



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANNA CAROLINA LEONELLI PIRES DE CAMPOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS
NATURAIS APLICADOS EM QUEIJOS**

Londrina
2017

ANNA CAROLINA LEONELLI PIRES DE CAMPOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS
NATURAIS APLICADOS EM QUEIJOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato
Co-orientador: Prof. Dr. Eder Paulo Fagan

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Campos, Anna Carolina Leonelli Pires de.

Atividade antimicrobiana de compostos naturais aplicados em queijos / Anna Carolina Leonelli Pires de Campos. - Londrina, 2017.
96 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.

Coorientador: Eder Paulo Fagan.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.
Inclui bibliografia.

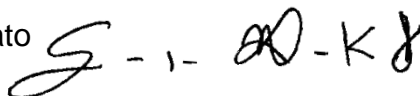
1. Óleo essencial de orégano - Tese. 2. Mel - Tese. 3. Contaminação microbiana - Tese. I. Nakazato, Gerson . II. Fagan, Eder Paulo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

ANNA CAROLINA LEONELLI PIRES DE CAMPOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS
NATURAIS APLICADOS EM QUEIJOS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gerson Nakazato



UEL

Prof. Dr. Alessandro Nogueira

UEPG

Prof^a. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo

UEL

Prof^a. Dr^a. Jéssica Caroline Bigasky Ribeiro

UEPG

Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi

UEL

Londrina-PR, 26 de julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar. Tenho certeza que a cada decisão tomada, cada etapa da minha vida, Ele esteve presente, me dando luz e sabedoria para continuar sempre em frente.

Aos meus pais, Ana Maria L. P. de Campos e João Pires de Campos pelo incentivo, carinho, amor, apoio e por não me deixarem desistir dos meus sonhos e objetivos.

Aos meus irmãos, Pedro E. L. P. de Campos, Anna Carlota L. P. de Campos e, principalmente, Anna Laura L. P. de Campos, pela companhia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gerson Nakazato, pela oportunidade de fazer parte do melhor laboratório do mundo, por aprender a cada dia com o senhor. Obrigada pela confiança, paciência, pelos ensinamentos, por todas as oportunidades que me foram dadas e, principalmente, por deixar que eu continuasse trabalhando com alimentos. Obrigada também pelas risadas, piadas, churrascos e momentos de descontração.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Eder P. Fagan, por me acompanhar desde a graduação, assistindo e contribuindo em cada etapa da minha vida profissional e acadêmica. Obrigada por todos os conselhos, ensinamentos, dias de desabafo, pelas tantas oportunidades que me deu até hoje e por deixar as portas sempre abertas pra mim.

À Prof. Dr. Renata K. T. Kobayashi por ser um exemplo de professora, de pesquisadora, de dedicação e, principalmente, pela confiança que me foi depositada. Professora foi uma honra ter feito parte da sua equipe e ter aprendido tanto com a senhora.

À Prof. Dra. Jacinta Pelayo por estar sempre disposta a ajudar, a participar da minha caminhada nesses anos. Obrigada pelos ensinamentos, conversas e *primers* que me foram emprestados para a continuidade das análises.

Ao Prof. Dr. Alessandro Nogueira, pela honra em tê-lo presente em mais uma etapa da minha vida e por ter me ensinado a gostar ainda mais de queijos. Por sempre estar disposto a ajudar, aconselhar, pela oportunidade de fazer parte da ETLQueijos e continuar fazendo parte da equipe mesmo distante.

À Prof. Dra. Jéssica Bigaski, a amiga que “o queijo” me deu. Obrigada pela disposição em me ajudar, tirar dúvidas, pelo companheirismo em aula e fora dela, pelas cervejas que tomamos e por tudo o que eu aprendi e continuo aprendendo com você.

Aos meus queridos membros do quarteto fantástico da *E. coli*, Juan Puño-Sarmiento, Leonardo Medeiros e Luiz Eduardo Gazal, pela paciência (haja paciência!) que tiveram comigo desde o início, pela ajuda imprescindível, pelos puxões de orelha, brincadeiras, chopps e risadas. Obrigada por sempre estarem presentes e dispostos a tirar minhas eternas dúvidas. Sem vocês eu não seria nada!

À família NIP 3, o melhor laboratório do planeta Terra. Por me aguentarem desde cedo, por compreenderem a minha agitação, por sempre estarem dispostos a ajudar e, principalmente, por estarem ao meu lado, todos os dias, até quando eu não estava presente com frequência. Obrigada pelos conselhos, união e auxílio nos momentos difíceis. É difícil citar nomes, afinal somos mais de 30, no entanto cada um, com seu jeito, tem um lugar especial no meu coração. Vocês são demais!

Em especial, agradeço a Msc. Renata Nandi, por ter caído do céu, como um anjo, para me ajudar no desenvolvimento de parte das análises realizadas nessa tese. Obrigada pelo empenho, dedicação e por ter escolhido me ajudar, dentre tantos outros projetos que lhe foram apresentados. Agradeço também aos doutorandos Victor Clébis e ao Erick Nishio pelo auxílio com os méis e a Sara Scandorieiro pela ajuda com o óleo essencial de orégano.

Aos meus amigos, professores Claudia Yurika Tamehiro, Liza Ogawa, Petrônio P. Porto, Emília de Paiva Porto e Francielle G. Zacarias pela amizade, incentivo e conselhos preciosos.

À Elaine Silveira e aos estagiários (que formaram, mudaram de área e aos que permaneceram) do Laboratório de Análises de Leite e Derivados do CMETL – Norte Pioneiro, que me auxiliaram na produção dos queijos, nas análises de outros tantos e, principalmente, pela presteza e amizade de vocês.

Aos professores e alunos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (NIP 5), por ceder equipamentos para os ensaios desta tese.

Aos professores e alunos do Laboratório de Micologia e Métodos Alternativos a Experimentos com Animais (NIP 9), por ceder os fungos para o experimento, pelos ensinamentos e discussões de resultados. Obrigada por me acolherem tão bem, pelas risadas e companheirismo até nos finais de semana.

As amigadas que fiz aqui e que levarei para a vida. Maria Alice Galvão, Eduardo Rimoli (Bim), Andrey Cordeiro, Aline Dias Valério, Erica P. Figueiredo, Sara Scandorieiro (supracitada), Carolina Galdino, Larissa Ciappina, vocês foram primordiais. Obrigada pelos momentos de descontração, por alegrarem meus dias, tardes e noites e, principalmente, pela amizade de vocês.

Aos funcionários, Ediel, Osvaldo Lopes e Yara, que auxiliaram na limpeza e esterilização das vidrarias, meios e reagentes que usei para o desenvolvimento dessa tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia pela oportunidade de trabalhar com excelentes profissionais. Agradeço à UEL, a UENP e a Fundação Araucária pelo apoio e suporte financeiro para realização deste estudo.

