por emissoras públicas, os cuidados e preocupações referentes à qualidade microbiológica dos alimentos têm aumentado, principalmente para atenderem às exigências do mercado, de consumidores mais conscientes e aos órgãos de fiscalização com o intuito de evitar problemas de saúde pública. Porém, somente algumas empresas estão implantando sistemas mais eficazes de controle de qualidade do tipo APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) e BMF (Boas Práticas de Fabricação); nas demais, o controle ainda é incipiente ou quase inexistente, cabendo à população e aos órgãos de fiscalização exigir melhores condições higiênico-sanitárias dos produtos.

O tratamento térmico ainda é a técnica de conservação mais empregada nos alimentos. Entretanto, o interesse em técnicas alternativas, não térmicas, que possam ser aplicadas comercialmente com o mesmo objetivo, tem despertado a atenção para aditivos como as bacteriocinas, sendo a nisina uma delas.

A nisina é produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, sendo classificada como GRAS ("Generally Recognized as Safe") e aprovada como aditivo alimentar pela FDA (Food and Drugs Administration). No Brasil, seu uso é permitido em todos os tipos de queijos, inclusive os processados, como a ricota cremosa, na dose máxima de 12,5 mg/kg. Essa bacteriocina apresenta atividade antimicrobiana contra amplo espectro de microrganismos Gram positivos, incluindo o patógeno *Staphylococcus aureus*.

O *Staphylococcus aureus* continua sendo uma das principais causas de toxinoses alimentares no mundo todo, sendo incriminados diversos tipos de alimentos, dentre estes os produtos lácteos. A intoxicação causada pela toxina de *Staphylococcus aureus* veiculada por queijos tem recebido especial interesse pelas autoridades sanitárias de muitos países, inclusive no Brasil, onde a pasteurização do leite freqüentemente não é feita e nem sempre são respeitados os padrões sanitários para os produtos lácteos.

As condições favoráveis para o seu crescimento e, em consequência, para a produção da toxina, variam de acordo com o tipo de alimento, sendo que, quanto mais nutritivo seja, mais amplo será o intervalo de temperatura, pH e atividade de água em que o *Staphylococcus aureus* poderá crescer.

Para prevenir o crescimento microbiano e desenvolver processos de tratamento adequados, torna-se importante o estudo dos fatores que interferem neste crescimento no alimento, para que a sua manipulação possa limitar o risco potencial, permitindo a obtenção de alimentos mais seguros.

De acordo com o exposto, o objetivo da pesquisa é avaliar o efeito da nisina, pH e da temperatura de armazenamento de queijos tipo Ricota Cremosa no crescimento do patógeno *Staphylococcus aureus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da ricota como alimento

A ricota é um queijo de origem italiana fabricado em diversos países sob várias denominações. É conhecida também por queijo de albumina, por se constituir basicamente desta e de lactoglobulina, que são os principais componentes protéicos do soro e não são coaguláveis pelo coalho. São proteínas facilmente desnaturadas e precipitadas pelo calor, sob a influência de acidificação, o que constitui o princípio básico da fabricação da ricota (Furtado, 1994).

A massa da ricota é obtida através da acidificação do soro de queijo, adicionado ou não de 10% de leite integral, após seu aquecimento a aproximadamente 92°C. O rendimento médio da fabricação é de cerca de 4 a 6%, sendo um produto de pouca durabilidade, e portanto considerado queijo fresco. A composição média da ricota pode ser observada no Quadro 1.

QUADRO 1 Composição média esperada da ricota padrão fabricada a partir de leite bovino.

Umidade	70 a 73%
Proteínas	8,0 a 12,0%
Gordura	4 a 8 %
Colesterol	57 mg/ 100g
pH	4,9 a 5,3
Calorias	136 a 146 kcal

Fonte: Marchisio et al, 1999.

Segundo Furtado (1994), alguns pontos críticos são observados na fabricação de Ricota:

- A quantidade de ácido a adicionar pode variar em função da acidez e pH do soro utilizado, temperatura e intensidade de agitação.
- O emprego de vapor direto no aquecimento do soro, facilita a formação da camada de ricota na superfície do soro. Isto ocorre devido a oclusão de ar nos flocos formados pela desnaturação protéica, influenciada pelo borbulhar do vapor no fundo do tanque.
- O pH final é crítico, por afetar a propriedade da ricota de flocular à superfície ou precipitar para o fundo do tanque.
- Este pH pode variar de um processo para outro e deve ser determinado na prática, e está diretamente relacionado ao tipo e a quantidade de ácido empregado.

O processo de elevação da temperatura do soro ou mistura favorece a obtenção de uma massa com baixa contagem microbiana. Contudo, após sua obtenção, esta massa fica exposta a inúmeros pontos de contaminação principalmente por ser excessivamente manipulada.

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos, ABIQ (2000), nos últimos cinco anos a produção de ricota aumentou em torno de 35%, números referentes apenas a estabelecimentos sob inspeção federal.

Pelo seu baixo teor de gordura, alta digestibilidade e ausência de sal, a ricota é considerada um produto leve e dietético, mundialmente consumido em muitas dietas alimentares.

Às vezes é comercializada somente após o processo de defumação (ricota defumada) ou de condimentação (ricota condimentada). A ricota defumada é altamente resistente às condições desfavoráveis do ambiente, do transporte e da exposição à venda (Panetta, 1975). Além de ser encontrada na forma prensada, pode também ser: cremosa, acondicionada em potes,

condimentada ou não. A ricota culinária, em cujo processo de fabricação emprega-se creme de leite para tomá-la mais cremosa, também é comercializada (Furtado, 1994).

As exigências de mercado em relação a produtos mais nutritivos e saudáveis, particularmente no que se refere ao teor de gordura, estimulam a produção e criação de novos produtos, como a ricota cremosa, com consistência de patê, porém sem adição de creme de leite. Com isso, o produto final contém apenas proteínas de fácil digestão e alto valor biológico.

2.2 Fatores que interferem no crescimento microbiano em alimentos

A necessidade e a importância da segurança dos alimentos, para que não causem danos à saúde do consumidor, são inquestionáveis.

A produção de alimentos seguros requer:

- Controle na fonte;
- Controle do desenvolvimento e do processo dos produtos;
- Boas práticas higiênicas durante a produção, o processamento, a manipulação, a distribuição, a estocagem, a venda, a preparação e a utilização.
- Abordagem preventiva, uma vez que a efetividade dos testes microbiológicos de produtos finais é limitada (CAC Alinorm 97/13 – Codex Alimentarius Commission, 1995).

Do ponto de vista microbiológico, o conceito de um alimento seguro é dado a partir da definição de risco significativo. Um consumidor pode considerar que alimento seguro é aquele que oferece risco igual a zero, enquanto um produtor de alimentos deve considerar o que oferece um risco aceitável. A maior parte dos pesquisadores concordam que risco igual a zero é impraticável devido à quantidade de produtos alimentícios disponíveis, à complexidade da cadeia de distribuição e à natureza humana. Os riscos de ocorrência de doenças transmitidas por alimentos devem ser reduzidos ao máximo durante sua

produção, para se obter um risco aceitável, e de acordo com os padrões exigidos pela legislação (Richards, 2002). Para compreender melhor estes questionamentos, é necessário entender o crescimento microbiano e os fatores que nele interferem.

O crescimento microbiano ocorre pela divisão de uma célula em duas, processo denominado de fissão binária. A divisão celular ocorre de forma coordenada com a replicação do cromossomo. O intervalo de tempo requerido para a formação de duas células a partir de uma é chamado de tempo de geração, quando a população de células dobra. Este tempo varia conforme o microrganismo, podendo ser de 10 minutos, várias horas ou dias.

O ciclo de crescimento microbiano é composto por quatro fases principais (Figura 1):

1. Fase lag: as células não estão se multiplicando, mas sintetizando as enzimas apropriadas para o ambiente.
2. Fase exponencial (ou log): a população está crescendo em escala logarítmica.
3. Fase estacionária: a taxa de multiplicação é igual à taxa de morte, resultando em um número igual de células em um dado tempo. A morte é causada pelo esgotamento de nutrientes, pela acumulação de produtos finais tóxicos ou outras mudanças no ambiente como variações de pH.
4. Fase de morte: o número de células morrendo ultrapassa o de células em multiplicação.

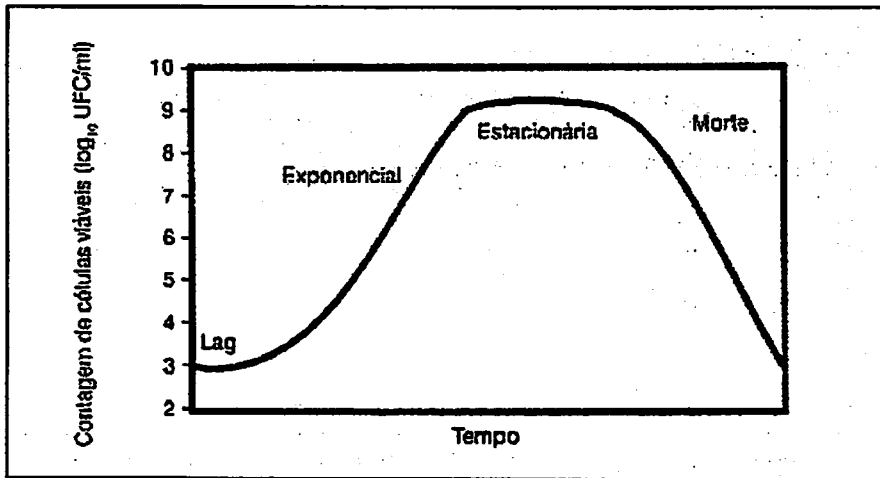


FIGURA 1 Curva de crescimento microbiano (Fonte: Forsythe, 2002).

O crescimento de bactérias patogênicas nos alimentos é afetado por vários fatores, os quais podem interagir sinérgica ou antagonicamente, inibindo ou estimulando o crescimento microbiano.

O alimento é uma matriz quimicamente complexa e, por isso, prever como e qual a rapidez do desenvolvimento dos microrganismos é bastante difícil. A maioria dos alimentos contém nutrientes suficientes para sustentar o crescimento microbiano. Muitos fatores podem propiciar, prevenir ou limitar o crescimento de microrganismos em alimentos, sendo que os mais importantes são: temperatura, pH e atividade de água (a_w) (Forsythe, 2002).

2.2.1 Temperatura

A temperatura é um dos mais importantes fatores ambientais que influenciam a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos. As faixas de temperatura para o crescimento microbiano possuem valores mínimos, máximos

e ótimos, os quais variam de acordo com o microrganismo. O valor ótimo de temperatura de crescimento divide os microrganismos em três grupos: termófilos, mesófilos e psicrófilos.

As reações químicas e enzimáticas podem ocorrer de forma mais rápida na célula, acelerando, desta forma, o crescimento microbiano em temperaturas mais elevadas. Entretanto, acima de certas temperaturas, as proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes celulares podem sofrer danos irreversíveis, prejudicando o crescimento do microrganismo (Madigan et al., 1996).

2.2.2 pH (concentração hidrogeniônica, acidez ou alcalinidade relativas)

Para a concentração hidrogeniônica, os microrganismos também possuem valores mínimos, máximos e ótimos. Cada microrganismo tem preferência por um valor ótimo de pH do ambiente, no qual seu crescimento é máximo. Saindo da faixa de pH ideal para o crescimento, e dirigindo-se aos extremos da escala, ocorre a redução deste crescimento (Madigan et al., 1996). As mudanças bruscas no pH de um alimento podem refletir sobre a atividade microbiana.

Alguns ácidos orgânicos fracos são comumente utilizados na conservação de alimentos, como os ácidos acético, láctico, benzóico e sórbico. Em solução, os ácidos fracos conservantes existem em pH dependente (medido pelo valor pK_a) entre os estados associados e dissociados (Barbosa-Cánovas, 1998).

A atividade ótima de inibição ocorre em condições de pH baixos, pois favorece o estado associado e não carregado da molécula que é livremente permeável através da membrana plasmática e, assim, é capaz de penetrar na célula (Figura 2). A molécula se dissociará após entrar na célula, resultando em liberação de prótons e ânions carregados que não são capazes de atravessar a membrana. Desta forma, a molécula do ácido difunde-se na célula até que o

equilíbrio seja atingido, resultando no acúmulo de ânions e prótons carregados no interior da célula, que podem levar ao rompimento da membrana, inibição de reações formadoras de metabólitos essenciais, acúmulo de ânions tóxicos e estresse na homeostase do pH intracelular (Bracey et al., 1998; Eklund, 1998; Booth & Kroll, 1989).

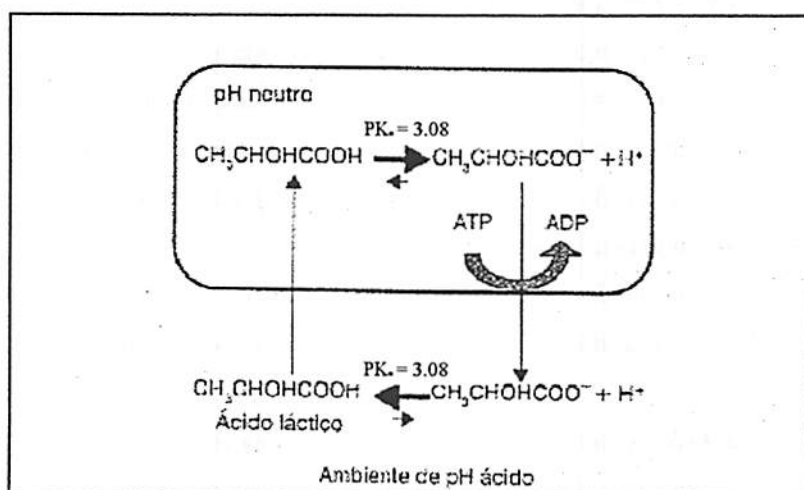


FIGURA 2 Modo de ação dos ácidos orgânicos (Fonte: Barbosa-Cánovas, 1998).

2.2.3 Atividade de água (a_w)

A atividade de água é a medida de água disponível em uma amostra. Uma solução de água pura possui um valor de a_w igual a 1,00. A adição de solutos reduz o valor de a_w para menos de 1,00. A a_w oscila pouco com a variação da temperatura de crescimento de microrganismos.

Quando outras substâncias (solutos) são adicionados à água, suas moléculas orientam-se na superfície do soluto e as propriedades da solução mudam drasticamente. A célula microbiana deve competir com as moléculas de soluto pela água livre. Como sugere Forsythe (2002), geralmente as bactérias necessitam de maior quantidade de água livre para crescer do que os fungos; contudo, o *Staphylococcus aureus* constitui uma exceção a esta regra, já que apresenta desenvolvimento em índices de atividade de água considerados baixos para uma bactéria patogênica (0,83 a_w).

Para a_w existe um valor mínimo exigido para o crescimento de cada microrganismo. Em valores mais baixos que este mínimo, as bactérias não necessariamente morrerão, mesmo que isso aconteça a algumas porções da população. A a_w de uma solução pode interferir no efeito do calor para matar bactérias em uma dada temperatura.

A atividade de água tem sido bastante utilizada como um fator de conservação de alimentos por meio da adição de sal ou açúcar (Forsythe, 2002).