Aos meus queridos amigos que entenderam e me apoiaram quando não tinha tempo para eles e a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

CAMPOS, Anna Carolina Lionelli Pires de. **Atividade antimicrobiana de compostos naturais aplicadas em queijos**. 2019. 99f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O queijo artesanal é amplamente consumido no Brasil, no entanto por, em sua maioria, ser fabricado com leite cru, pode estar contaminado com bactérias patogênicas. A presença de fungos e bactérias é um problema para o setor industrial, visto que pode ocasionar defeitos nos queijos, e levar a consideráveis perdas econômicas. Neste estudo, avaliamos a presença de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em queijos artesanais oriundos de diferentes estados do Brasil e, posteriormente, analisamos a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano (OEO), e da associação de méis de *Scaptotrigona bipunctata* Lepelletier 1836 (HSB) e de *Apis mellifera* Latreille africanizada (HAM), no controle de microrganismos contaminantes de queijos durante o processo de maturação. A partir de 147 amostras de queijos, foram identificados 25 isolados de *S. aureus* (10 amostras de queijo) e 39 de *E. coli* (29 amostras de queijos). Entre esses isolados, destacamos a presença de um isolado de *E. coli* enteropatogênica atípica (aEPEC), e dois isolados de *E. coli* patogênica extraintestinais (ExPEC). Um novo sorotipo (O64474:H8) de *E. coli* foi detectado em um desses queijos, sendo o primeiro relato no Brasil. Um dos isolados de *E. coli* mostrou resistência a três importantes antimicrobianos (tetraciclina, ampicilina e ácido nalidíxico), e um isolado de *S. aureus* apresentou resistência a cinco antimicrobianos (ampicilina, estreptomicina, cefoxitina, penicilina e ciprofloxacina). Alguns desses isolados de *E. coli* e *S. aureus* foram utilizados como bactérias contaminantes dos queijos contendo antimicrobianos naturais (OEO ou méis). Fungos filamentosos (*Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.) também foram utilizados para contaminar os queijos produzidos e maturados por 30 dias, seguindo diferentes tratamentos. O OEO a 0,02 % (v/v) demonstrou alta atividade antibacteriana e antifúngica, reduzindo as populações bacterianas à zero até o sexto dia de maturação, e inibindo a germinação dos esporos fúngicos. Já a combinação dos méis (HSB 5% e HAM 25%, v/v) também apresentou atividade antibacteriana, reduzindo a população de *E. coli* e *S. aureus* a zero após 15 e 6 dias, respectivamente, bem como a germinação dos fungos. A utilização desses antimicrobianos naturais foi muito eficiente para os microrganismos testados durante a maturação, e o OEO assim como a combinação de méis pode ser uma interessante alternativa para os antimicrobianos convencionais (nisina e natamicina) contra importantes patógenos, como o novo sorogrupo de *E. coli* isolado nesses queijos artesanais.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Fungos filamentosos. Óleo essencial de orégano. Mel. Queijos. Maturação. Contaminação microbiana.

CAMPOS, Anna Carolina Lionelli Pires de. **Antimicrobial activity of natural compounds applied in cheese.** 2019. 99p. Thesis (Doctorate in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Raw milk cheese is widely consumed in Brazil, however, because most of it is made with raw milk, it may be contaminated with pathogenic bacteria. The presence of fungi and bacteria is a problem for the industry as well, since they can cause defects in cheeses, besides economic losses. In this study, we evaluated the presence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in raw milk cheeses from different Brazilian states, and after we evaluated the antimicrobial activity of the essential oil of oregano (OEO), and the association of honeys of *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier 1836 (HSB) and *Apis mellifera* Latreille africanized (HAM), in the control of poisoning microorganisms from cheeses during maturation process. From 147 cheese samples, 25 isolates of *S. aureus* (from 10 cheese samples) and 39 of *E. coli* (from 29 cheese samples) were identified. Among these isolates, we highlight the presence of one atypical enteropathogenic (aEPEC) isolate, and two extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) isolates. A new *E. coli* serotype (O64474:H8) was detected on one of those cheeses, as the first report in Brazil. One *E. coli* isolate was resistant to three important antimicrobials (tetracycline, ampicillin and nalidixic acid), and one *S. aureus* isolate showed resistance to five antimicrobials (ampicillin, streptomycin, cefoxitin, penicillin and ciprofloxacin). Some of these *E. coli* and *S. aureus* isolates were used as contaminants of the cheeses with natural antimicrobials (OEO and honeys). Filamentous fungi (*Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. And *Penicillium* sp.) were also used to contaminate cheeses produced and matured for 30 days, following different treatments. The OEO 0.02% (v/v) showed high antibacterial and antifungal activity, reducing the bacterial populations to zero until the sixth day of maturation, and inhibition of fungal spores germination. The combination of honeys (HSB 5% and HAM 25%, v/v) also showed antibacterial activity, reducing the population of *E. coli* and *S. aureus* to zero after 15 and 6 days, respectively, as well as germination of the fungi. The use of these antimicrobials was very efficient for the microorganisms tested during maturation, and the OEO and the combination of these honeys can be a interesting alternative for the conventional antimicrobials (nisin and natamycin) against importante pathogens as the new *E. coli* serotype found in these raw milk cheeses.

Key-words: *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Filamentous fungi. Oregano essential oil. Honey. Cheese. Maturation. Microbial contamination.

LISTA DE FIGURAS

	Revisão de literatura	
Figura 1	Localização das indústrias de laticínios no Brasil. Destaque para o estado de Minas Gerais, onde há maior concentração delas ao sul do estado.	17
Figura 2	Esquema da interação entre os fatores que influenciam o crescimento de microrganismos indesejáveis nos queijos. Temperatura (T), atividade de água (Aw), pH e potencial redox (Eh).....	22
Figura 3	Estrutura química na natamicina, antibiótico utilizado na produção de queijos pertencente a classe dos macrolídeos polieno tetraeno	24
Figura 4	Ilustração da estrutura química dos antibióticos macrolídeos poliênos: (1) anfotericina B, (2) nistatina e (3) natamicina (pimaricina). O grupo micosamina, comum a todas as moléculas estão identificados por tracejado.....	27
Figura 5	Estrutura química da nisina.....	28
Figura 6	Mecanismo de ação da nisina. Ruptura da estrutura de peptideoglicano, formando poros e ocasionando o extravasamento do conteúdo celular	29
Figura 7	Estrutura química do sorbato de potássio (1) e do sorbato de cálcio (2), ambos utilizados como conservantes em alimentos.....	31
Figura 8	Componentes bioativos antimicrobianos mais abundantes presentes no Óleo essencial de orégano.....	33
Figura 9	Representação dos alvos bacterianos atingidos pela ação do OEO	34
Figura 10	Desenvolvimento celular de <i>S. aureus</i> com mel Manuka	38
Figura 11	Mecanismo de ação do mel de Manuka para <i>P. aeruginosa</i>	38
	Artigo 1: Pesquisa de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos em <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de queijos artesanais no Brasil	
Figura 1	Aderência em células HeLa dos isolados de <i>E. coli</i> de queijos artesanais.....	63

	Artigo 2 - Utilização de óleo essencial de oréganos (<i>Origanum vulgare</i> L.) e a associação de méis de <i>Scaptotrigona bipunctata</i> e <i>Apis mellifera</i> no controle de microrganismos durante a maturação	
Figura 1	Fluxograma da produção de queijo minas padrão	77
Figura 2 A	Curva de crescimento e morte de <i>Escherichia coli</i> EPEC EC01 presente em queijos contaminados não tratados com antimicrobianos e queijos contaminados que receberam tratamento com OEO, nisina e natamicina	83
Figura 2 B	Curva de crescimento e morte de <i>Staphylococcus aureus</i> SC05 presente em queijos contaminados não tratados com antimicrobianos e queijos contaminados que receberam tratamento com OEO, nisina e natamicina	83
Figura 3 A	Curva de crescimento e morte de <i>Escherichia coli</i> EPEC EC01 presente em queijos contaminados não tratados com antimicrobianos e queijos contaminados que receberam tratamento com a associação de méis, nisina e natamicina	86
Figura 3 B	Curva de crescimento e morte de <i>Staphylococcus aureus</i> SC05 presente em queijos contaminados não tratados com antimicrobianos e queijos contaminados que receberam tratamento com a combinação de HSB e HAM (5% + 25%, v/v), nisina e natamicina	87

LISTA DE TABELAS

Artigo 1: Pesquisa de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados de queijos artesanais no Brasil.

Tabela 1	Seqüências dos iniciadores e condições utilizadas nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR).....	56
Tabela 2	Características genóticas e fenotípicas dos isolados de <i>Escherichia coli</i> de queijos artesanais desse estudo	61
Tabela 3	Resistência bacteriana aos antimicrobianos e produção de biofilme de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de queijos artesanais desse estudo.....	63
Artigo 2 - Utilização de óleo essencial de oréganos (<i>Origanum vulgare</i> L.) e a associação de méis de <i>Scaptotrigona bipunctata</i> e <i>Apis mellifera</i> no controle de microrganismos durante a maturação.		
Tabela 1	Concentração inibitória mínima (CIM) de óleo essencial de orégano e méis contra a cultura láctica R704 utilizada no experimento	79
Tabela 2	Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) do OEO, HSB e HAM frente os microrganismos isolados de queijos <i>E. coli</i> EC-01 e <i>S. aureus</i> SC-05	81
Tabela 3	Germinação de esporos dos fungos durante o período de maturação, para os queijos tratados com OEO 0,02%, Nisina e Natamicina.....	85

SUMÁRIO

	Revisão de literatura	
	Introdução	15
1	Objetivos	16
1.1	Objetivo Geral	16
1.2	Objetivos Específicos	16
2	Revisão de literatura	17
2.1	Os queijos	17
2.2	Deterioração de queijos	19
2.3	Fatores que influenciam o desenvolvimento de microrganismos	19
2.3.1	Temperatura	20
2.3.2	Potencial Redox (Eh)	20
2.3.3	Atividade de água (Aw) e o sal	21
2.3.4	pH	21
2.3.5	Inter-relação entre fatores que afetam a multiplicação microbiana	22
2.4	Aditivos	23
2.5	Natamicina	24
2.5.1	Mecanismo de ação	26
2.6	Nisina	27
2.6.1	Mecanismo de ação	28
2.7	Ácido sórbico (sorbatos)	30
2.7.1	Mecanismo de ação	31
2.8	Aditivos naturais	31
2.8.1	Óleo essencial de orégano	32
2.8.2	Atividade antimicrobiana	33
2.8.3	Aplicação em alimentos	35
2.8.4	Mel	35
2.8.5	Atividade antimicrobiana	36
2.8.6	Aplicação em alimentos	39

Referências.....	40
------------------	----

Artigo 1: Pesquisa de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados de queijos artesanais no Brasil

1	Introdução	53
2	Material e métodos.....	54
2.1	Amostras de queijos artesanais e cepas bacterianas.....	54
2.2	Preparação do DNA	54
2.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de genes de virulência de DEC e ExPEC em isolados de <i>E. coli</i>	55
2.4	PCR para determinação do grupo filogenético	57
2.5	Sorotipagem.....	58
2.6	Formação de biofilme	58
2.7	Ensaio de adesão	59
2.8	Teste de resistência antimicrobiana	59
3	Resultados	60
4	Discussão	64
5	Conclusão.....	66
Referências.....	67	

Artigo 2: Utilização de óleo essencial de orégãos (*Origanum vulgare* L.) e a associação de méis de *Scaptotrigona bipunctata* e *Apis mellifera* no controle de microrganismos durante a maturação

1	Introdução	73
---	------------------	----

2	Material e métodos.....	74
2.1	Obtenção dos compostos antimicrobianos.....	74
2.2	Microrganismos utilizados na contaminação dos queijos.....	75
2.3	Microrganismos utilizados na produção dos queijos.....	75
2.4	Concentração inibitória mínima (CIM) de OEO e dos méis frente à cultura lática.....	75
2.5	Interação entre méis na atividade antibacteriana (Checkerboard) frente à cultura lática.....	76
2.6	Preparo dos queijos.....	76
2.6.1	Tratamentos experimentais e controles.....	77
2.7	Preparo das suspensões bacterianas e fúngicas para contaminação dos queijos.....	78
2.8	Inoculação microbiana dos queijos.....	78
2.9	Contagem de microrganismos.....	78
2.10	Análise estatística.....	79
3	Resultados e discussão.....	79
4	Conclusão.....	90
	Referências.....	91
	Considerações finais.....	91

Introdução

O queijo é um dos alimentos mais consumidos no Brasil, sendo comercializados sob a fiscalização de serviços de inspeção ou informalmente. A produção de queijo no Brasil é distribuída por todo o país, tendo a maior concentração de laticínios na região sudeste.

A presença de fungos e bactérias em queijos maturados é uma das principais preocupações para as indústrias lácteas, visto que resultam em grandes perdas econômicas, devido aos estufamentos, odores e aparência desagradáveis, diminuindo o tempo de prateleira e o seu valor comercial. Além disso, a produção de toxinas, por fungos e bactérias contaminantes, podem causar doenças gastrointestinais e zoonóticas.

Para evitar a contaminação microbiana após a sua produção, principalmente, durante a maturação dos queijos, as indústrias optam por utilizarem algumas substâncias com atividade antimicrobiana, como as bacteriocinas, macrolídeos, lisozima, sorbatos e nitratos de sódio e/ou potássio. Porém, o uso de antimicrobianos sintéticos está se tornando progressivamente limitado por regulamentos de segurança alimentar, devido à sua toxicidade, efeito ambiental negativo, risco a saúde humana, e desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

Como alternativa aos antimicrobianos comumente utilizados, têm-se estudado a ação de compostos naturais como óleos essenciais, extratos de ervas, méis, entre outros. A busca por compostos naturais (extratos) se dá principalmente pela interação das várias substâncias que as compõem, fazendo com que a possibilidade do aparecimento de resistência bacteriana a estes extratos seja praticamente nula. Muitos desses extratos geralmente possuem mais de um mecanismo de ação devido à quantidade e variedade de substâncias ativas, podendo atuar contra uma gama de microrganismos (Gram-positivos, Gram-negativos e fungos filamentosos ou leveduriformes), enquanto que os aditivos conservantes permitidos em legislação geralmente atuam sobre apenas um grupo de microrganismos.

Nosso grupo de pesquisa (Patogenicidade Bacteriana – CNPq) tem identificado bactérias de importância médica e veterinária em diferentes origens, incluindo alimentos (leites e carnes), e estudado a atividade antimicrobiana (bactérias e fungos) de compostos naturais (óleo essencial de orégano e méis) *in vitro*.

Desse modo, acreditamos que estes compostos naturais (um de origem vegetal e outro de animal) podem ser eficientes quando aplicados em produtos como o queijo, e se tornar uma alternativa interessante aos conservantes tradicionais como a nisina e natamicina, uma vez que esses são tóxicos e podem induzir resistência bacteriana.

1 Objetivo

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) (OEO), e da associação de méis de *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier 1836 (HSB) e de *Apis mellifera*, Latreille (HAM), no controle de microrganismos contaminantes de queijos durante a maturação.