2.3 *Staphylococcus aureus* e sua importância na saúde pública

Inicialmente, os estafilococos foram observados por Koch, em 1878, a partir de material purulento e por Pasteur, em 1880, a partir de cultivados em meios líquidos. A primeira publicação sobre estes microrganismos, em forma de "cocos", e sobre sua constância em abscessos agudos e crônicos foi feita na Escócia, no ano de 1881. Foi também a partir destes estudos que passaram a receber a denominação de *Staphylococcus* devido ao fato de que, quando observados microscopicamente, apresentavam-se sob a forma de grãos arranjados ou dispostos como cachos de uva (Ogston, 1981 citado por Baird-Parker, 1990).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* (do grego *Staphyle* = uva) pertencem à família *Micrococcaceae* e apresentam-se como cocos gram-

positivos, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 μm , imóveis, agrupados em massas irregulares ou em cachos de uva. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, produtores de catalase e normalmente beta-hemolíticos. Fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose como em anaerobiose, diferenciando-se, assim, dos microrganismos do gênero *Micrococcus*, que só fermentam em aerobiose (Kloss & Schleifer, 1986).

Atualmente, cerca de 33 espécies de *Staphylococcus* são reconhecidas, podendo ser divididas em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos. Essa divisão é baseada na capacidade de coagulação do plasma, que é uma propriedade considerada como importante marcador de patogenicidade dos estafilococos (Behme et al., 1996; Trabulsi et al., 1999; Gay & Fox, 2000).

Dentre estas espécies, o *Staphylococcus aureus* permanece como a mais frequentemente associada às doenças estafilocócicas, quer seja de origem alimentar ou não.

O crescimento ocorre em larga faixa de temperatura, 6,5 a 50 °C, com o ótimo entre 30 e 40 °C, dependendo das condições.

A espécie *Staphylococcus aureus* cresce em largas faixas de pH, variando entre 4,0 a 10,0, sendo os valores ótimos entre 6,0 e 7,0.

Quanto a a_w , o desenvolvimento deste microrganismo está na faixa de 0,83 a 0,99, de acordo com Tatini (1973), sendo considerados únicos em sua capacidade de crescerem em valores inferiores aos considerados normais para bactérias não-halófilas. São também tolerantes a concentrações de 10 a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas.

A 60 °C, 12 minutos são necessários para a morte de 99,999% da população bacteriana em leite integral, e cerca de 21 minutos na mesma temperatura para se obter o mesmo grau de destruição no soro (Shebuski, 1983).

Segundo Speeck (1984), a contaminação por *Staphylococcus aureus* pode resultar de fonte humana, animal ou ambiental. Para estes autores, naqueles alimentos em que o processamento destrói este microrganismo, a presença do *Staphylococcus aureus* pode indicar contaminação pela pele, boca, fossas nasais dos manipuladores do alimento, introduzidos diretamente por lesões infectadas nas mãos e braços ou por tosse e espirros comuns nas infecções respiratórias.

O contato com superfícies inadequadamente higienizadas dos equipamentos de produção ou exposição do produto alimentício também podem ser origem de contaminação por *Staphylococcus aureus*. Portanto, sua presença em linhas de processamento de alimentos tem sido considerada como um indicador de condições precárias de higiene e manipulação inadequada da matéria-prima ou do produto final (Notermans & Wernars, 1991).

A presença de *S. aureus* em alimentos *in natura* e produtos alimentícios representa para a saúde risco potencial, uma vez que algumas cepas são produtoras de enterotoxina termoestável. Dentre os principais substratos alimentícios, incriminados epidemiologicamente como capazes de tolerar o desenvolvimento natural e artificial do *S. aureus*, podem ser citados os produtos lácteos (queijos, leite cru, pasteurizado e em pó, manteiga e sorvetes), produtos de confeitaria (bolos recheados, tortas e doces cremosos), carnes frescas e curadas, ovos e massas alimentícias (Pereira, 1996).

No Brasil, trabalhos referentes à condição microbiológica dos queijos evidenciam que *S. aureus* pode atingir contagens suficientemente altas para causar intoxicação alimentar. Esta situação é encontrada em vários tipos de queijos, sendo os mais citados o queijo "Minas Frescal" e a mussarela, com níveis de contaminação variando entre 10^2 e 10^7 UFC (Unidade Formadora de Colônia)/g (Gomes & Gallo, 1995; Gómez et al., 1983; Nascimento et al., 1985; Sabioni et al., 1994; Rodrigues et al., 1995; Cerqueira et al., 1995).

Em alguns trabalhos foi analisada a contaminação do soro de queijo, encontrando-se níveis entre 10^2 e 10^6 UFC/mL (Chiappini et al., 1995). Ahmed et al. (1983), analisando o soro de queijo Domiati, encontrou níveis de contaminação por *S. aureus* entre 10^4 e 10^9 UFC/mL.

Os relatos a respeito da condição microbiológica da ricota ainda são poucos. Cossedu et al. (1997) encontrou apenas 10% de *Staphylococcus* spp., sendo estes coagulase-negativos. Já Silveira et al. (2000) encontrou níveis entre 10^3 e 10^5 UFC/g de *Staphylococcus aureus*.

O crescimento e a produção de enterotoxinas de *S. aureus* são afetados por alguns fatores no alimento, como qualidade nutricional, pH do substrato, temperatura, atmosfera, atividade de água, concentração de cloreto de sódio, outros agentes químicos e competição com outros microrganismos. Contudo, sendo estes fatores os ótimos para o crescimento do microrganismo, não necessariamente serão os níveis ótimos para a produção da enterotoxina (Halpin-Dohnalek & Marth, 1989).

A produção das enterotoxinas é compatível com o número de células, sendo que uma população mínima de 10^5 UFC/g de alimento é citada como necessária para produzir quantidade suficiente de enterotoxina para causar toxinose (ICMSF, 1983; Aktar et al., 1996; Park et al., 1994; Newsome, 1988). Este dado, porém, tem variado conforme o autor, encontrando-se níveis menores.

Entende-se por toxinose estafilocócica uma doença comum entre surtos alimentares, que ocorre devido à ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas produzidas por algumas espécies de *Staphylococcus* (Bergdoll, 1989).

Os sintomas clínicos mais frequentes são náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia sem febre, que ocorrem após 2 a 6 horas da ingestão do alimento contendo a toxina pré-formada (Betley & Harris, 1994). Podem ocorrer

também dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, ainda, febres quando a quantidade de toxina for muito grande. Quando há choque e desidratação, é necessária a hospitalização para reposição de fluidos e eletrólitos.

Os surtos de toxinoses alimentares são provocados por alimentos que permaneceram no intervalo de temperatura ótima para o crescimento e produção de toxina pelo microrganismo, por tempo variável, de acordo com o nível de inóculo, temperatura de incubação entre outros fatores.

A primeira observação registrada que associou os estafilococos à toxinose alimentar provavelmente foi feita em 1884, por Vaughan & Sterneberg. Os autores demonstraram uma intoxicação, ocorrida em Michigan, envolvendo pessoas que haviam se alimentado de queijo contaminado por estafilococos.

Recentemente, muitos casos de intoxicação alimentar estafilocócica têm ocorrido no Brasil; porém, uma investigação mais completa destes surtos, bem como sua notificação, não têm sido realizadas, o que leva à ausência de dados mais precisos.

Em muitos países da Europa, nos Estados Unidos e no Canadá, o *Staphylococcus aureus* é o principal agente causador de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (Meyrand et al., 1999). Na França, a toxinose alimentar por *S. aureus* é o segundo mais frequente causador de surtos de doenças alimentares relacionados a produtos lácteos, depois da *Salmonella* (Lepoutre et al., 1994; Rosec & Gigaud, 2002).

2.3.1 Enterotoxinas Estafilocócicas

Staphylococcus spp e, em especial, o *Staphylococcus aureus* produzem ampla variedade de exoproteínas que contribuem para sua capacidade de colonizar e de causar doenças em hospedeiros mamíferos e aves. Aproximadamente, todas as cepas secretam enzimas e citotoxinas, as quais incluem quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases,

lipases, hialuronidase e colagenase. A principal função destas proteínas é converter os tecidos locais do hospedeiro em nutrientes necessários ao seu crescimento. Algumas cepas produzem uma ou mais exoproteínas adicionais, as quais incluem a toxina da síndrome do choque tóxico, as enterotoxinas estafilocócicas (SE), toxinas esfoliativas e leucocidina. Cada uma destas toxinas é conhecida por seus potentes efeitos nas células do sistema imune dos hospedeiros (Dinges et al., 2000).

O *Staphylococcus aureus* e outras espécies de *Staphylococcus*, incluindo *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lentus*, *S. simulans*, *S. xylosum* (Valle et al., 1990), têm sido implicadas na produção de enterotoxina. Entretanto, o *S. aureus* tem sido considerado um dos mais importantes causadores da intoxicação alimentar, já que aproximadamente metade das cepas de *S. aureus* são enterotoxigênicas (Bergdoll et al., 1990; Halppin-Dohnalek & Marth, 1989).

Em análises microbiológicas de alimentos, o *Staphylococcus* produtor de coagulase positiva tem sido usado como um organismo indicador, apesar de a produção de enterotoxina por espécies estafilocócicas não produtoras de coagulase negativa ter sido informada (Vernozy-Rosand et al., 1996).

Existem no mínimo dez enterotoxinas imunologicamente diferentes produzidas por estafilococos, além de algumas toxinas imunologicamente desconhecidas (Bergdoll, 1989; Su & Wong, 1950), as quais são produzidas durante toda a fase de crescimento (Czop & Bergdoll, 1970).

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são classificadas, de acordo com suas propriedades antigênicas, em nove grupos: SEA, SEB, SEC (dividido em três subclasses SEC₁, SEC₂ e SEC₃, baseadas em seus pontos isoelétricos), SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ (Balaban & Rasooly, 2000).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas globulares de cadeia simples, solúveis em água, com peso molecular entre 28.000 e 35.000 daltons

(Bergdoll, 1980; Su & Wong, 1995) e que contêm muitos resíduos de lisina, aspartato, glutamato e tirosina em sua estrutura primária protéica (Bergdoll, 1990).

Em sua forma biologicamente ativa, elas são resistentes ao calor (termoestáveis), o que constitui um ponto crucial no controle de qualidade de alimentos, já que elas podem persistir no produto final, após o processamento térmico (Bergdoll, 1989). As enterotoxinas estafilocócicas atuam como super antígenos e ativam sistemas de defesa humana quando causam toxiose ou outras doenças (Marrack & Kappler, 1990; Dinges et al., 2000).

Em geral, quanto mais baixa for a temperatura, maior será o tempo necessário para a produção de enterotoxina. Em condições ótimas, a enterotoxina torna-se evidente em 4 a 6 horas.

Sua produção ocorre em pH ótimo entre 6,14 e 7,95, sendo muito influenciada pelo meio. A enterotoxina A pode ser produzida entre pH 4,6 a 6,5 em leite esterilizado. Em caldo BHI, a produção ocorre em valores de pH entre 5,15 a 9,02 (Smith et al., 1983).

As enterotoxinas são higroscópicas e facilmente solúveis em água e soluções salinas. Apresentam ponto isoelétrico entre 7,0 e 8,6 e pico de absorvância a 277 nm, sendo resistentes a tripsina, miotripsina, renina, papaína e pepsina, com exceção da enterotoxina B, que é destruída por esta última enzima, em pH ao redor de 2,0 (Niskanen & Koiranen, 1977).

A SEA e SED predominam nos surtos de intoxicação alimentar (Trabulsi, 1999) e cerca de 5% das intoxicações são causadas por enterotoxinas ainda não identificadas. De acordo com Holt et al. (1994), a maioria das cepas produzem SEA.

Não existe concordância entre os vários autores sobre a quantidade mínima de enterotoxina necessária para causar sintomatologia em seres humanos. De uma maneira geral, estima-se entre 0,015 e 0,375 µg de

enterotoxina por quilo de massa corpórea. Características individuais também devem ser levadas em consideração (Franco & Franco, 1996).

O principal alvo de ação das enterotoxinas é o trato gastro-intestinal, sendo o vômito o sintoma mais comum da intoxicação por *S. aureus*, mas outras alterações são evidenciadas na pressão arterial e na temperatura, indicando sua passagem para o sistema circulatório (Bergdoll, 1983).

Os métodos para detecção de enterotoxinas estafilocócicas são classificados em biológicos e imunológicos, sendo os últimos mais utilizados.

Os métodos imunológicos baseiam-se no princípio de precipitação da reação antígeno-anticorpo. Dentre estes métodos podem ser relacionados os de reações em gel, dentre os quais se destacam as técnicas de 'O.S.P.' e 'microslide'. Atualmente, os ensaios RPLA e ELISA, os quais se baseiam no uso de anticorpos específicos, têm apresentado melhores resultados (Brabes, 1999; Park & Szabo, 1986).

Para evitar o consumo de produtos contaminados é de grande importância que os alimentos sejam submetidos a um eficiente controle de qualidade (Sincowey et al., 1980; Brabes, 1990; Leite, 2000).

2.4 Aspectos gerais sobre a nisina

2.4.1 Estrutura química da nisina

A nisina é produzida naturalmente por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, constituindo-se de um peptídeo de 34 aminoácidos, que faz parte da família dos lantibióticos, os quais são peptídeos modificados. É formada por oito alaninas, quatro ácidos aminobutíricos (ABA), três glicinas, três isoleucinas - sendo uma amino-terminal, três lisinas - sendo uma carboxi-terminal, duas leucinas, duas histidinas, duas metioninas, uma serina, uma valina, uma prolina, uma asparagina e os aminoácidos incomuns

deidroalanina (DHA) e deidrobutirina (DHB), com um peso molecular de 3.500 daltons (Moreno et al., 1999).

Segundo Breukink & Kruijff (1999), quanto à tradução, a molécula de nisina é produzida em sua forma imatura, que contém 57 aminoácidos, todos comuns, sendo 23 resíduos da região-líder e os 34 resíduos da região estrutural. Então, por meio de modificações enzimáticas, a região-líder é removida e a serina e a treonina da região estrutural sofrem desidratação, formando DHA (Dehidroalanina) e DHB (Dehidrobutirina), respectivamente. Subseqüentemente, cinco dos resíduos desidratados são acoplados com cisteína, formando pontes tioéster, que produzem os anéis característicos de lantionina (Figura 3).

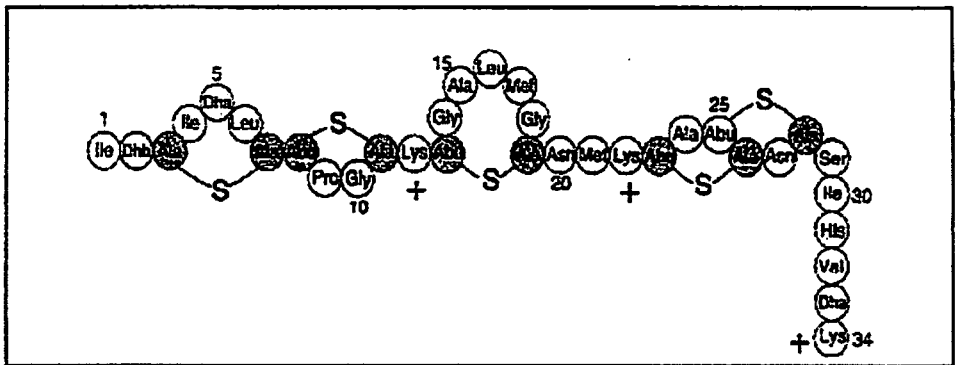


FIGURA 3 Estrutura primária da nisina. Os resíduos típicos encontrados em lantioninas estão em cinza escuro. Dha: dehidroalanina; Dhb: dehidrobutirina; Ala - S - Ala: lantionina; Abu - S - Ala: metilantionina (Breukink & Kruijff, 1999).