1.2 Objetivos específicos

Pesquisar genes de virulência e resistência a antimicrobianos em isolados de *E. coli* e *S. aureus* de queijos artesanais;

Avaliar a eficiência antimicrobiana de OEO e os méis HSB e HAM sobre cepas isoladas de queijos artesanais;

Produzir queijos maturados com adição de OEO, e avaliar a eficiência sobre *E. coli*, *S. aureus* e fungos filamentosos;

Produzir queijos maturados com a adição da combinação de méis HSB e HAM, e avaliar a eficiência sobre *E. coli*, *S. aureus* e fungos filamentosos;

Comparar a ação dos antimicrobianos naturais com a ação da nisina e natamicina sobre *E. coli*, *S. aureus* e fungos isolados de queijos artesanais;

Avaliar o efeito das concentrações de OEO e méis sobre a cultura láctica mesofílica tipo O, usada para produzir os queijos.

2. Revisão de literatura

2.1 Os queijos

Os primeiros relatos sobre a produção de queijo são do Egito antigo, cerca de 6000 a.C, sendo produzido, posteriormente, no Império Romano e, por volta de 1267, uma cooperativa francesa iniciou a produção industrial (PERRY, 2004).

A produção de queijos no Brasil teve um provável início em meados do século XIX, sendo inicialmente produzidos de modo fabricado em fazendas, utilizando leite cru, que deram origem ao hoje nacionalmente conhecido como “queijo minas”. Depois o queijo foi prensado, passou das fazendas às fabricas e, na década de 30, esse queijo teve sua definição tecnológica e, desde então, tem crescido o volume fabricado em indústrias. O estado de Minas Gerais destaca-se na produção nacional de queijos (**Figura 1**) (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994; PERRY, 2004; SGHEDONI et al., 1979).

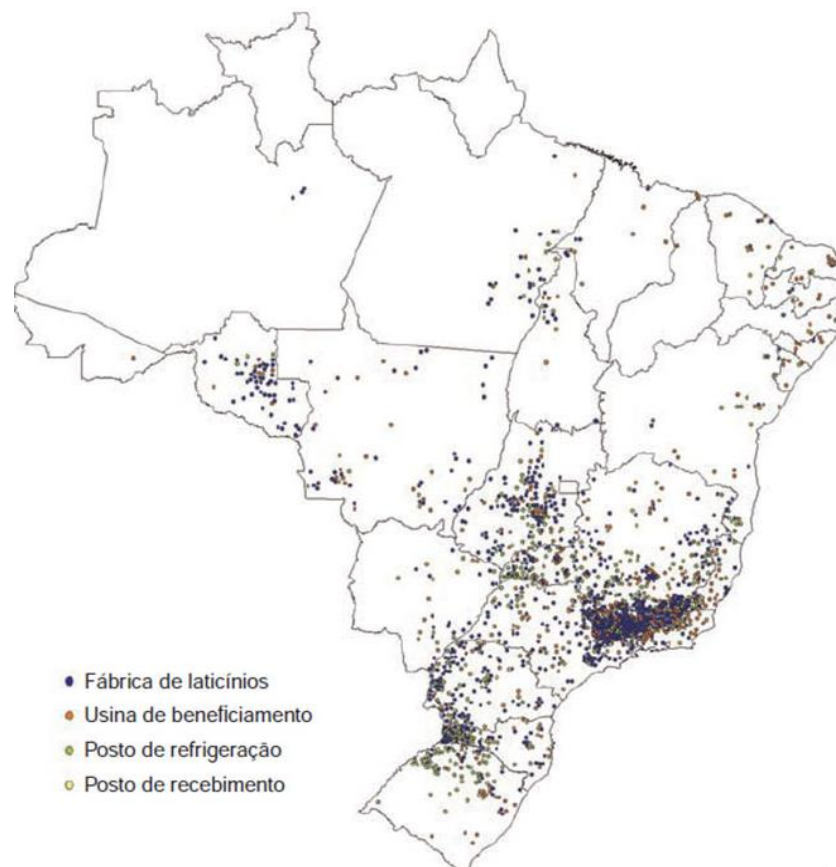


Figura 1: Localização das indústrias de laticínios no Brasil. Destaque para o estado de Minas Gerais, onde há maior concentração delas ao sul do estado. Fonte: REVISTA BALDE BRANCO (2017).

O consumo de queijos no Brasil tem aumentado e a meta a é chegar ao consumo de 7,5 kg de queijo por pessoa até 2020, sendo que, atualmente, o consumo é, em média, de 5,4 kg

per capita, quase a metade do consumido na Argentina e Uruguai, onde o consumo atinge 11 kg de queijo por pessoa. Estima-se que 35% da produção de leite tenham como destino os laticínios para a produção de queijos e a uma parcela dessa produção de queijo, cerca de 1,3 ton foram exportadas principalmente para a Rússia e Uruguai. Esses dados são para queijos produzidos sob a fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Entretanto, a produção de queijo acontece em todas as regiões do País e é o destino de cerca de 60% do leite informal produzido, ou seja, 6 bilhões de litros de leite/ano são transformados em diferentes tipos de queijos (ABIQ, 2017; ZOCCAI, 2016).

A partir da coagulação do leite, pode ser produzido a partir de leite de vaca, cabra, búfala, ovelha e demais mamíferos e, por isso, é conhecido pelo alto teor nutricional que engloba proteínas, onde as mais abundantes são caseína, alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina; lipídeos, carboidratos (lactose), sais minerais, dentre eles: cálcio e fósforo, além de vitaminas A, D e do complexo B. De acordo com a legislação, pode haver adição de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e corantes (BRASIL, 1996; INMETRO, 2010).

O processo de fabricação de queijos industrial segue basicamente as etapas de pasteurização do leite, adição de cultura láctica, coagulação do leite, corte da coalhada, enformagem e prensagem da massa – podendo variar conforme o tipo de queijo; salga e embalagem. No caso de queijos maturados, que sofreram trocas bioquímicas e físicas necessárias para dar características à variedade do queijo, o processo de maturação pode acontecer antes ou após a embalagem, porém é possível identificar alterações no processo de produção de acordo com o tipo de queijo, a região produzida e a cultura láctea (microrganismos) dos fabricantes (BRASIL, 1996; MARQUARDT, 2013).

A maturação ocorre em temperatura e umidade controladas em câmaras de maturação, envolvendo reações enzimáticas de decomposição dos três componentes principais do leite, que são retidos no queijo (lactose, caseína e gordura) e, como consequência, o sabor, aroma e textura modificam-se devido aos metabólitos gerados, pelos processos de glicólise, proteólise e lipólise, tendo como produtos o ácido láctico, gás carbônico, ácido acético, etanol, diacetil, acetoína entre outros (OLSON; MOCQUOT, 1985; SINGH et al., 2003; VARNAM; SUTHELAND, 1995).

Variando de 80 a 97% de umidade relativa do ar, e 2 a 17°C de temperatura, dependendo do tipo de queijo a ser produzido e, em virtude da rica composição e dessas condições de maturação, os queijos são potenciais veiculadores de patógenos, tais como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*,

responsáveis por doenças gastrointestinais, intoxicações e zoonóticas. Os fungos, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., assim como as bactérias possuem papel importante, pois também são responsáveis pela diminuição da vida útil e a aparência desagradável dos queijos (ALLERBERGER; WAGNER, 2010; BRASIL, 1996; CALLON et al., 2011; JERSEK et al., 2014; McLAUHLIN et al., 2004; MORO et al., 2013; PERRY 2004; RESA et al., 2014; SOHIER et al., 2009).

2.2 Deterioração de queijos

A presença de fungos e bactérias em queijos maturados é uma das principais preocupações para as indústrias lácteas. A deterioração dos alimentos, como os queijos, deve-se a uma gama de reações, destacando-se as de origem microbiológica. O processo industrial de maturação promove alterações sensoriais a partir de reações bioquímicas e bacteriológicas como proteólise, lipólise e fermentação, resultando em sabor, palatabilidade e conservação do produto. Embora não substitua a aplicação das boas práticas de fabricação, a maturação é frequentemente uma forma de prevenir o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores sem a utilização abusiva de conservantes químicos (SCHULZ, BONELLI, BATISTA, 2009).

A presença de microrganismos contaminantes nos queijos diminui o valor comercial e produz até 5% das perdas pelas indústrias de laticínios (BRASIL, 1996; MCLAUHLIN et al., 2004; SOHIER et al., 2009; JERSEK et al., 2014; RESA et al., 2014).

Apesar de no Brasil haver deficiência no controle epidemiológico em relação às doenças veiculadas por alimentos, a comunidade científica internacional frequentemente relata toxinfecções alimentares (LOUREIRO, QUEROL, 1999; MAZIERO, BERSOT, 2010; SABIONI, HIROOKA, SOUZA, 1988; SILVA, BERGAMINI, DE OLIVEIRA, 2010).

2.3 Fatores que influenciam o desenvolvimento de microrganismos

Os fatores que mais influenciam o crescimento de microrganismos nos queijos são temperatura, potencial redox (Eh), atividade de água (Aw) e potencial hidrogeniônico (pH). Destes, a atividade de água está diretamente relacionada à água disponível em uma amostra e a concentração de sal do produto (FORSYTHE, 2013; FURTADO, 1990).

2.3.1 Temperatura

A temperatura elevada (temperatura ótima para os microrganismos – 25-30°C), quando combinada a outros fatores, pode ocasionar problemas como aceleração do processo de maturação, devido à temperatura ficar próxima à ótima para o desenvolvimento de microrganismos lácticos, porém, com isso, pode ocorrer o crescimento de microrganismos contaminantes, prejudicando a qualidade, além de favorecer a perda de umidade, muitas vezes descaracterizando o queijo. Geralmente, os fungos filamentosos são capazes de crescer em faixas de temperatura mais amplas que as bactérias, sendo um problema para a indústria, pois muitos crescem em alimentos refrigerados. Já as leveduras não são muito tolerantes a altas temperaturas, crescendo principalmente nas faixas mesófila e psicrófila (DORES et al., 2013; FRANCO; LANDGRAF, 1996; FORSYTHE, 2013; MARTINS, 2006).

2.3.2 Potencial Redox (Eh)

O potencial de oxidação-redução pode ser definido pela facilidade com a qual ganha ou perde elétrons. Quando um elemento perde elétrons, diz-se que este substrato é oxidado, ao passo que, quando um substrato ganha elétrons, diz-se que se tornou reduzido.

Entre as substâncias dos alimentos que ajudam a manter condições redutoras estão o ácido ascórbico e os grupamento-SH em carnes e os açúcares redutores em frutas e vegetais. O Eh de um ambiente pode ser afetado por uma série de compostos. O oxigênio é o fator que mais contribui para o aumento do Eh de um alimento. Os microrganismos variam no grau de sensibilidade ao Eh do meio de multiplicação e podem, de acordo com o Eh requerido, ser divididos em grupos, como:

- Aeróbios: exigem Eh positivo para o seu crescimento (presença de oxigênio) e são representados pelos bolores, bactérias como a *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Micrococcus*, algumas espécies de *Bacillus* e leveduras oxidativas;

- Anaeróbios: requerem Eh negativo para seu crescimento (ausência de oxigênio). O oxigênio chega a ser tóxico para a célula, porque gera peróxidos não metabolizados pelos microrganismos devido a falta de enzimas para isto. Os gêneros *Clostridium* e *Desulfotomaculum* compreendem espécies anaeróbias;

- Facultativos: multiplicam-se em Eh positivo e negativo, sendo representados pelas leveduras e muitas espécies bacteriana tais como *S. aureus*, *E. coli*.

- Microaerófilas: multiplicam-se melhor em Eh baixo. As bactérias lácticas são encontradas neste grupo.

Esse fator é importante para a maturação, visto que para a preservação dos alimentos, como os queijos, a quantidade de oxigênio disponível nas câmaras de maturação pode

determinar quais tipos de microrganismos irão se desenvolver. A utilização de exaustores, embalagens impermeáveis ao oxigênio, vácuo e atmosfera modificada com gases inertes, tem sido alternativas para o controle de microrganismos, pois, diminuindo o Eh, ocorre a seleção do desenvolvimento de contaminantes. Estes recursos são usados para queijos, vegetais, produtos cárneos e outros, a fim de evitar os mofos superficiais (ADAMS; MOSS, 1997; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

2.3.3 Atividade de água (A_w) e o sal

É a relação que existe entre a pressão de vapor de um alimento em relação à pressão do vapor de água à mesma temperatura e, esse valor varia entre 0 e 1. Denomina-se pela regra geral como A_w e é um parâmetro ligado à umidade do alimento, o que permite determinar sua capacidade de conservação e de propagação microbiana. A A_w de um alimento pode ser reduzida aumentando a concentração de solutos na fase aquosa dos alimentos mediante a extração da água (liofilização) ou mediante a adição de novos solutos. A interação da A_w com a temperatura, o pH, oxigênio e dióxido de carbono ou conservantes químicos tem efeito sobre a inibição do crescimento microbiano. Ainda, de acordo com Forsythe (2013), as bactérias, com exceção de *S. aureus*, requerem maiores atividades de água que os fungos.

O sal é um soluto que pode ser adicionado para reduzir a A_w no alimento. Os microrganismos pertencentes ao grupo das bactérias lácticas apresentam tolerância a presença de altas concentrações de NaCl, sendo considerados micro-organismos halotolerantes, podem desenvolver-se em concentrações de até 10% de NaCl. É utilizado como componente das características organolépticas e aplicado como conservante de produtos alimentícios, como queijos e, sua presença é um fator limitante no crescimento microbiano. Atua como uma barreira para o crescimento de patógenos e, o fato de não afetar consideravelmente o crescimento das bactérias lácticas, beneficia sua aplicação em produtos onde o NaCl é utilizado (GEURTS et al., 1980; GUTIERREZ et al., 1995; SCHNEIDER, 2016; TURNER; THOMAS, 1980). O sal (NaCl) afeta diretamente a A_w e, de acordo com Fellows (2006), quase toda atividade microbiana é inibida abaixo de $A_w = 0,6$, sendo a maioria dos fungos e bactérias inibidas abaixo de 0,7 e 0,9, *S. aureus* apresenta alta tolerância ao sal, $A_w = 0,86$; mostrando que esse fator não é uma barreira contra esse microrganismo.

2.3.4 pH

O pH também pode ser determinante para o crescimento desses microrganismos em diferentes condições de processamento de produtos fermentados, e pode também determinar a utilização dos mesmos como cultura probióticas em alimentos (ALVES et al., 2011). O pH atua como fator limitante do crescimento ou manutenção da viabilidade celular, a exposição a variações bruscas de pH pode inibir enzimas citoplasmáticas essenciais aos microrganismos e também afetar o desenvolvimento de substâncias antimicrobianas e as condições de competição com microrganismos patogênicos. Assim, *Lactococcus* e *Lactobacillus* são empregados na produção de queijos como culturas protetoras, principalmente por apresentarem características de crescimento que permitam competir diretamente por substrato com microrganismos patogênicos (FORSYTHE, 2013; OLIVEIRA et al., 2012).