Através dos seus aminoácidos reativos DHA e DHB, a nisina pode formar dímeros ou polímeros de 7.000 a 14.000 Da. Trabalhos anteriores evidenciavam a existência de cinco polipeptídeos diferentes, nisinas A, B, C, D, e E. No entanto, a hipótese da existência de diferentes tipos de nisina perdeu a

força quando três grupos de pesquisadores, estudando cepas diferentes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produtores de nisina, descobriram que a sequência de bases do gene para a produção de nisina de todas as cepas correspondia com a sequência de aminoácidos da nisina A. Portanto, é improvável que a mesma cepa produza tipos diferentes de nisina. Acredita-se que as nisininas B e E sejam subprodutos de degradação da nisina A, sendo que as proporções relativas das diferentes nisininas variam com o tempo de armazenamento da amostra e com as condições de estocagem (Ray, 1992).

Portanto, apenas duas variantes naturais da nisina que possuem atividades similares, nisina A e nisina Z, têm sido encontradas. A nisina A difere da nisina Z por um único resíduo de aminoácido na posição 27, sendo uma histidina na nisina A e uma asparagina na nisina Z. Esta nova molécula produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 foi caracterizada por Mulders e colaboradores e chamada de nisina Z, sendo codificada por um gene diferente do gene da nisina A. Estas duas nisininas parecem ter atividades biológicas semelhantes, porém a nisina Z apresenta propriedades de difusão diferentes (Kawai, 1999).

2.4.2 Propriedades físico-químicas e bioquímicas da nisina

A alta proporção de aminoácidos básicos lhe confere carga líquida positiva, com ponto isoelétrico de 10,5.

A nisina é sensível às enzimas digestivas proteolíticas, como a pancreatina e a α -quimiotripsina. Também as nisinases (deidroalanina redutase), produzidas por determinadas linhagens das espécies de *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc* sp., *Streptococcus thermophilus* e determinadas espécies de *Bacillus* e *Clostridium butyricum*, são responsáveis pela inativação dos tipos A,B, C e E, mas não do tipo D. A nisina é resistente à

degradação pela tripsina, elastase, carboxipeptidase A, pepsina ou eripsina (Ming & Daeschel, 1995).

A solubilidade, estabilidade e atividade biológica da nisina são altamente dependentes do pH, temperatura e natureza do substrato. A nisina permanece estável após tratamento térmico a 100 °C durante 10 minutos e a 115,6 °C em pH 2,0, mas perde 40% da atividade em pH 5,0 e mais de 90% em pH 6,8. Em condições alcalinas (pH 11,0), sua atividade é completamente destruída após 30 minutos a 63 °C. Alguns substratos, como o leite, oferecem efeito protetor à nisina em temperaturas de esterilização, indicando que o grau de inativação pode ser menor em alimentos (Delves-Broughton, 1990).

Devido à natureza alcalina de sua molécula, a nisina apresenta estabilidade máxima em condições ácidas. Ela é completamente estável em soluções com pH 2,0, podendo ser estocada durante períodos prolongados em temperaturas de 2 a 7°C, sem perda de atividade. Acima de pH 7,0, a inativação ocorre mesmo em temperatura ambiente (Mothugh et al., 1991).

A nisina é quase insolúvel em pH neutro ou alcalino, apresentando solubilidade de 57,0 mg/mL em pH 2,0; 1,5 mg/mL em pH 6,0 e 0,25 mg/mL em pH 8,5. Essas propriedades e o perfil eletroforético sugerem que o ponto isoelétrico da nisina situa-se na faixa de alcalinidade. A solubilidade da nisina em água a pH 7,0 é de 75 µg/mL, aumentando com a redução do pH, sendo de 1.000 µg/mL a pH 5,6 e de 12.000 µg/mL a pH 4,2. A solubilidade também é influenciada pelo aumento da concentração de fosfato e pela presença de proteína (Liu & Hansen, 1993).

Yezzi et al. (1993) citam que o pH também é importante para a produção da nisina e não somente para sua atuação. Segundo os autores, se o pH do meio for ajustado para cerca de 5,0 durante o crescimento dos microrganismos, a fase lag pode ser reduzida, e a atividade de culturas lácteas starters por volume pode ser aumentada. Em seus estudos, os autores prepararam queijos tipo-Cheddar

com culturas lácteas starters contendo pH ajustado para 6,5, conseguindo um incremento de nisina de aproximadamente 20% em comparação com o queijo com a mesma cultura láctea *starter*, porém sem ajuste de pH.

Com o conhecimento destas características de solubilidade e estabilidade da nisina, deve-se considerar, então, que quando for adicionada a alimentos, a nisina deve estar em solução, de forma que uma boa distribuição no produto seja assegurada; o pH do alimento deve estar abaixo de 7,0 para que a estabilidade e solubilidade adequadas sejam obtidas durante o processo. Deve-se também adicionar nisina suficiente ao alimento para que níveis apropriados sejam conseguidos após o processamento, estocagem prolongada ou cura. No caso de leite e derivados, a solubilidade não é problema, já que a maioria destes produtos tem baixo pH e quantidade suficiente de proteína para auxiliar na solubilização da nisina (Yezi et al., 1993).

2.4.3 Espectro de atividade

A nisina apresenta atividade antimicrobiana contra grande faixa de microrganismos Gram-positivos, incluindo estreptococos dos grupos A, B, E, F, G, K e M, pneumococos, corinebactéria, *Staphylococcus* sp., *Micrococcus lysodeikticus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Lactobacillus* spp., *Listeria* sp., *Lactococcus* spp., *Erysipelothrix rhusiopathiae* e as espécies formadoras de esporos *Clostridium* e *Bacillus* (Moreno et al., 1999b).

Normalmente, as nisinas não apresentam, isoladamente, atividade contra microrganismos Gram-negativos, fungos e leveduras, com exceção de bactérias do gênero *Neisseria*. Contudo, alguns autores verificaram discreta inibição de algumas linhagens Gram-negativas, incluindo *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *V. parahemolyticus* por *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 (Stevens et al., 1991).

Estudos recentes demonstraram que a nisina, quando associada a agentes quelantes, como EDTA, exibe efeitos bactericidas também em bactérias Gram-negativas, como *Salmonella*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri*, *Citrobacter freundii* e *Escherichia coli*. Os autores observaram que separadamente a nisina e o EDTA não tiveram inibição significativa, reduzindo as populações microbianas em menos de um ciclo logarítmico. Porém, quando em conjunto, conseguiram reduções populacionais de até 6,9 ciclos logarítmicos (Bozianis & Adams, 1999). *para c f*

Atualmente, muitos estudos têm sido feitos com o intuito não só de avaliar a sensibilidade *in vitro* de determinado microrganismo à nisina, mas também como esta sensibilidade pode ser afetada ou não no alimento. Nesta linha de pesquisa, um dos microrganismos mais estudados é a *Listeria monocytogenes*. Ferreira & Lund (1996) analisaram o efeito da nisina em *L. monocytogenes* em queijos Cottage, observando que nos queijos sem nisina a população de *L. monocytogenes* foi reduzida 10 vezes durante estocagem de 7 dias a 20°C, enquanto, que em queijos adicionados de 2000 UI/g, houve uma redução da população de *L. monocytogenes* em aproximadamente 1000 vezes, em 3 dias nas mesmas condições de estocagem. Já Davies et al. (1997), utilizando a nisina em queijos tipo ricota, conseguiram inibir o crescimento de *L. monocytogenes* por um período de 8 semanas utilizando concentrações de 2,5 mg/L de nisina.

Há relatos de microrganismos que se tornaram resistentes à nisina pela mudança na composição dos lipídeos da membrana celular, como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Lb. plantarum*, *Streptococcus thermophilus* e algumas espécies de *Bacillus* (Ming & Daeschel, 1995).

Um aspecto negativo do uso da nisina é sua atividade contra as próprias bactérias lácticas, o que pode ocasionar grandes perdas às indústrias de laticínios. O gênero *Lactococcus lactis* é o mais sensível, sendo a linhagem LP5

de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* freqüentemente utilizada para o ensaio biológico da nisina. O antagonismo promovido pela produção de bacteriocinas assume papel importante na tecnologia de queijos, pois está diretamente ligado ao balanço microbiológico do fermento láctico, necessário para a obtenção de características específicas nos produtos fermentados do leite, principalmente queijos.

2.4.4 Mecanismo de ação antimicrobiana da nisina

A nisina possui mecanismo de ação bastante complexo, existindo evidências de dois mecanismos moleculares distintos: o de formação de poros na membrana celular, que é ativo contra células em crescimento, com lise celular; e o outro ativo contra o desenvolvimento pós-germinativo de esporos. Acredita-se, também, que os resíduos deidroalanina e deidrobutirina da molécula de nisina estejam envolvidos em sua ação letal (Bruno & Montville, 1993).

2.4.4.1 Células vegetativas

Segundo Ramseier (1960), citado por Bruno & Montville (1993), as células sensíveis à nisina sofrem ruptura, com liberação do material citoplasmático.

Henning et al. (1986) observaram que o efeito antimicrobiano é causado pela interação com os fosfolípidos da membrana citoplasmática e que os microrganismos Gram-positivos são ainda mais sensíveis à sua ação. O ácido muréico também é inibido, ocasionando um efeito sinérgico no distúrbio das funções da membrana.

Gao et al. (1991) evidenciaram alterações no potencial de membrana e de gradiente de pH (força protomotora), com indução do efluxo de componentes celulares de baixo peso molecular.

De um modo geral, a ação da nisina sobre os microrganismos Gram positivos ocorre em duas etapas. Na primeira (Figura 4), envolve a adsorção não específica da nisina sobre a parede celular destes microrganismos, fenômeno reversível e dependente de pH, com valor mínimo de 3,0 e um máximo de 6,5. A adsorção também é dependente da composição fosfolipídica da membrana citoplasmática dos microrganismos sensíveis, da presença de cátions divalentes e trivalentes (Mg^{+2} , Ca^{+2} e Gd^{+3}) e da concentração utilizada (Ming & Daeschel, 1995).

Na segunda etapa, a nisina torna-se insensível às proteases e as células sofrem mudanças irreversíveis (Figura 4).

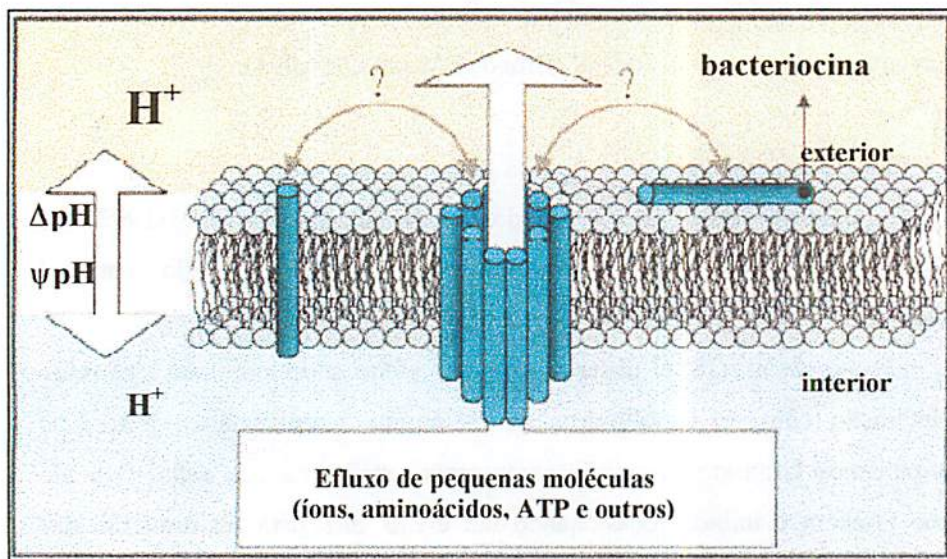


FIGURA 4 Esquema da ação da nisina em células vegetativas (Fonte: Breukink & Kruijff, 1999)

A nisina primeiramente se liga com sua extremidade Carboxi-terminal via interações eletrostáticas com os lipídeos aniônicos, seguida pela introdução da extremidade Amino-terminal na fase líquida da membrana, e o peptídeo adota então uma conformação de orientação paralela com a superfície da membrana. Depois disso, a nisina adota a orientação transmembrana e se agrega, formando poros ou canais de 0,2 – 1,0 nm de diâmetro, sendo que os lipídeos podem se tornar membros ativos dos poros e pode haver, também, a translocação do peptídeo inteiro para o interior da célula. A simultânea despolarização da membrana causa rápido efluxo de moléculas essenciais, como íons K^+ , aminoácidos e ATP, levando a uma série de alterações que terminam com a lise celular (Breukink & Kruijff, 1999).

Um outro efeito observado da atividade da nisina é a inibição da síntese da parede celular pela formação de um complexo entre a nisina e os intermediários lipídicos da mureína (ácido teicóico, por exemplo). No entanto, acredita-se que este seja um efeito secundário, uma vez que altas concentrações de nisina são necessárias para causar tal inibição (Toledo, 2000).

2.4.4.2. Esporos bacterianos

A maneira pela qual a nisina impede a germinação de esporos parece ser distinta do modo como atua em células vegetativas. Acredita-se que os grupos reativos DHA e DHB interajam com grupos sulfidril vitais presentes na membrana de esporos recém-germinados, impedindo a formação da célula vegetativa (Liu & Hansen, 1993).

2.4.5 Fatores que interferem na eficiência da nisina

Como já foi citado anteriormente, o poder inibidor da nisina depende do valor de pH do alimento onde será empregada.

Alguns pesquisadores estudaram o efeito inibidor no crescimento pós-germinativo de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 inoculados em salsichas. A eficiência da nisina foi reduzida neste produto com valores de pH acima de 6,5, e também com o aumento da concentração do inóculo. A nisina não inibiu populações deste microrganismo de 10^6 UFC/mL. Neste mesmo experimento, observou-se que a sensibilidade do microrganismo também está relacionada com o binômio tempo/temperatura de ativação ao calor subletal (Delves-Broughton, 1990).

Outros estudos demonstraram que a ação da nisina também depende do tipo e da natureza de metabólitos contidos nos alimentos. Verificou-se que a presença de íons divalentes como cobre, ferro e manganês, adicionados no meio Caldo nutriente (CN) utilizado para averiguar a germinação de esporos, aumentam a efetividade da nisina. Foi estudado também o efeito sinérgico de açúcares com a nisina na inibição da germinação de *Bacillus stearothermophilus*, concluindo que a ribose, na concentração de 0,1 M, é o açúcar que tem maior eficácia de inibição quando associado à nisina (Toledo, 2000).