2.3.5 Inter-relação entre fatores que afetam a multiplicação microbiana

Os fatores acima relacionados são de extrema importância para o crescimento microbiano, no entanto, é a relação entre eles que definirá se haverá ou não a multiplicação desses microrganismos em um determinado alimento (**Figura 2**). Pouco ainda se sabe sobre o efeito da inter-relação dos fatores, pois há poucos relatos sobre sinergismo e antagonismos entre eles para os microrganismos. Além disso, fatores extrínsecos como o excesso de umidade na câmara de maturação, a temperatura elevada, combinados ou não, salmoura e ambiente industrial contaminado, bem como a falta de tratamento adequado no decorrer da maturação (viragens, aplicações de antimicrobianos) também influenciam no aumento de microrganismos indesejáveis no queijo (FERREIRA et al., 2004; FORSYTHE, 2013).

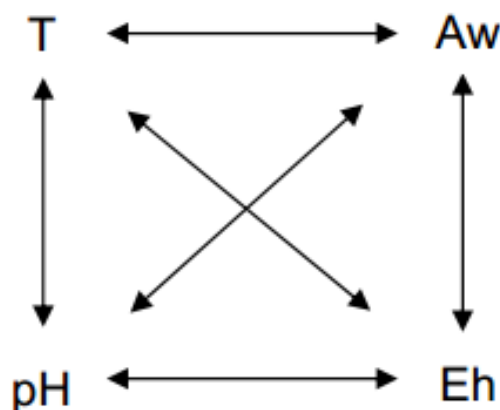


Figura 2: Esquema da interação entre os fatores que influenciam o crescimento de microrganismos indesejáveis nos queijos. Temperatura (T), atividade de água (Aw), pH e potencial redox (Eh). Fonte: Ferreira et al. (2004).

2.4 Aditivos

A Portaria nº 540, 27 de outubro de 1997 da Secretaria de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde e o Regulamento de Identidade e Qualidade de Queijos (RTIQ) (Brasil, 1996), relatam sobre a empregabilidade dos aditivos. A utilização destas substâncias deve ser realizada de maneira segura, na qual o ingrediente envolvido deverá ser submetido a testes toxicológicos sempre que necessário e devem ser empregados dentro dos limites máximos indicados e não é permitida a adição de substâncias que possam mascarar falhas durante o processamento do alimento e/ou promover perdas nutricionais. Os aditivos podem ser naturais ou artificiais e de acordo com a função desempenhada podem ser classificados como: agente de massa, antiespumante, antiumectante, antioxidante, corante, conservante, edulcorante, espessantes, geleificantes, estabilizante, aromatizante, umectante, regulador de acidez, acidulante, emulsificante, melhorador de farinha, realçador de sabor, glaceante, agente de firmeza, sequestrante, estabilizante de cor e espumante (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997).

Os conservantes são substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas. Conservadores como nitratos e nitritos, além das propriedades conservantes, são fixadores de cor e agentes de cura para a carne, tornando-a mais atrativa (SCHVARTSMAN, 1982). Exemplos: ácido acético, acetato de cálcio, ácido propiônico, propionato de sódio, propionato de cálcio (BRASIL, 1999).

O RTIQ de produtos lácteos autoriza o uso da bacteriocina (nisina) e do antibiótico macrolídeo polieno (natamicina), em queijos, sendo este último permitido apenas a natamicina (BRASIL, 1996). A utilização de culturas a base de *Lactococcus lactis*, produtora de nisina, é uma forma eficaz na prevenção do estufamento tardio causados pelo *Clostridium beijerinckii* em queijos (GARDE et al., 2011) e, a aplicação de natamicina auxilia no controle de bolores e leveduras, melhorando a aparência, o tempo de vida comercial e reduzindo os riscos de formação de micotoxinas nos alimentos (BRUSTOLIN, 2009). Outros estudos reportando a utilização de natamicina em filmes biológicos para revestimento de queijos, aumentando o tempo de prateleira dos produtos lácteos estudados (RESA, JAGUS, GERSCHENSON, 2014).

Apesar da legislação brasileira permitir a utilização desses conservantes na fabricação de queijos, existem restrições e limites a serem respeitados, sendo que a natamicina tem um limite máximo de 5 mg/kg e não pode ser detectada a 2 mm de profundidade (ausente na massa). Já a nisina tem como limite regulatório máximo de concentração 12,5 mg/kg (BRASIL, 1996).

A utilização de ácidos orgânicos para conservação de alimentos também merece destaque, visto que, possui maior solubilidade em relação aos antimicrobianos biológicos

natamicina e nisina, baixo efeito no sabor dos alimentos e dispõem da liberação para adição em muitos tipos de alimentos processados, características essas, ideais para um conservante. O ácido sórbico e seus sais de Ca e K tem apresentado efeitos inibitórios sobre leveduras, fungos filamentosos e uma vasta gama de bactérias (LIICK, 1976; MORAES et al., 2007; RAJCHL et al., 2010).

2.5 Natamicina

A natamicina foi descoberta em 1955 a partir de um filtrado de *Streptomyces natalensis*, na Província Natal (África do Sul), dando origem ao nome da substância. Sua estrutura completa foi elucidada em 1964, como sendo um macrolídeo polieno tetraeno (**Figura 3**) (DELVES-BROUGHTON et al., 2005).

Também chamada de pimáricina, tenecitina e miprozina (JAY, 2005), pode ser produzida na natureza também por *Streptomyces gilvoporeus* (CHEN; LU; DU, 2008). Entretanto geralmente é produzida por *Streptomyces natalensis*, tendo ação fungicida relevante, mas ineficaz contra bactérias (FURTADO, 1991; JAY, 2005).

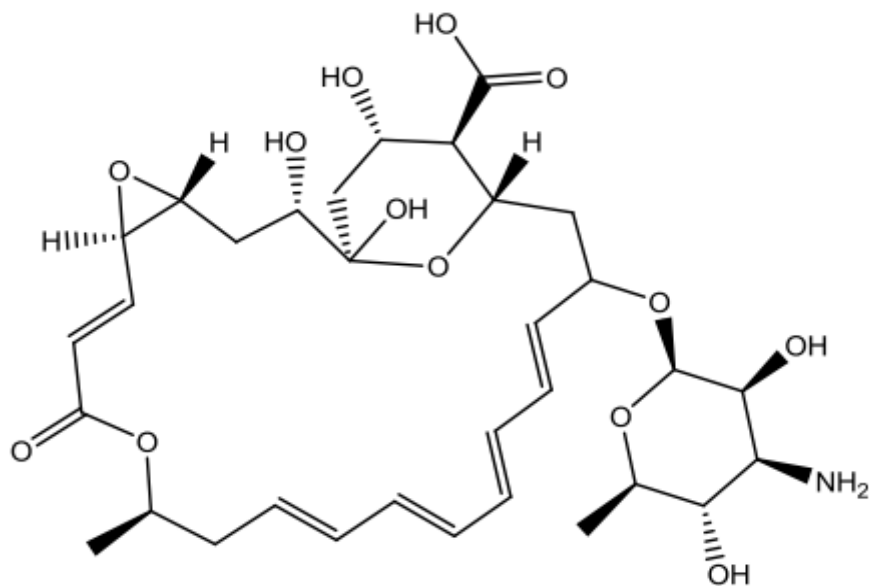


Figura 3: Estrutura química na natamicina, antibiótico utilizado na produção de queijos pertencendo a classe dos macrolídeos polieno tetraeno. Fonte: Delves-Broughton et al. (2005).

É um pó branco, insípido, inodoro, praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em metanol, e mais solúvel em ácido acético glacial e dimetilformamida (*Food Chemicals Codex*, 2010-2011). A baixa solubilidade em água (aproximadamente 30 – 50 mg/L) garante que esta

permaneça na superfície e não migre para a matriz alimentar. A presença de luz, pH extremo, oxidantes, cloro e metais pesados podem reduzir sua atividade (DELVES-BROUGHTON et al., 2005).

A degradação de natamicina resulta na formação de micosamina, por hidrólise de ligação glicosídica, ou aponatamicina, um composto resultante de degradação ácida (VENTURINI, 2012). A inativação de bolores e leveduras está diretamente relacionada à concentração da natamicina aplicada e ao método utilizado (RESA; JAGUS; GERSCHENSON, 2014). Os bolores são suscetíveis a concentrações inibitórias mínimas de 0,1 a 10 µg/mL de natamicina, já as leveduras são inibidas de 1 a 5 µg/mL de concentração. Este antibiótico realiza ligação irreversível ao ergosterol celular do fungo levando à formação de canais iônicos e conseqüentemente aumentando a permeabilidade celular e resultando em morte microbiológica. A ineficácia contra bactérias é útil à indústria alimentícia, pois não interfere na fermentação ou em processos de amadurecimento (DELVES-BROUGHTON et al., 2005).

É um dos poucos antibióticos que pode ser usado como aditivo alimentar (CHEN; LU; DU, 2008) e, segundo Pesquisadores Europeus de Aditivos Alimentares e Fonte de Nutrientes Adicionados aos Alimentos - EFSA (2009) a utilização de natamicina em queijos e embutidos não leva à resistência microbiana e seu uso é seguro visto à má absorção e posterior eliminação na forma intacta ou como produtos de degradação. A má absorção deve-se ao fato de que a natamicina não interage com o colesterol, da mesma forma que interage e leva a desestabilização do ergosterol (ARIMA et al., 2014), no entanto, uma quantidade segura seria a ingestão de até 0,3 mg/kg/dia (WHO, 2006).

Entretanto, um estudo com ratos resultou na diminuição da atividade dos CYP2E, CYP1A, CYP2B e subfamílias CYP4A do sistema do cromossomo P450 no fígado dos animais, o que indica que a natamicina embora não seja diretamente tóxica, pode levar a toxicidade secundária de outras substâncias que são metabolizadas por estas CYP enzimas. Sendo assim, a aplicação de natamicina não deve ser utilizada em quantidades excessivas (MARTÍNEZ et al., 2013).

Seu uso não está autorizado na Comunidade Europeia, com exceção da Espanha, que liberou a utilização em queijos e embutidos de forma transitória e, liberado com restrições de concentrações, nos Estados Unidos e outros países (MIGLIANELLI, 2005).

A aplicação de natamicina pode ser realizada na superfície de alimentos sólidos através de imersão, pulverização ou durante a salga (FAJARDO et al., 2010) e seu efeito pode

ser reduzido devido a interação com outros aditivos ou componentes do alimento (TURE et al., 2011).

Atualmente é empregada em conjunto com biopolímeros renováveis em embalagens as quais a natamicina pode ser liberada gradativamente, como exemplo, os co-polímeros de acetato de vinila (EVA) com adição de natamicina, no entanto, este não pode ser aplicado com a superfície do queijo úmida (BALAGUER et al., 2014). Também pode ser combinada em biofilmes com amido de tapioca (RESA; JAGUS; GERSCHENSON, 2014), glúten de trigo e metilcelulose (TURE et al., 2011), celulose (OLIVEIRA et al., 2007) ou quitosana (FAJARDO et al., 2010).

2.5.1 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da natamicina é de ruptura do ergosterol da membrana fúngica, com perda do conteúdo (GHANNOUM E RICE, 1999; THOMAS; INGRAM; BEVIS; BRIGHTWELL; WILSON; DELVES-BROUGHTON, 2005). Apesar de ser semelhante aos antibióticos anfotericina e nistatina (**Figura 4**), um estudo in vivo e in vitro mostraram que o mecanismo de ação é diferente. Embora haja uma afinidade da natamicina pelo esterol ergosterol, a atividade antifúngica não foi acompanhada de um aumento na permeabilidade das membranas fúngicas (TE WELSCHER et al., 2008), mostrando que seu mecanismo de ação não está correlacionado à formação de poros na membrana.

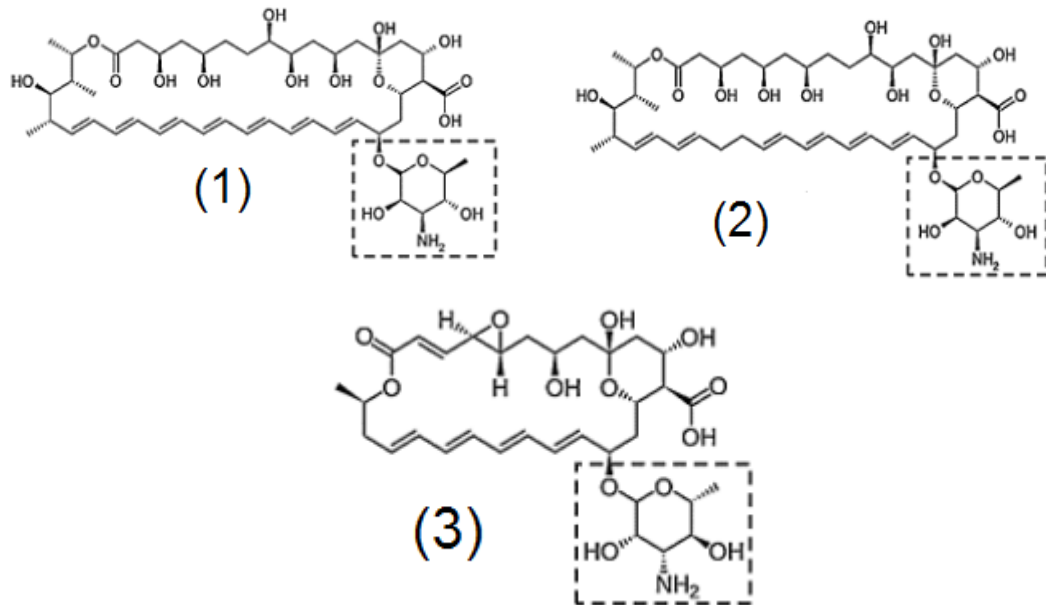


Figura 4: Ilustração da estrutura química dos antibióticos macrolídeos poliênos: (1) anfotericina B, (2) nistatina e (3) natamicina (pimaricina). O grupo micosamina, comum a todas as moléculas estão identificados por tracejado. Fonte: Arima et al. (2014).

Arima et al. (2014), ao testarem natamicina em membranas modelos que mimetizam a composição lipídica presente nas membranas de mamíferos (25% mol de colesterol), contataram que, para a composição usada, não houve efeito significativo sobre a organização molecular desse sistema, podendo inferir que essa composição protegeria as membranas mamíferas da ação da natamicina, justificando a baixa absorvidade oral e tópica da natamicina e, conseqüentemente, a baixa toxicidade (oral e tópica) da natamicina em humanos, nas concentrações recomendadas.