A adição de agentes emulsificantes no alimento pode diminuir a eficácia da nisina.

Células vegetativas de *Bacillus cereus* sintetizam, durante seu crescimento vegetativo, uma enzima capaz de inativar a nisina, a nisinasase, que é uma redutase, atuando no resíduo de dehidroalanina adjacente ao carboxil terminal. As células vegetativas de *B. cereus* são insensíveis a 25ppm de nisina. Outras bactérias do mesmo gênero *Bacillus*, e também do gênero *Clostridium*, possuem esta enzima (Mohallem, 1994).

Resumidamente, os fatores que afetam a atuação ótima da nisina são:

- Tipo e quantidade de microrganismos;
- O pH final de equilíbrio do alimento ou solução em que será empregada;
- O binômio tempo/ temperatura utilizado no tratamento;
- Metabólitos ou outros aditivos presentes no alimento;
- Produção de enzimas de resistência à nisina por parte dos microrganismos.

2.4.6 Toxicidade da nisina

Eapen et al (1983) citam os primeiros testes sobre a toxicidade aguda da nisina, através dos quais os pesquisadores estabeleceram a Dose Letal Mínima (DL₅₀) da nisina para gatos e ratos, por via oral. O valor DL₅₀ para nisina é similar ao valor da DL₅₀ para o sal comum, isto é, 6.950 mg por kg de peso corpóreo. Esses resultados confirmam o pressuposto de que a nisina é uma substância atóxica, ou de muito baixa toxicidade, tanto que é consumida em queijos e leite há milênios, sem nenhum efeito tóxico aparente (Delves-Broughton, 1990).

A nisina é rapidamente inativada por enzimas digestivas, como a pancreatina e a α -quimiotripsina, e não é detectada na saliva humana após 10 minutos da ingestão. Este tempo não é suficiente para permitir o desenvolvimento de resistência por microrganismos. Além disso, as condições enzimáticas do trato digestivo humano desestabilizam a sua molécula (Mohallem, 1994).

2.4.7 Emprego da nisina em alimentos

A nisina tem sido utilizada com muito sucesso em vários tipos de alimentos, para diferentes finalidades, de acordo com sua susceptibilidade a determinados tipos de microrganismos e aos fatores que fazem parte do processamento do alimento.

2.4.7.1 Alimentos crus

A) Frutas: só é aplicável nas frutas sujeitas à fermentação butírica, já que fungos e leveduras, que são os principais microrganismos envolvidos na deterioração deste tipo de alimento, são praticamente insensíveis à sua ação.

2.4.7.2 Alimentos pasteurizados

A) Queijos: utilizada na prevenção de estufamento tardio, causado pelos esporos germinados de *C. butyricum*, *C. tyrobutiricum* e *C. sporogenes*. Também destrói outros microrganismos contaminantes que possam ser patogênicos. Os queijos processados com nisina em concentração de 250 a 500 UI/g podem ser armazenados sem refrigeração e sem produção de efeitos indesejáveis.

B) Leite integral: pode ser empregada no leite pasteurizado, em países de clima tropical com problemas de abastecimento como longas distâncias, combinadas com altas temperaturas no trajeto entre o produtor e o consumidor final. Concentrações de 30 - 50 UI/mL duplicam a vida útil destes produtos .

C) Bebidas Alcoólicas: é usada para o controle de microrganismos contaminantes, principalmente para prevenção da deterioração causada por *Pedococcus* e *Lactobacillus*. Esses microrganismos são sensíveis a 100 UI/mL de nisina. Por não ter ação sobre as leveduras, é permitida sua utilização substituindo a lavagem ácida, ou mesmo em substituição do dióxido de enxofre, durante a fermentação do vinho.

D) Sobremesas Lácteas: estes alimentos normalmente possuem cereais na sua formulação; portanto, quando aquecidos, gelatinizam-se e solidificam-se,

tornando-se produtos altamente condutivos. Assim, um tempo de processamento térmico prolongado é necessário para manutenção de suas qualidades microbiológicas, com perdas significativas nas qualidades nutricionais e organolépticas. Utilizando a nisina em concentrações de 50 - 100 mg/kg, há redução no processo térmico.

2.4.7.3 Alimentos esterilizados

A) Bebidas achocolatadas: o processo térmico requerido para conservação destes produtos pode ser reduzido em 80%, sem deterioração após incubação a 37°C, durante 21 dias. Recomenda-se o uso de 30 mg/L para um processamento a 121°C durante 12 minutos.

B) Produtos curados à base de carnes: há vários estudos sobre a substituição parcial do nitrito, agente antibotulínico e de cura, pela nisina.

C) Produtos à base de tomate: a nisina é utilizada nestes produtos para reduzir o binômio tempo/temperatura requerido para a inativação de esporos, principalmente de *B. stearothermophilus*.

D) Sopas enlatadas: as qualidades organolépticas das sopas enlatadas podem ser conservadas com uma esterilização térmica mais branda, o que é viável empregando nisina numa concentração de 100 - 200 mg/kg.

E) Vegetais de baixa acidez em salmoura ou em molho: recomenda-se concentrações de nisina de 100 - 200 UI/g, para reduzir a resistência térmica de esporos termoresistentes nestes alimentos.

(Mohallem, 1994)

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos, no Campus da Universidade Federal de Lavras e na Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande (CAARG)- Lavras/MG.

3.1 Microrganismo e padronização do inóculo

A cultura de *S. aureus* foi proveniente da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), sendo produtora de Enterotoxina Estafilocócica "A" (SEA). Esse isolado foi obtido por Pereira et al. (1994) a partir de bolo confeitado envolvido em um surto de toxinose alimentar em Belo Horizonte-MG.

O inóculo foi padronizado, medindo-se de 30 em 30 minutos a densidade ótica, a 620 nm, do caldo Tryptic Soy Broth (TSB) inoculado com o isolado de *Staphylococcus aureus* e determinando a quantidade de células viáveis pela técnica de plaqueamento em microgota em Tryptic Soy Agar (TSA).

Aos resultados da contagem e de absorbância aplicou-se uma análise de regressão, permitindo a determinação da equação utilizada nas inoculações dos queijos, pela qual se estimou a quantidade de microrganismos necessária para se obter 10^3 UFC/g de Ricota em todos os tratamentos.

3.2 Condução do Experimento

O experimento foi realizado em 3 repetições, em blocos com 18 tratamentos (2 níveis de nisina x 3 níveis de pH x 3 níveis de temperatura), demonstrados no Quadro 2. Cada repetição foi feita em datas distintas com duração de 21 dias cada.

Os níveis de nisina foram 0 g/kg, denominado controle, e 0,1 g/kg ou 10 UI/g.

Com relação ao pH, utilizaram-se os níveis 4,5, 5,0 e 5,5, sendo o último o pH natural da ricota cremosa.

QUADRO 2 Tratamentos aplicados à ricota cremosa em cada bloco do experimento.

Tratamento	Níveis dos fatores	Tratamento	Níveis dos fatores
T ₁	0 g/kg nisina; pH=5,5; T° =25°C	T ₁₀	0,1 g/kg nisina; pH=5,5; T° =25°C
T ₂	0 g/kg nisina; pH=5,5; T° =25°C	T ₁₁	0,1 g/kg nisina; pH=5,5; T° =25°C
T ₃	0 g/kg nisina; pH=5,5; T° =25°C	T ₁₂	0,1 g/kg nisina; pH=5,5; T° =25°C
T ₄	0 g/kg nisina; pH=5,0; T° =14°C	T ₁₃	0,1 g/kg nisina; pH=5,0; T° =14°C
T ₅	0 g/kg nisina; pH=5,0; T° =14°C	T ₁₄	0,1 g/kg nisina; pH=5,0; T° =14°C
T ₆	0 g/kg nisina; pH=5,0; T° =14°C	T ₁₅	0,1 g/kg nisina; pH=5,0; T° =14°C
T ₇	0 g/kg nisina; pH=4,5; T° =7°C	T ₁₆	0,1 g/kg nisina; pH=4,5; T° =7°C
T ₈	0 g/kg nisina; pH=4,5; T° =7°C	T ₁₇	0,1 g/kg nisina; pH=4,5; T° =7°C
T ₉	0 g/kg nisina; pH=4,5; T° =7°C	T ₁₈	0,1 g/kg nisina; pH=4,5; T° =7°C

Para o fator temperatura, os níveis utilizados foram 7, 14 e 25 °C.

As repetições eram conduzidas em três etapas: produção, tratamentos e análises microbiológicas.

A primeira etapa corresponde à produção de Ricota Cremosa, realizada na Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande com os devido cuidados higiênico-sanitários, que será descrita mais adiante. A Ricota Cremosa foi então encaminhada ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos de UFLA, onde prosseguiram as demais etapas.

Na segunda etapa, primeiramente foram retiradas amostras da ricota com o objetivo de se fazer controle microbiológico da mesma. Em seguida eram feitos os tratamentos: redução de pH, adição da nisina (0,1g/kg) e armazenamento nas 3 temperaturas (7, 14 e 25 °C). Só então as ricotas foram, finalmente, inoculadas com o microrganismo *Staphylococcus aureus* a 10^3 UFC/g (Figura 5).

Na terceira etapa, as análises microbiológicas foram realizadas de forma a se obterem todas as fases da curva de crescimento do microrganismo estudado, sendo as ricotas analisadas pelo prazo de 20 dias.

Todas as etapas serão detalhadas a seguir.

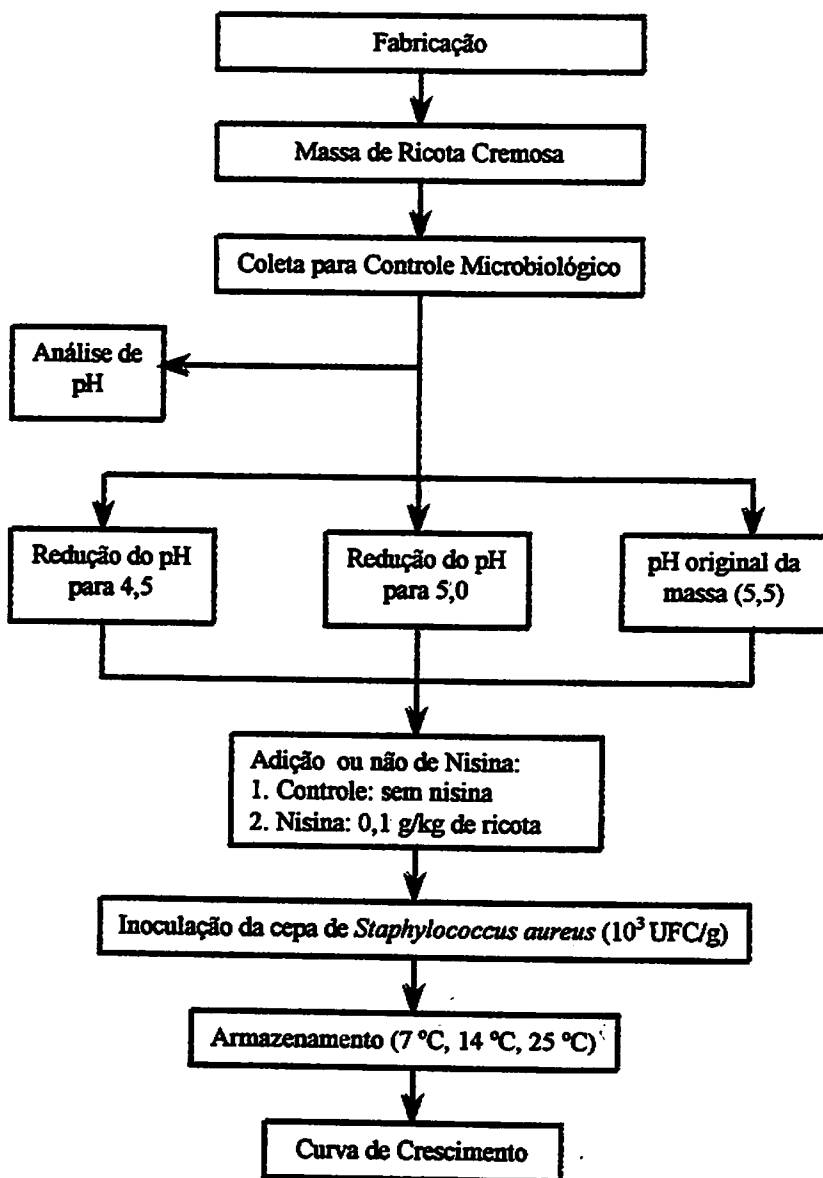


FIGURA 5 Fluxograma do experimento.

3.3 Fabricação da ricota cremosa

A produção da ricota cremosa foi realizada no laticínio da Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande (CAARG), Lavras-MG, tomando-se os devidos cuidados higiênico-sanitários como uso de luvas, máscaras, gorro, uniformes entre outros.

O soro fresco proveniente da fabricação de queijo mussarela foi colocado em um tanque que permite o aquecimento com vapor direto, onde, então, ocorreu a redução da acidez original (situada entre 11 °D e 14 °D) para 8 °D, utilizando-se NaOH . Logo após iniciou o aquecimento (Figura 6).

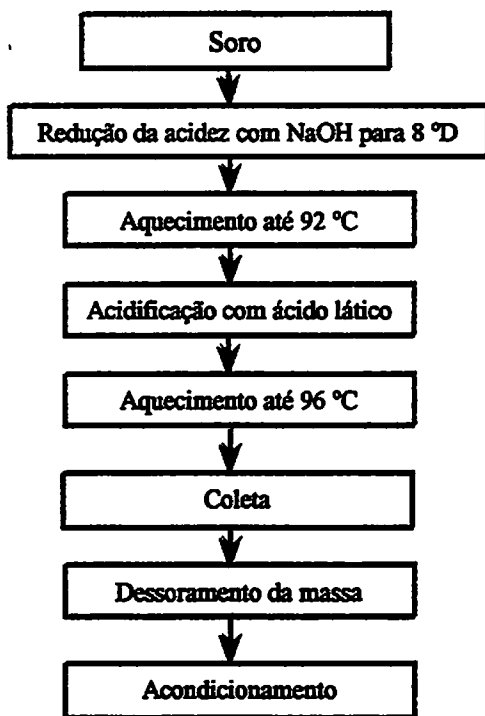


FIGURA 6 Fluxograma de fabricação da ricota cremosa.

O aquecimento com vapor direto foi feito até atingir a temperatura de 92 °C, quando então se iniciou a acidificação com ácido láctico a 85% a quantidade de 100 mL de ácido láctico para 100 L de soro, sendo este previamente diluído na proporção de 1:10 em água.

Esse aquecimento foi interrompido por volta de 96 °C, aguardando o tempo necessário para que a massa aflorasse à superfície do soro, procedendo-se a coleta utilizando dessoradores, já que, com o uso desta técnica, os flocos são mais finos, o que propicia a consistência cremosa do produto sem que seja necessária a adição de creme.

Aproximadamente 10 kg de ricota cremosa foram produzidos e acondicionados em vasilhames plásticos (potes de requeijão industrial para 4 kg cada) esterelizados em luz ultra-violeta (UV) e vedados, que foram imediatamente transferidos ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em prazo não superior a 1 hora. Os vasilhames foram transportados à temperatura ambiente, já que a ricota ainda se encontrava em temperatura alta, em torno de 60 °C.

Com esta técnica, a ricota ganha a consistência de um patê, sem, no entanto, ser adicionada de creme, permanecendo, assim, com baixa porcentagem de gordura. Contudo, este produto contém alto teor de umidade, o que reduz em muito sua vida de prateleira. A ricota comum (não cremosa) possui geralmente um prazo de validade de 30 dias, e a ricota cremosa tem este prazo reduzido para 1 semana.

O produto foi escolhido devido a sua consistência, que facilitou a inoculação do microorganismo, a redução do pH e a adição da nisina, bem como sua homogeneização.

Incluir na metodologia

3.4 Métodos e Análises

3.4.1 Controle microbiológico da ricota cremosa

O controle microbiológico foi realizado antes da inoculação do *S. aureus* e dos tratamentos, com o objetivo de confirmar a ausência de outras espécies de microrganismos contaminantes, principalmente de *Staphylococcus* spp., que pudessem interferir na avaliação do crescimento da cepa utilizada na inoculação.

Antes de prosseguirem os tratamentos, a ricota foi homogeneizada e coletada para ser submetida às análises microbiológicas de coliformes totais e fecais, estafilococos produtores de coagulase e contagem de aeróbios mesófilos, segundo a metodologia do ICMSF (1983). Estas análises foram realizadas nos tempos 0, 7, 14 e 20 dias de estocagem. As amostras retiradas para o controle microbiológico foram mantidas apenas à temperatura de 7 °C.

3.4.1.1 Preparo da amostra

Cerca de 10 g da ricota anteriormente separada para o controle microbiológico foram transferidos para 90 mL de citrato de sódio a 2% contidos em um erlenmeyer de 250 mL, sendo posteriormente homogeneizadas por agitação manual, já que a massa da ricota cremosa é bem fina, não necessitando ser triturada ou batida em liquidificador, havendo também o inconveniente de que eram muitas amostras.

Foram então preparadas diluições seriadas até 1/1000 em porções de 9 mL de água peptonada a 0,1% (p/v), para o procedimento das determinações bacteriológicas.

3.4.1.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais

Utilizou-se o método de fermentação de lactose em tubos múltiplos, em que foram inoculados 1mL das diluições 1/10, 1/100 e 1/1000 em três séries de três tubos contendo caldo lauril sulfato triptose, LST.

Após a incubação a 35 °C durante 48 horas, os tubos presuntivamente positivos, que evidenciassem turvação e produção de gases nos tubos de Durham, eram submetidos a uma tabela de NMP para determinação dos resultados expressos em NMP de coliformes totais/g de amostra analisada.

3.4.1.3 Enumeração de estafilococos produtores de coagulase

Inoculou-se com o auxílio de alça de Drigalski, sobre superfície de ágar de Baird-Parker, 0,1 mL das diluições 1/10, 1/100 e 1/1000. Foram feitas duplicatas das placas para cada diluição. Após completa incorporação, as placas inoculadas foram incubadas invertidas a 37 °C durante 48 horas. Decorrido o período de incubação, procedeu-se a contagem das placas anotando-se os resultados de colônias para convertê-los em UFC/g.

3.4.1.4 Enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos

Foram inoculados em placas de Petri estéreis, utilizando-se a técnica de plaqueamento em profundidade, as diluições 1/10, 1/100 e 1/1000. Foram feitas duplicatas das placas para cada diluição. O meio utilizado foi o Ágar Padrão para Contagem (PCA). As placas foram incubadas invertidas a 35 °C por 48 horas; após este período procedeu-se a contagem das colônias para convertê-los em UFC/g.

3.4.2 pH da ricota cremosa

Um dos níveis de pH utilizado foi igual ao pH final da massa de ricota cremosa, aproximadamente 5,5.

Para obtenção dos outros dois níveis de pH, a redução foi feita com ácido láctico a 20%, adicionado nas proporções necessárias para se obterem os pHs de 5,0 e 4,5, sendo a adição monitorada por um pHmetro, sempre com homogeneização.

dia, hora e tratamento recebidos pela amostra, e foram pré-determinadas em ensaios preliminares. Foram feitas duplicatas das placas para cada diluição.

Após completa incorporação, as placas inoculadas foram incubadas invertidas a 37 °C durante 48 horas. Decorrido o período de incubação, procedeu-se a contagem das placas, sendo a média das contagens de colônias multiplicada pelo fator de diluição utilizado e os resultados expressos como UFC/g da amostra.

Foram consideradas, para efeito desta contagem, somente aquelas colônias que apresentavam o mesmo comportamento morfotintorial da linhagem padrão empregada para inoculação (colônias negras, pequenas e brilhantes, com a presença de dois halos, sendo um translúcido e outro opaco) , descartando-se quaisquer outras colônias que porventura viessem a crescer .

foi possível determinar a alíquota deste caldo TSB de modo a obter 10^3 UFC/g de Ricota em todos os tratamentos.

A massa de ricota, após a inoculação, passou por homogeneização manual utilizando colheres de aço inoxidável estéreis, e imediatamente iniciou-se a amostragem para curva de crescimento do *Staphylococcus aureus*.

3.4.6 Temperatura de armazenamento

Após a inoculação e retirada da primeira amostra (tempo = 0), os queijos foram armazenadas a 7 , 14 e 25 °C, devidamente embalados e identificados.

O armazenamento a 7 °C foi realizado em geladeira da marca Brastemp modelo Frost-Free (340 L), enquanto as outras duas temperaturas, 14 e 25 °C, foram obtidas em B.O.D, marca MOD. 34CD.

3.4.7 Curva de crescimento

O crescimento de *Staphylococcus aureus* foi acompanhado na seguinte periodicidade para todos os tratamentos em todas as repetições: 0, 3, 6, 12, 24, 48 horas, 3º dia, 5º, 7º, 9º, 11º, 14º, 17º e 20º dias.

Estes intervalos foram utilizados devido aos resultados obtidos no pré-experimento, que demonstravam satisfatoriamente todas as fases de crescimento do microrganismo.

3.4.7.1 Enumeração de *Staphylococcus aureus*

O preparo da amostra foi realizado de forma semelhante à descrita no item 3.4.1.1.

Inoculou-se com o auxílio de alça de Drigalski, sobre superfície de ágar de Baird-Parker, 0,1 mL das diluições adequadas. As diluições dependeram do

dia, hora e tratamento recebidos pela amostra, e foram pré-determinadas em ensaios preliminares. Foram feitas duplicatas das placas para cada diluição.

Após completa incorporação, as placas inoculadas foram incubadas invertidas a 37 °C durante 48 horas. Decorrido o período de incubação, procedeu-se a contagem das placas, sendo a média das contagens de colônias multiplicada pelo fator de diluição utilizado e os resultados expressos como UFC/g da amostra.

Foram consideradas, para efeito desta contagem, somente aquelas colônias que apresentavam o mesmo comportamento morfotintorial da linhagem padrão empregada para inoculação (colônias negras, pequenas e brilhantes, com a presença de dois halos, sendo um translúcido e outro opaco) , descartando-se quaisquer outras colônias que porventura viessem a crescer .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Controle microbiológico

Os resultados do controle microbiológico da massa de ricota antes da inoculação confirmaram a boa qualidade do produto, podendo ser observados no Quadro 3.

Em relação à contagem de coliformes totais e fecais, já no teste presumtivo, todos os tubos tiveram comportamento negativo indicando valores menores que 0,3 NMP de coliformes/g de ricota cremosa em todas as amostras, estando de acordo com a legislação.

Em relação ao grupo estafilococos, não foi encontrado nenhum tipo de colônia em todas as amostras, com a metodologia utilizada de contagem em ágar Baird-Parker, sendo os resultados, portanto, inferiores a 1×10^2 UFC/g, valor compatível com aquele estabelecido por lei (Brasil, 2001).

Entretanto, no que diz respeito à contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, sabe-se que é praticamente impossível obter contagens iguais a zero, tanto que em produtos considerados frescos não se exige padrão para este grupo de microrganismos. Ainda assim, esta análise foi realizada como controle da microbiota competidora da bactéria inoculada, o *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos nesta análise variaram de 2×10^2 UFC/g a $2,45 \times 10^4$ UFC/g de ricota. As contagens diminuíram com o aumento do tempo de armazenamento, já que as amostras foram conservadas sob temperatura de geladeira (7 °C).

QUADRO 3 Resultados do controle microbiológico da ricota cremosa¹.

TEMPO (DIAS)	Contagem Total de Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	NMP de Coliformes Totais e Fecais (NMP/g)	Enumer. de <i>Staphylococcus</i> produtores de coagulase (UFC/g)
0	$2,01 \times 10^4$	< 0,3	$< 1,0 \times 10^2$
7	$6,27 \times 10^3$	< 0,3	$< 1,0 \times 10^2$
14	$4,12 \times 10^3$	< 0,3	$< 1,0 \times 10^2$
20	$3,17 \times 10^2$	< 0,3	$< 1,0 \times 10^2$

O microrganismo *S. aureus* vem sendo, com frequência, detectado em produtos de origem animal. Diversos são os relatos de literatura que citam a contaminação de queijo e leite com este patógeno, sem deixar de lado os relatos de surtos de toxinose alimentar (Pereira et al., 1991; Pereira et al., 1994; Carmo et al., 1996; Pereira et al., 1996).

4.2 Influência da nisina no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa

Os valores obtidos, decorrido o tempo de armazenamento, e comparando-se o tratamento controle (0 g/kg de ricota) e o tratamento com nisina (0,1 g/kg ou 100 UI/g), evidenciaram que nesta concentração de nisina comercial (1.000 UI/mg ou 0,5 %) a população de *Staphylococcus aureus* na ricota cremosa permaneceu praticamente com o mesmo comportamento que o tratamento controle durante a curva de crescimento.

Não foram observadas mudanças nas fases de crescimento do *S. aureus*, dentro dos mesmos tratamentos de temperatura e pH, comparando-se o controle e a nisina.

¹ Os resultados presentes no quadro foram obtidos através de média das 3 repetições.

O modo de ação da nisina depende de outros inúmeros fatores já citados anteriormente. Dentre eles, o estado fisiológico do microrganismo sensível tem grande influência na susceptibilidade à ação da nisina; células metabolicamente ativas (fase exponencial) são mais sensíveis. A inibição do crescimento celular persiste enquanto houver nisina ativa remanescente no meio de crescimento. Portanto, quando ocorre uma atuação efetiva da nisina sobre o crescimento microbiano, esta ação geralmente é percebida antes que o microrganismo entre na fase estacionária de crescimento, o que não foi observado em nenhum dos tratamentos deste experimento (Figuras 7, 8 e 9).

O pH é citado como um dos principais fatores que interferem na boa atuação da nisina, já que esta age melhor em pH mais ácido. Estudos demonstraram que a adsorção da nisina à membrana do microrganismo é dependente do pH, com valor mínimo de 3,0 e máximo de 6,5 (Parente et al., 1994; Yang et al., 1992). No entanto, nem mesmo as variações do pH no experimento interferiram na ação da nisina, conforme observado nas Figura 7, 8 e 9.

Na maioria dos estudos realizados com nisina observa-se a falta de uma padronização da unidade em que a mesma é expressa, bem como em alguns deles sequer é citada a atividade da nisina, o que dificulta em muito a comparação de resultados entre diferentes experimentos. Mesmo na legislação brasileira sobre aditivos, a recomendação é de 12,5 mg de nisina/kg de produto acabado, sem, no entanto, ser citada sua atividade em “Unidades Internacionais” (UI), o que facilitaria a padronização.

Broadbent (1989) analisou o efeito da nisina purificada em vários microrganismos causadores de mastite, incluindo o *S. aureus* ATCC 29740, que em leite foi fortemente inibido por 50 µg/mL.

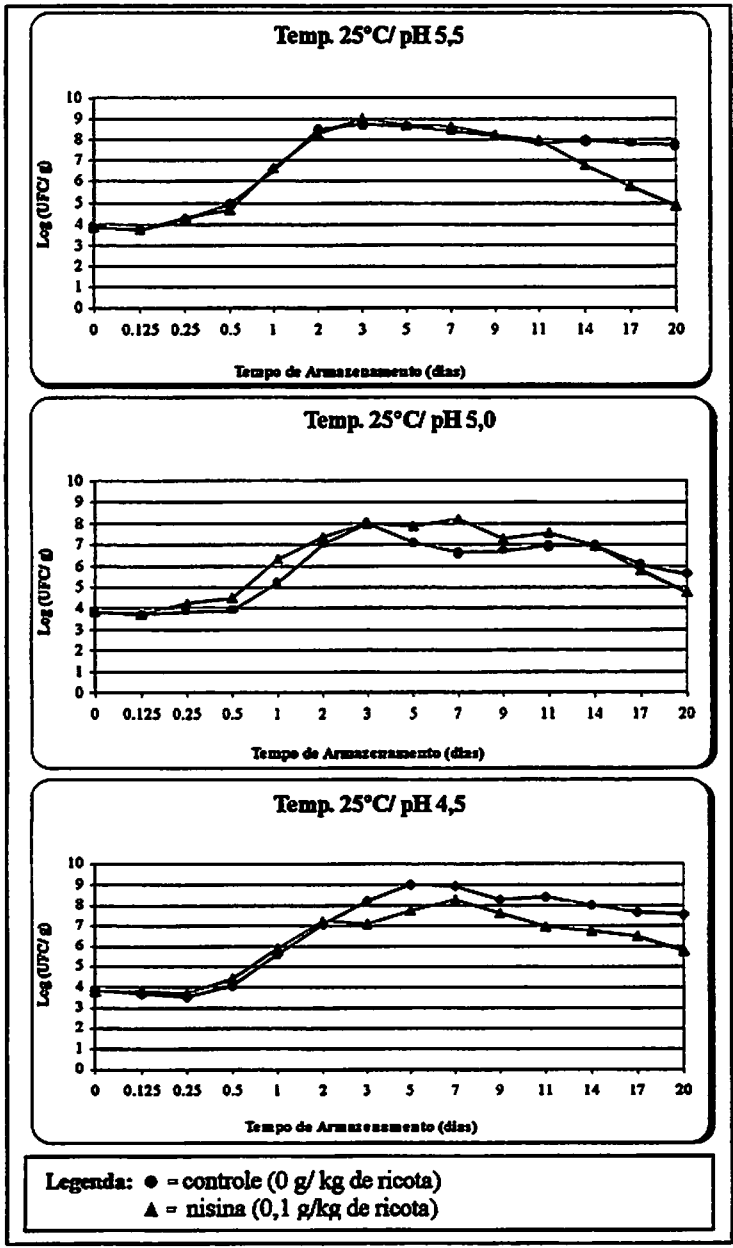


FIGURA 7 Efeito da nisina no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa, nos 3 níveis de pH a temperatura de 25 °C.

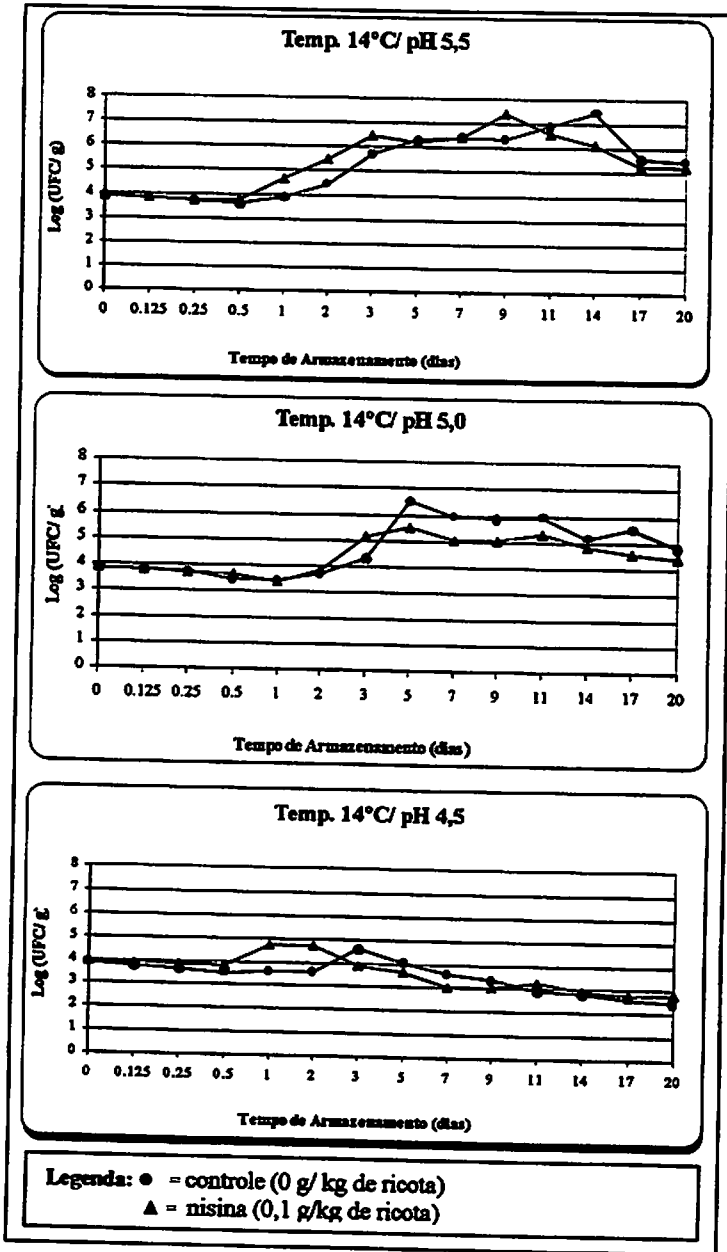


FIGURA 8 Efeito da nisina no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa, nos 3 níveis de pH a temperatura de 14 °C.

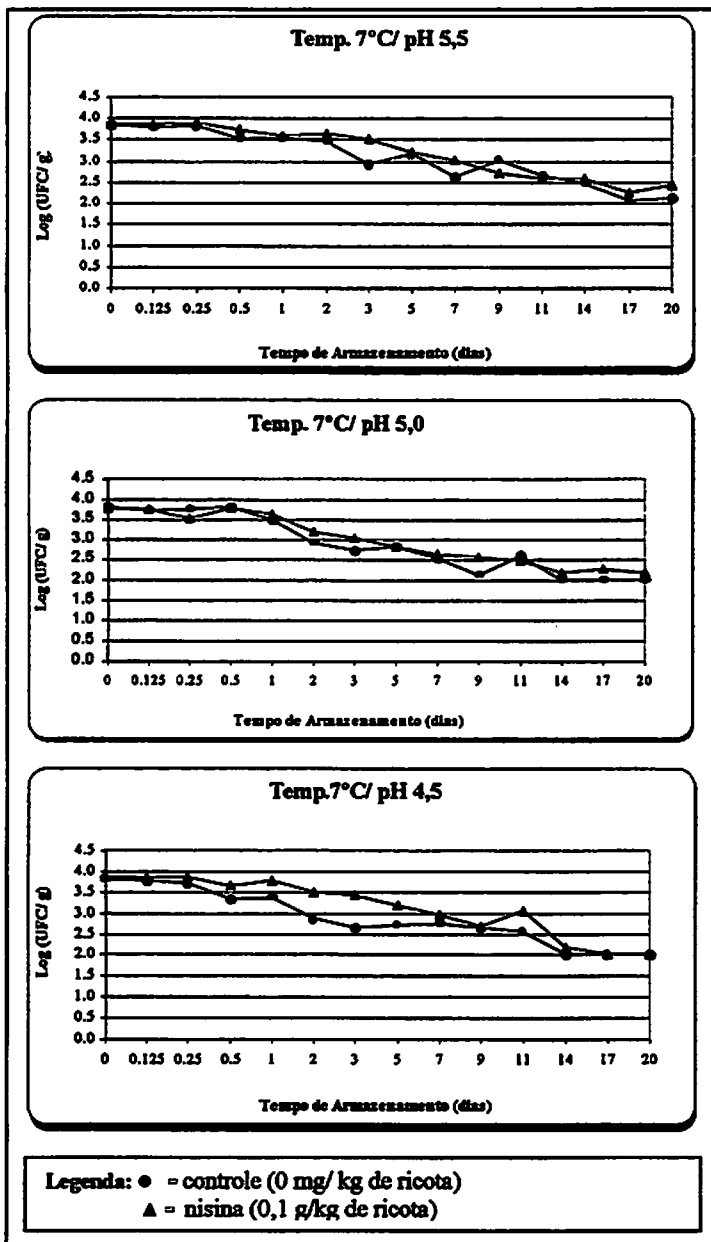


FIGURA 9 Efeito da nisina no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa, nos 3 níveis de pH a temperatura de 7 °C.

Vários estudos referentes ao efeito da nisina sobre outras bactérias têm sido realizados, enfocando os produtos lácteos. Entretanto, o principal alvo de estudo é a *Listeria* sp., utilizando nisina purificada. Em queijo tipo cottage, Ferreira & Lund (1996) conseguiram reduzir o crescimento em 1 ciclo log a 20 °C após 7 dias de incubação e 3 ciclos log a 20 °C após 3 dias de armazenamento, utilizando 500 UI/mL e 2000 UI/mL de nisina, respectivamente.

Davies et al.(1997), analisando o efeito da nisina sobre *Listeria monocytogenes* em queijos tipo ricota, conseguiram inibir o crescimento da bactéria por um período de 11 dias a 7 °C (pH 6,8) e 26 dias na mesma temperatura (pH 5,9) utilizando 1,25 mg/L (50 ppm)de nisina. Quando utilizaram o dobro da concentração de nisina, 2,5 mg/L (100 ppm), o crescimento foi inibido por 8 semanas a 7 °C em pH 6,8, sendo que, em pH 5,9, esta inibição se prolongou até o fim do experimento, que teve duração de 70 dias.

A dosagem de nisina comercial (0,5 a 2% de nisina) com efeito aproximadamente 1.000 vezes menor que o da nisina purificada, recomendada pelos fabricantes, geralmente tem como alvo principal as bactérias esporuladas, uma vez que seu efeito sobre esporos é mais pronunciado (Delves-Broughton, 1990; Spelhaug & Harlander, 1989).

Este pode ser um dos motivos pelos quais a concentração utilizada neste experimento não produziu o efeito esperado, já que sua ação depende mais dos fatores relacionados à espécie bacteriana, como a fase de crescimento celular, e de suas condições de crescimento do que de uma característica relacionada a sua própria molécula (Moreno et al., 1999a). Bruno et al. (1992) também relataram a importância da concentração utilizada na adsorção da nisina à membrana dos microrganismos.

Durante o pré-experimento, a nisina inicialmente foi inoculada durante a fabricação, no entanto, o fato de que a alta temperatura (96 °C), aliada à presença do hidróxido de sódio, ambos utilizados na produção da ricota cremosa, pudesse estar interferindo na boa atuação da nisina levou à mudança da metodologia. Sabe-se que em processamentos em que altas temperaturas são utilizadas, pode-se perder até 20% de nisina. Esta perda também é importante do ponto de vista econômico, já que a nisina é um aditivo de alto custo.

A quantidade de nisina utilizada foi pré-fixada anteriormente, com base na concentração usada na indústria e recomendada pelo fabricante; por isso, durante todo o experimento não foi cogitada a possibilidade de se alterar esta quantidade, justamente para testar se a concentração usada na indústria era eficiente contra o patógeno *S. aureus*.

4.3 Efeito do pH da ricota cremosa no crescimento de *Staphylococcus aureus*

Os resultados obtidos no crescimento microbiano, durante o tempo de armazenamento, confrontando-se o pH 5,5; 5,0 e 4,5 com os diferentes níveis de temperatura e nisina, podem ser observados nas Figuras 10, 11 e 12.

No pH padrão da ricota (5,5) a 25 °C, quase não se observou diferença com o pH 5,0, tendo a curva um comportamento bem semelhante. Entretanto, no pH de 4,5, a fase log teve maior duração, levando cerca de 5 a 7 dias para alcançar o ponto máximo de 9 log(UFC/g), enquanto nos dois outros níveis este tempo foi de 3 a 5 dias (Figura 10).

Em temperatura de 14 °C, o crescimento do *S. aureus* foi mais diferenciado nos 3 níveis de pH. No pH de 5,5, a fase lag foi de 12 horas, enquanto a fase log atingiu o máximo de 7,8 log(UFC/g) em torno do 9º dia. Já no pH 5,0, a fase lag teve maior duração, de 24 horas, chegando à fase log em 5 dias e atingindo o máximo de 6,8 log(UFC/g). Nestes dois valores de pH, o

crescimento experimentou um declínio, chegando, no fim do período de armazenamento, a 5 log(UFC/g). Em pH 4,5, o crescimento foi menor, atingindo somente cerca de 5,8 log(UFC/g) em torno do 1º e 3º dias, demonstrando a partir daí uma queda até o nível de 2,2 log(UFC/g) o que pode ser observado na Figura 11.

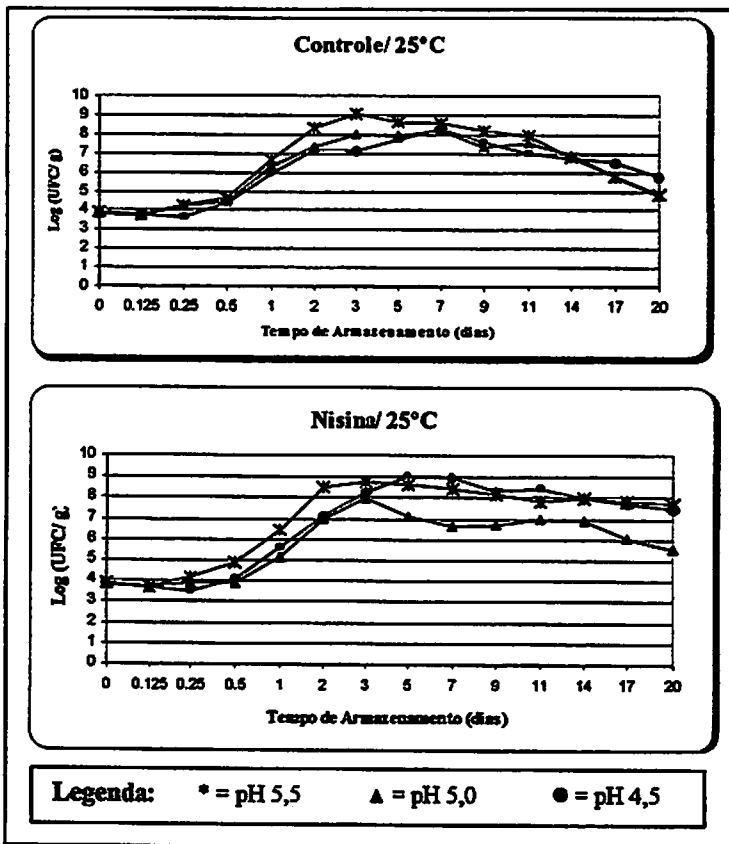


FIGURA 10 Efeito do pH no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa, a temperatura de 25 °C.

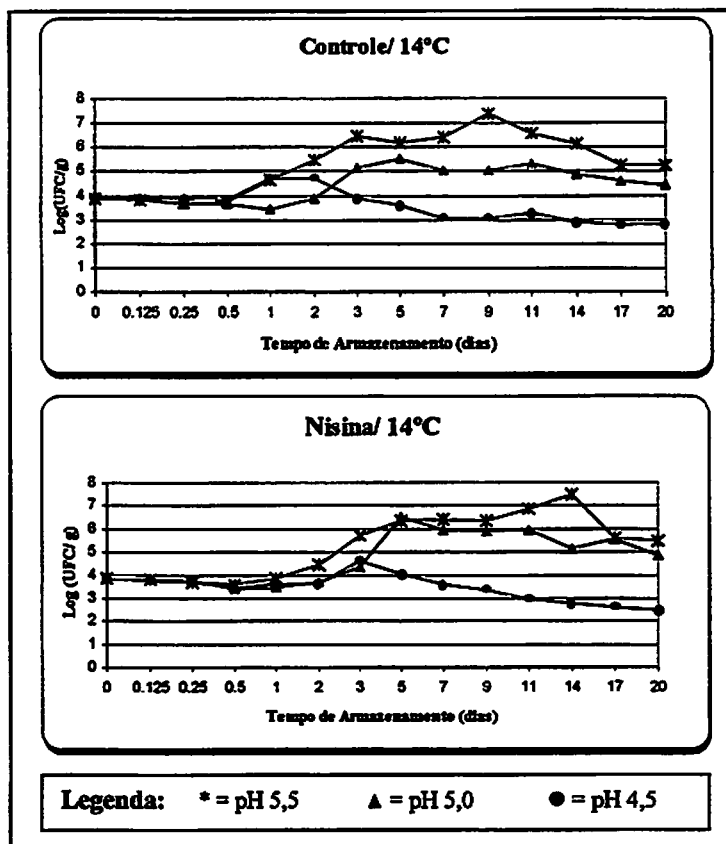


FIGURA 11 Efeito do pH no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa, a temperatura de 14 °C.

Nenhum valor de pH apresentou crescimento do microrganismo à temperatura de 7 °C (Figura 12); pelo contrário, em todos eles se observou um declínio, chegando a atingir, ao final do tempo de armazenamento, cerca de 2,5 a < 2,0 log(UFC/g).

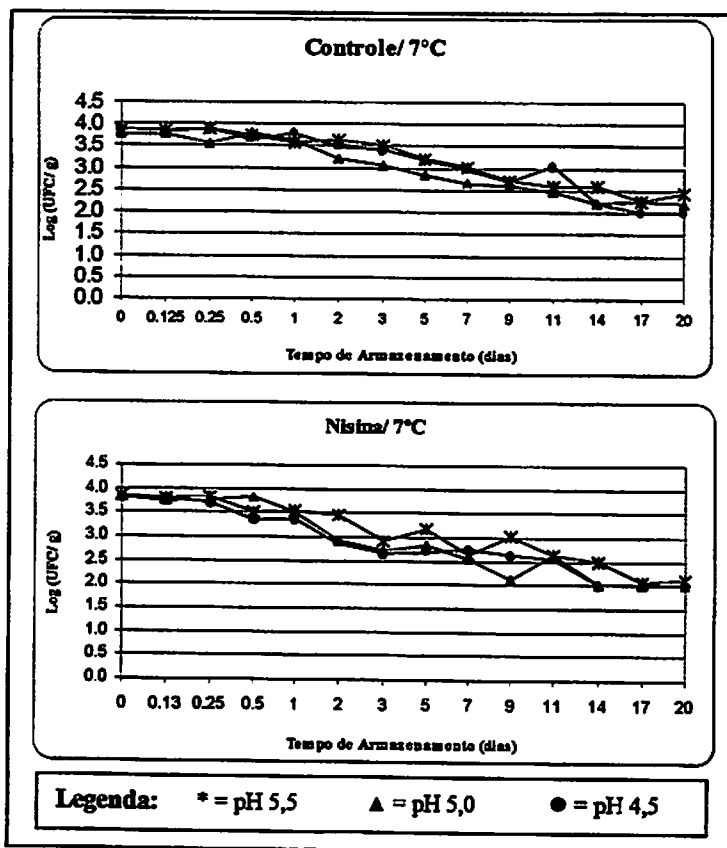


FIGURA 12 Efeito do pH no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa, a temperatura de 7 °C.

Muitos autores também investigam os efeitos do pH de certos alimentos no crescimento de *S. aureus*, demonstrando seu crescimento a valores tão baixos quanto 4,5 a 4,7. Contudo, observa-se que o tipo de acidulante utilizado para ajustar o pH tem efeito significativo no limite inferior de crescimento do *S. aureus* (Tatini, 1973).

Os efeitos na redução do crescimento encontrados neste experimento provavelmente se devem à atuação do ácido láctico como inibidor microbiano. Este ácido orgânico, em sua forma não-dissociada, é apontado como causador de destruição do *S. aureus* em vários estudos realizados por Minor (1970), citado por Tatini (1973). Entretanto, sua aplicação artificial é mais pesquisada em carnes, principalmente em carcaças de frango, sendo considerado um aditivo GRAS (Barbosa-Canóvas, 1998).

Convém mencionar que em produtos lácteos sua aplicação ocorre de forma residual, como no caso da ricota, que para ser fabricada pode ser adicionada deste ácido, o qual fica retido em quantidades não determinadas na massa da ricota.

Em vários tipos de queijos também é notório sua formação natural no período de maturação. Tal fato reduz a acidez do queijo e ao mesmo tempo o protege com seu efeito inibitório, já que este ácido é encontrado em maior quantidade se comparado com os demais ácidos orgânicos produzidos no queijo, exceto em queijos Suiços (Bersford et al., 2001).

O efeito inibidor do ácido láctico teve grande importância, sem, no entanto, colaborar no efeito da nisina.

4.4 Influência da temperatura no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa

No que diz respeito à temperatura, o comportamento da curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* demonstrou-se bem distinto nas 3 diferentes temperaturas estudadas (Figuras 13, 14 e 15).

A 25 °C, o microrganismo teve fase lag de aproximadamente 3 a 6 horas, atingindo seu crescimento máximo entre 3 a 5 dias, com 9 a 8 log(UFC/g). Ao fim do tempo de armazenamento, nesta temperatura, observa-se pequeno declínio na curva de crescimento do *S. aureus*, atingindo entre 5 a 6 log(UFC/g) (Figura 13).

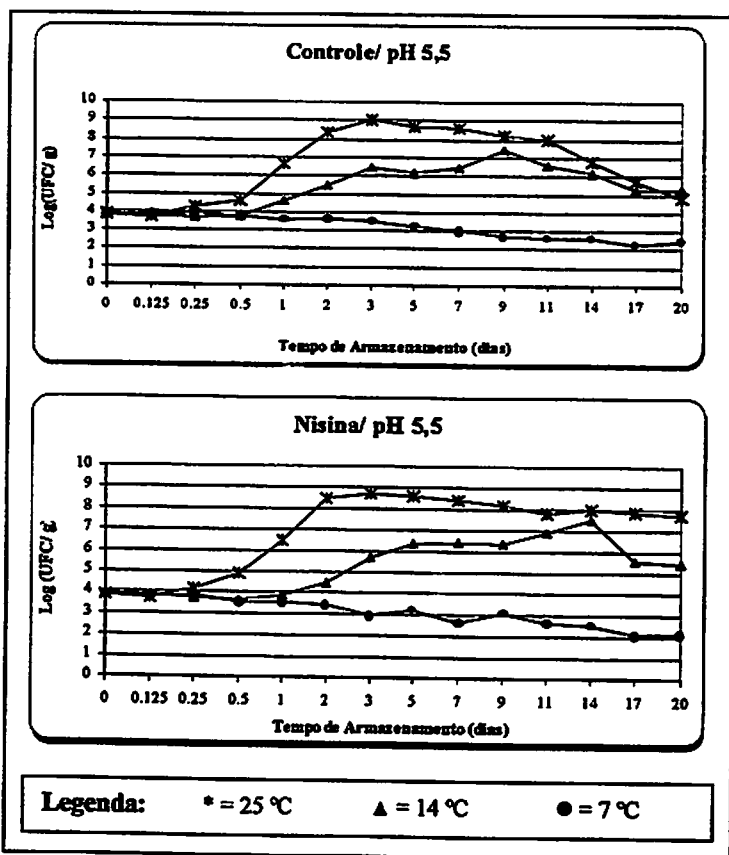


FIGURA 13 Efeito da temperatura no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa submetida a diferentes níveis de nisina em pH 5,5.

O *S. aureus* a 14 °C variou significativamente seus parâmetros de crescimento. A fase lag, por exemplo, teve variação de 12 a 48 horas; após este período, o microrganismo iniciou sua fase de crescimento logarítmico, chegando a atingir o máximo de 4,4 log(UFC/g) a 7,6 log(UFC/g) entre o 5º e 9º dias, dependendo do pH da ricota (Figura 14).

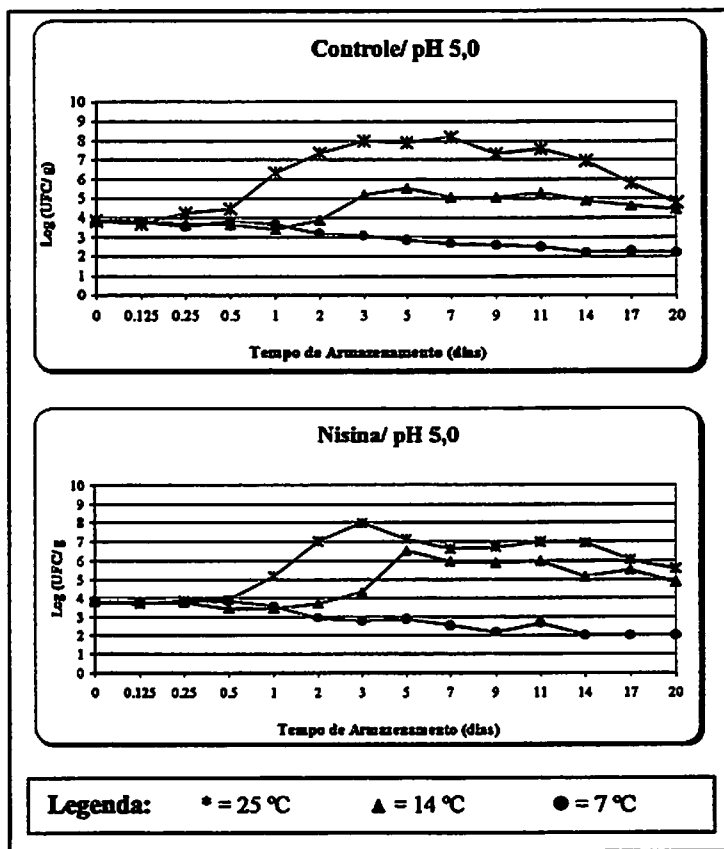


FIGURA 14 Efeito da temperatura no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa submetida a diferentes níveis de nisina em pH 5,0.

No pH 4,5 a temperatura de 14 °C ocorreu queda acentuada na curva de crescimento devido a morte celular. Neste tratamento o microrganismo atingiu seu crescimento máximo, de cerca de 4,8 log(UFC/g), em torno do 1° ao 3° dias de armazenamento, caindo rapidamente a partir deste ponto. No último dia de armazenamento da ricota, as análises detectaram apenas cerca de 2,3 log(UFC/g), como podemos observar na Figura 14.

Na temperatura de 7 °C, não foi observado crescimento algum do microrganismo, em nenhum dos níveis de pH e nisina. Ao contrário disto, houve um decréscimo de microrganismos, chegando em algumas análises, ao final do período de armazenamento, a níveis não detectáveis (< 2 logUFC/g) pelo método utilizado para a contagem (Figura 15).

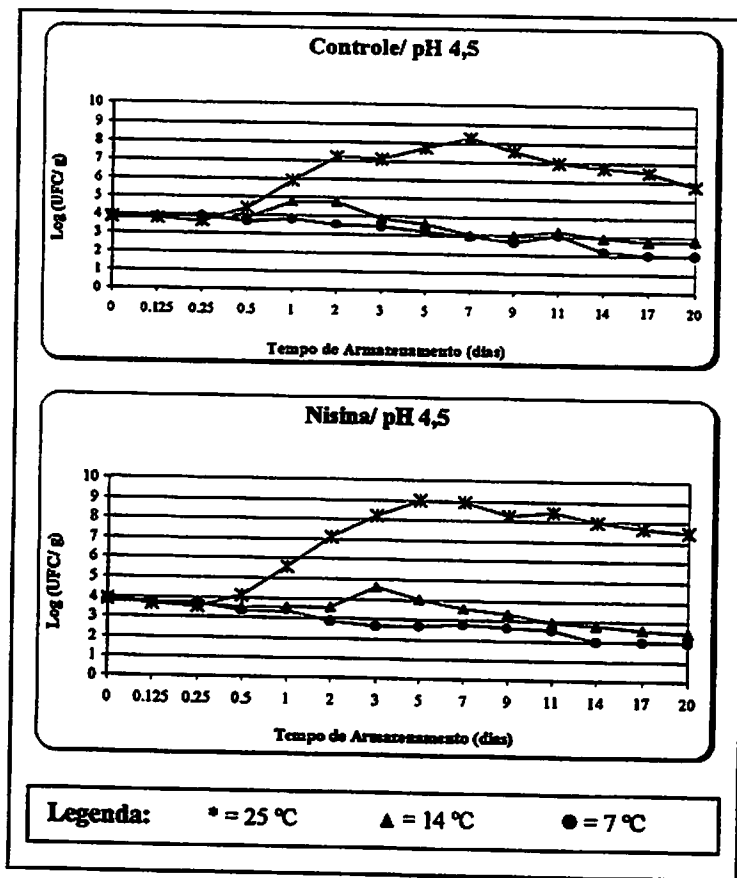


FIGURA 15 Efeito da temperatura no crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa submetida a diferentes níveis de nisina em pH 4,5.

Schimitt et al. (1990), analisando o intervalo de crescimento de cepas de *S. aureus*, encontraram, em caldo BHI, limites de crescimento entre 6,5 °C a 39,5 °C. Já Angelotti (1961), citado por Smith (1983), cita limites de 6,7 °C a 45,6 °C, sem crescimento, a temperaturas menores que 5,6 °C. Entretanto, Pereira (2000), estudando o crescimento de *Staphylococcus* sp. em queijos tipo Minas estocados a -20°C por 20 meses, detectou um crescimento de 1 ciclo log.

A contribuição mais importante para a diminuição do crescimento microbiano a baixas temperaturas é a mudança na estrutura da membrana, principalmente no diz respeito aos fosfolipídeos de membrana, o que afeta o deslocamento de nutrientes e o sistema enzimático da célula.

As temperaturas de refrigeração ainda são consideradas a principal arma contra o crescimento microbiano, principalmente com o advento da cadeia de frio.

4.5 Aspecto geral da ricota cremosa no decorrer do armazenamento

Com relação ao aspecto visual e ao odor da ricota cremosa durante o tempo de armazenamento, existem algumas observações importantes a serem feitas.

Após a fabricação não foi observado dessoramento no produto.

As ricotas conservadas à temperatura de 7 °C não apresentaram alterações no aspecto visual e nem mesmo no odor até o fim dos 20 dias de armazenamento. No entanto, não foram realizadas análises sensoriais para se avaliar o sabor da mesma, que poderia estar alterado devido a reações enzimáticas. A análise sensorial não foi realizada pois o produto estava inoculado com o patógeno *S. aureus*, o que poderia oferecer risco aos provadores ao ser ingerido.

Nas demais temperaturas, em que o crescimento microbiano foi mais intenso, em torno do 9º a 11º dias, já era possível sentir o odor fétido do produto. Além disso, as ricotas a esta temperatura demonstraram um aspecto gosmento e pegajoso em torno do 14º a 17º dias.

A presença de fungos e leveduras também se tornou evidente na temperatura de 25 °C a partir do 14º dia, sendo que as leveduras apresentaram crescimento em ágar Baird-Parker em forma de colônias branco-acinzentadas, brilhantes e bem pequenas que ao microscópio apresentavam características de leveduras. As colônias de fungos de várias colorações se tornaram visíveis na superfície das ricotas. Davies et al. (1997) também relataram o crescimento de fungos em experimento com *Listeria monocytogenes* em ricota, sendo necessário o uso de sorbato de potássio a 500 mg/L.

5 CONCLUSÕES

- O controle microbiológico da massa de ricota antes da inoculação demonstrou um produto de boa qualidade.
- A nisina comercial (1.000U.I./mg), na concentração utilizada (100U.I./g de ricota) não foi eficaz na redução da população de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa, nas condições deste experimento.
- A temperatura de 7 °C apresentou os melhores resultados na inibição do crescimento do microrganismo estudado.
- O pH 4,5 modificou significativamente o comportamento da curva de crescimento do *Staphylococcus aureus* (morte celular), principalmente nas temperaturas 7 °C e 14 °C.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos avaliando o efeito da nisina sobre microrganismos patogênicos, no próprio alimento, ainda são escassos; portanto, há muito a ser explorado.

Como já foi citado anteriormente, a desigualdade entre unidades se torna um problema na padronização e comparação entre os trabalhos. Com isso, quando se está avaliando a ação da nisina sobre um determinado microrganismo as unidades apresentadas podem se tornar um impedimento na comparação.

Alguns trabalhos partiram para o bioensaio, analisando a atividade da nisina sobre uma ou várias cepas de microrganismos patogênicos e não-patogênicos, importantes pelo ponto de vista da deterioração dos alimentos. Nesta linha de pesquisa, o bioensaio foi utilizado com os mais variados objetivos: avaliar a quantidade de nisina inicial e residual no alimento; analisar o efeito e o modo de ação sobre determinado microrganismo em diferentes fases de crescimento; determinar a concentração mínima inibitória (MIC) da nisina contra o microrganismo estudado e determinar a atividade da nisina no alimento e em soluções entre outros.

No caso da cepa de *Staphylococcus aureus*, seria interessante analisar sua MIC, uma vez que este microrganismo apresenta, em geral, resistência a vários antibióticos e já foram descritas cepas resistentes à nisina. O efeito também poderia ser analisado para outras cepas desta mesma espécie, assim como a produção da enterotoxina também poderia ser avaliada.

A importância de utilizar a nisina comercial, esta no fato de que ela confere melhor aplicação para o ramo da indústria, maximizando seu aproveitamento, uma vez que se trata de um produto de alto custo.

Notamos, portanto, que há inúmeras possibilidades a serem pesquisadas para se conhecer a fundo a nisina e sua atuação sobre vários microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. A. H.; MOUSTAFA, M. K.; MARTH, E. H. Growth and enterotoxin by *Staphylococcus aureus* in Whey from the Domiati Cheese. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 46, n. 3, p. 235-237, Mar. 1983.

AKHTAR, M.; PARK, C. E.; RAYMAN, K. Effect of urea treatment on recovery of Staphylococcal enterotoxin A from heat-processed foods. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 62, n. 9, p. 3274-3276, Sept. 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO - ABIQ. **Dados de produção Brasil em toneladas de produtos lácteos – 2000.** São Paulo, 2001.

BAIRD-PARKER, A. C. The staphylococci – an introduction. *Journal Applied Bacteriology*, New York, p. 15-85, 1990. Simposium supplement.

X BALABAN, N. ; RASOOLY, A. Review: Staphylococcal enterotoxin. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 1-10. Oct. 2000.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. **Conservación no térmica de alimentos.** Zaragoza: Acribia, 1998. 272 p.

BEHME, R. J.; SHUTTLEWORTH, R.; McNABB, A.; COLBY, W. D. Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 34, n. 12, p. 3075-3084, Dec. 1996.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, Barking, v. 11, n. 4/7, p. 259-274, 2001.

X BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 91-100, Mar. 1990.

B BERGDOLL, M. S. Staphylococcal intoxications. In: DOYLE, M. P. **Foodborne bacterial pathogens.** New York: INC, 1989. p. 463-523.

BERGDOLL, M. S. Staphylococcal intoxications. In: RIEMANN, H.; BRYAN, F. L. (Ed.). **Food-Borne Infections and Intoxications**, 2. ed. London: Academic Press, 1983. p. 443-494.

BERGDOLL, M. S.; REISER, R. Application of radioimmunoassay for detection staphylococcal enterotoxin in foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 43, n. 1, p. 68-72, Jan. 1980.

BETLEY, M. J.; HARRIS, T. O. Staphylococcal enterotoxins: genetic characterization and relationship between structure and emetic activity. **Food Microbiology**, London, v. 11, n. 2, p. 109-121, Apr. 1994.

BOOTH, I. R. ; KROLL, R. G. The preservation of foods by low pH. In: GOULD, G. W (Ed.). **Mechanisms of action of food preservation procedures**. London: Elsevier, 1989. p. 119-160.

BOZIARIS, I. S. ; ADAMS, M. R. Effects of chelators and nisin produced *in situ* on inhibition and inactivation of gram negatives. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 2/3, p. 105-113, Dec. 1999.

BRABES, K. C. S. *Detecção de Staphylococcus aureus e suas toxinas em leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite*. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRACEY, D.; HOLYOAK, C. D.; COOTE, P. J. Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Sacharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular pH? **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, n. 6, p. 1056-1066, Dec. 1998.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Brasília, 2001.

BREUKINK, E.; KRUIJFF, B. The lantibiotic nisin, special case or not ? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1462, n. 1/2, p. 223-234, Dec. 1999.

BROADBENT, J. R.; CHOU, Y. C.; GILLIES, K; KONDO, J. K. Nisin inhibits several gram positive, mastitis-causing pathogens. **Journal of Dairy Science**, Washington, v. 72, n. 12, p. 3342-3345, 1989.

BRUNO, M. E. C.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 58, n. 7, p. 2255-2259, 1992.

BRUNO, M. E. C.; MONTVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 59, n. 9, p. 3003-3010, Sept. 1993.

CARMO, L. S.; VIEIRA, A. C.; REIS, J. D. A. P.; NASCIMENTO, R. S.; PEREIRA, M. L.; SANTOS, E. J.; BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 122-125, abr./jun. 1996.

CERQUEIRA, M. M. O. P. et al. Frequência de *Listeria* sp e de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 1995, Juiz de Fora, Minas Gerais. Anais.... Juiz de Fora, Minas Gerais, 1995. p. 95-97.

CHIAPPINI, C. C. J.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação do soro de queijo quanto à *Staphylococcus aureus*. *Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"*, Juiz de Fora, v. 50, n. 292, p. 17-21, 1995.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (1995) Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System and Guidelines for its application. Annex to CAC/ RCP 1 – 1969, Rev. 3. 1997.

COSSEDU, A. M. et al. Ricotta bovina fresca confezionata: caratteristiche microbiologiche di interesse igienico-sanitario. *Latte*, v. 22, n. 7, p. 76-81, 1997.

CZOP, J. K.; BERGDOLL, M. S. Synthesis of enterotoxin by L-forms of *Staphylococcus aureus*. *Infectology and Immunology*, Washington, v. 1, p. 169-173, 1970.

DAVIES, E. A.; BEVIS, H. E. ; DELVES-BROUGHTON, J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in Ricotta - type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 24, n. 5, p. 343-346, May 1997.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its use as a food preservative. *Food Technology*, Chicago, v. 44, n. 11, p. 100-117, Nov. 1990.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

EAPEN, K. C.; SANKARAN, R.; VIJAYARAGHAVAN, P. K. The present status on the use of nisin in processed foods. *Journal of Food Science and Technology*, London, v. 20, n. 5, p. 231-240, May 1983.

EKLUND, T. The effect of sorbic acid an esters of para-hydroxybenzoic acid on the proton motive force in *Escherichia coli* membrane vesicle. *Journal General and Microbiology*, Reading, v. 131, n. 1, p. 73 – 76, Jan 1985.

FERREIRA, M. A. S. S.; LUND, B. M. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 22, n. 6, p. 433- 438, June 1996.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B. D. G. M.; FRANCO, M. L. *Microbiologia de los Alimentos*. Porto: Artmed, 1996. 424 p.

FRAZIER, W. C. *Microbiologia*. Zaragoza: Acribia, 1981. 512 p.

FURTADO, M. M. *Tecnologia de queijos: manual técnico para produção industrial de queijos*. São Paulo: Pipemar, 1984. 118 p.

GAO, F. H.; ABEE, T.; KONNINGS, W. N. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 57, n. 8, p. 2164-2170, Aug. 1991.

GAY, J. M. ; FOX, L. K. *Staphylococcus aureus* detection: does the STAPH-AB test fit? 2000. Disponível em: <<http://www.edu.biotech/worksnop/activity/act16/annexd3.htm>>. Acesso em: mar. 2002.

GOMES, H. A. & GALLO, C. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “Minas Frescal” comercializados em Piracicaba-SP. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 15, n. 2, p. 158-161, jul./dez. 1995.

GÓMEZ, R. C.; CARVALHO, E. P.; COSTA, L. C. G. Condições microbiológicas de queijo “Minas Frescal” comercializados em Lavras – MG. *Ciência Prática*, Lavras, v. 7, n. 2, p. 111-121, jul./dez. 1983.

GONÇALVES, P. M. R. Toxinfecções alimentares: uma revisão. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 12, n. 53, p. 38- 44, jan./fev. 1998.

HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus* : Production of extracelular compounds and behavior in foods – a review. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 52, n. 4, p. 267-282, Apr. 1989.


HENNING, S.; METZ, R.; HAMMES, W. P. Studies of the mode of actions of nisin. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 3, n. 3, p. 121-134, July 1986.

HOLT, J. G. et al. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Willians 1994. p. 532.


INTERNATIONAL COMMISSION MICROBIAL SPECIFICATION FOR FOODS – ICMSF. *Microorganismos de los alimentos*. 1- Técnicas de análises microbiológicas. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1992. 804 p. Apud: GONÇALVES, P. M. R. Toxinfecções alimentares: uma revisão. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 12, n. 53, p. 38-44, jan./fev. 1998.

KAWAI, Y.; TAKADA, H.; KONNO, K.; SAJOTOH, B.; KITAZAWA, H.; SAITO, T.; NAKAJIMA, H.; HASHIVA, H.; ITOH, T. Nisin Z produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SBT1212 and comparison of antimicrobial activity with nisin A. *Milchwissenschaft*, Munich, v. 54, n. 11, p. 616-620, Nov. 1999.

KLOSS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenback 1884, 18AL, (Nom. cons. Opin. 17 Jud comm. 1958, 153). In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; HOLT, J. G. (Ed.). *Bergey's manual of sistematic bacteriology*. Baltimore: Williams, 1986. v. 2.

 LEITE, R. L. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos “Minas frescal” e “Minas padrão” elaborados com leite proveniente de vacas com mastite sub-clínica. Lavras: UFLA, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

- LEPOUTRE, A. et al. Les toxi-infections alimentaires en 1993. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, Rome, n. 52, p. 245-247, 1994.
- LIU, W.; HANSEN, N. The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 59, n. 8, p. 648-651, Aug. 1993.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock biology of microorganisms*. 8. ed. New Jersey: Perntice Hall, 1996. 986 p.
- MARCHISIO, E.; SONCINI, G.; CANTONI, C. Alterazioni di ricotte. *Industrie Alimentari*, Milan, v. 38, n. 379, p. 265-270, mar. 1999.
- MARRACK, P.; KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, Washington, v. 248, n. 4956, p. 705-711, May 1990.
- MEYRAND, A.; ATRACHE, V.; BAVAI, C.; MONLET, M. P.; VERNOZZ-ROZAND, C. Evaluation of an alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 28, n. 6, p. 411-415, June 1999.
- MING, X.; DAESCHEL, M. A. Correlation of celular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 58, n. 4, p. 416-420, Apr. 1995.
- MOHALLEM, M. L. Utilização da nisina na destruição térmica de *Bacillus stearothermophilus* em homogeneizado de cogumelos pH 6,2. 1994. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.
- MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; BALDINI, V. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Efeito e Modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 19, n. 1, p. 23-28, jan./abr. 1999a.
- MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Nisina no controle de bactérias esporogênicas em produtos lácteos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, Campinas, v. 33, n. 2, p. 215-228, jul./dez. 1999b.


MOTLHAGH, A. M.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Viability loss of foodborne pathogens by stater culture metabolites. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 54, n. 8, p. 873-878, Aug. 1991.

NASCIMENTO, D.; SABIONI, J. G.; PIMENTA, N.; XANDÓ, S. R. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas-Frescal da cidade de Ouro Preto (MG). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 120-129, abr./jun. 1985.

NEWSOME, R. L. *Staphylococcus aureus*. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 194-195, Apr. 1988.

X
NISKANEN, A.; KOIRANEN, L. Correlation of enterotoxin and termonuclease of Staphylococcal strains isolated from different sources. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 40, n. 8, p. 543-548, Aug. 1977.

X
NOTERMANS, S.; WERNARS, K. Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 91-102, Jan. 1991.

PANETTITA, J. C. Ricota, um produto dietético ideal. **Revista do Instituto de Laticínios "Candido Tostes"**, Juiz de Fora, n. 177, p. 13-14, jan./fev. 1975.

PARENTE, E.; RICCIARD, A.; ADDARIO, G. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. **Applied Microbiological and Biotechnology**, New York, v. 41, n. 4, p. 388-394, June 1994.

PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for detection of Staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 2, p. 677-681, Feb. 1994.

PARK, C. E.; SZABO, R. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D in foods. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 32, n. 9, p. 723-727, Sept. 1986.

PEREIRA, M. L. **Estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas estafilocócicas e relato de um surto por espécie coagulase positiva**. 1996. p. 143. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

- PEREIRA, M. L. Queijo "Tipo Minas" estocado a baixas temperaturas. XI - Comportamento bioquímico de *Staphylococcus* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, Fortaleza. Livro de Resumos. . . Ceará, 2000. p. 4, 165.
- PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; LARA, M. A.; DIAS, R. S.; BERGDOLL, M. S. Enterotoxigenic staphylococci from food handlers working in an industrial kitchen in Belo Horizonte, MG (Brazil). *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 161-165, set. 1994.
- PEREIRA, M. L.; LARA, M. A.; DIAS, R. S.; CARMO, L. S. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "Tipo Minas". *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 349-350, dez. 1991.
- RAY, B. Nisin of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* as a food biopreservative. In: RAY, B.; DAESCHEL, M. (Ed.) *Food biopreservatives of microbial origin*. New York: CRC Press, 1992. p. 89-101.
- RICHARDS, N. S. P. S. Segurança alimentar: como prevenir contaminações na indústria. *Food Ingredients*, São Paulo, v. 18, p. 16-30, mai0/jun. 2002.
- RODRIGUES, F. T. et al. Características microbiológicas de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Viçosa-MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 7., 1995, Juiz de Fora. *Anais... Juiz de Fora*, 1995. p. 233-235.
- 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, July 2002.
- SABIONI, J. G. et al. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo Minas em Ouro Preto(MG). *Higiene Alimentar*, v. 8, p. 22-23, 1994.
- SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, Tnase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 1-20, Aug. 1990.
- SHEBUSKI, J.B.; VILHELMSSON, O.; MILLER, K. J. Effects of growth at low water activity on the thermal tolerance of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 63, n. 9, p. 1277 - 1281, Sept. 2000.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; PINTO, S. M.; ABREU, L. R.; DIONÍZIO, F. L.; PADUA, I. P. M. Aspectos microbiológicos de ricotas comercializadas na região de Lavras- Minas Gerais – Resultados parciais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, Fortaleza. Livro de Resumos.... Fortaleza, 2000. v. 1, p. 1. 1-4. 158, p. 4. 84. 8 a 10 de agosto.

SINCOWEAY, H.; MIYAGAWA, E.; KUME, T. Cellular fatty acid composition in staphylococci isolated from bovine milk. *National Institute of Animal Health Quarterly*, Tokyo, v. 21, n. 1, p. 14-20, 1981.

SMITH, J. L.; BUCHANAN, R. L.; PALUMBO, S. A. Effect of food environmental on Staphylococcal enterotoxin synthesis: A review. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 46, n. 6, p. 545-555, June 1983.

e
+ SPEECK, M. L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2. ed. Washington: American Public Health Association, 1984. p. 411-427.

SPELHAUG, S. R.; HRLANDER, S. K. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 52, n. 12, p. 856-862, Dec. 1989.

STEVENS, K. A.; SHELDON, B. W.; KLAPES, N. A. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 57, n. 12, p. 3613-3615, Dec. 1991.

e
X SU, Y. C.; WONG, A. C. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 61, n. 4, p. 1438-1443, Apr. 1995.

TATINI, S. R. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxin. *Journal of Milk food Technology*, Des Moines, v. 36, n. 11, p. 559-563, 1973.

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

X TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586 p.

VALLE, J. et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 5, p. 1323-1326, May 1990.

X VERNOZY-ROSAND, J.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUM, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goat's milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 271-280, July 1996.

WALLS, I.; SCOTT, V. N.; BERNARD, D. T. Validation of predictive mathematical models describing growth of *Staphylococcus aureus* 196E. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 6, p. 608 – 614, June 1996.

YANG, R.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 10, p. 3355-3359, Oct. 1992.

YEZZI, T. L.; AJAO, A. B. ; ZOTTOLA, E. A. Increased nisin in Cheddar-Type Cheese prepared with pH control of the bulk starter cultura system. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 10, p. 2827-2831, Oct. 1993.