Provavelmente, a atividade biológica da natamicina está correlacionada às perturbações na organização molecular da bicamada lipídica, as quais, por sua vez, são decorrentes da interação entre esse fármaco e os esteróis presentes nas membranas de fungos (ergosterol) e de mamíferos (colesterol).

1.6 Nisina

A descoberta da nisina é considerada um dos marcos mais importante da pesquisa envolvendo bacteriocinas. Comercializada desde 1953, é utilizada até hoje na produção de diferentes alimentos industrializados. É o único peptídeo antimicrobiano natural aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso como conservante de alimentos.

É um peptídeo produzido por bactérias *L. lactis* subsp. *Lactis* (**Figura 5**). A capacidade de produzir nisina está geneticamente vinculada à capacidade de fermentar sacarose.

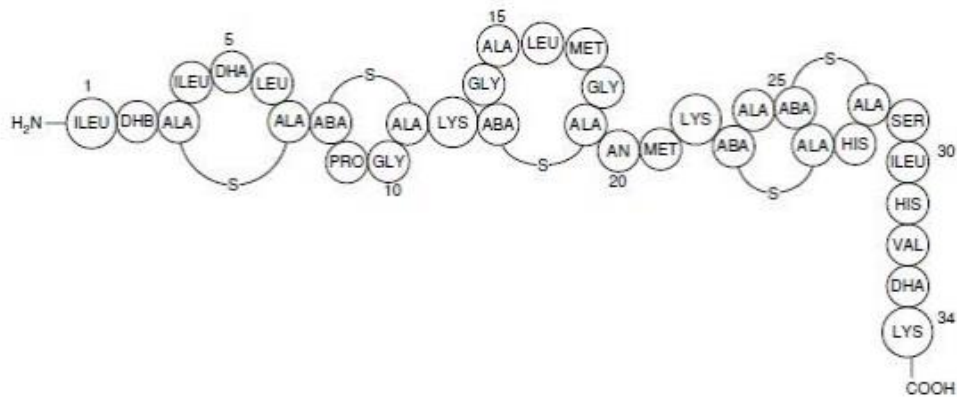


Figura 5: Estrutura química da nisina. Fonte: Williams e Delves-Broughton (2003).

A maioria das bacteriocinas tem melhor estabilidade de sua atividade em pH de ácido a neutro, sendo praticamente inativadas em pH 8,0. A inativação da nisina em meio alcalino é consequência da desnaturação, modificação química ou uma combinação de ambos (SETTANNI e CORSETTI, 2008).

Estudos relacionados ao mecanismo de ação da nisina apontam a membrana citoplasmática como o alvo primário. Também como efeito da nisina em células susceptíveis a sua ação, inclui-se a inibição da biossíntese de RNA, DNA, de proteína, enzimas, polissacarídeos e outros pontos que levam a morte da célula.

A nisina aumenta a permeabilidade da membrana pela formação de poros, ocasionando o efluxo do material intracelular. Assim, após o tratamento com nisina, as células ficam sem energia suficiente para realizar processos biossintéticos e que a membrana plasmática, transdutora de energia, pode ser o alvo primário na atuação da nisina. Sendo a bacteriocina carregada positivamente com partes hidrofóbicas, ocorrem interações eletrostáticas com o grupamento fosfato da membrana celular, carregado negativamente, promovendo o início da ligação da bacteriocina com a célula-alvo (ZHOU et al., 2014).

2.6.1 Mecanismo de ação

A nisina possui a habilidade de inibir o crescimento microbiano de bactérias Gram-positivas em alimentos, inclusive as patogênicas, como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus faecalis*, *Clostridium botulinum* e *L. monocytogenes*. A sua sobre células de bactérias Gram-positivas ocorre em duas etapas: (1) adsorção não específica da nisina sobre a parede celular, sendo o fenômeno reversível. Essa adsorção é dependente do pH, que ocorre em valor mínimo de 3,0 e máximo de 6,5; da composição fosfolipídica da membrana

citoplasmática dos microorganismos sensíveis; da presença de cátions divalentes e trivalentes; e da concentração utilizada. A nisina permanece sensível às proteases e o tratamento com enzimas proteolíticas protege as células susceptíveis a ação da nisina contra seu efeito letal; (2) a nisina se torna insensível às proteases e as células sofrem mudanças irreversíveis. É fortemente atraída pelos fosfolipídios e lisossomos na membrana das bactérias, formando poros ou canais de 0,2 a 1,0 nm de diâmetro (COTTER et al., 2005) (**Figura 6**).

A despolarização simultânea da membrana causa um efluxo rápido de componentes essenciais, como íons K^+ , aminoácidos e ATP, levando a uma série de alterações que termina com a lise celular. O estado fisiológico da cultura sensível tem grande influência na susceptibilidade à ação das bacteriocinas, sendo as células metabolicamente ativas mais sensíveis. A inibição da célula persiste enquanto houver bacteriocina ativa remanescente no meio de crescimento (WILLIAMS E DELVES-BROUGHTON, 2003).

Já as pediocinas (Classe II) é composta por pequenos peptídeos (<10 kDa) termoestáveis. Apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua inserção na membrana citoplasmática da célula alvo, promovendo a despolarização da membrana e a morte celular, além de uma sub-classe (IIa) apresentam alta afinidade por membrana de *Listeria monocytogenes* (Drider et al., 2006; Nascimento et al., 2008) (**Figura 6**).

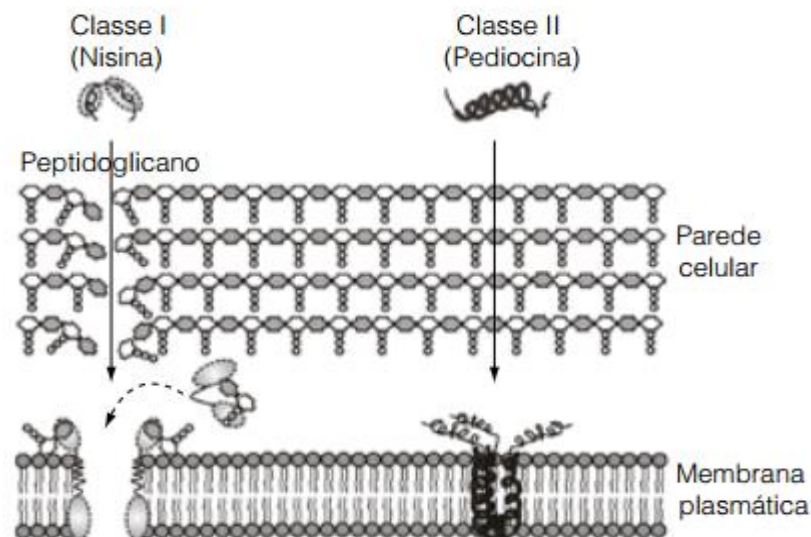


Figura 6: Mecanismo de ação da nisina. Ruptura da estrutura de peptideoglicano, formando poros e ocasionando o extravasamento do conteúdo celular. Fonte: Cotter et al. (2005).

O mecanismo pelo qual a nisina impede a germinação de esporos é diferente do das células vegetativas. Os grupos reativos da nisina interagem com grupos sulfidril vitais presentes na membrana dos esporos recém-germinados e exercem um profundo efeito bacteriostático, resultando na inibição subsequente do esporo. Assim, a nisina permite a

germinação do esporo, mas inibe as etapas posteriores do processo de formação de novas células (COTTER et al., 2005; ZHOU et al., 2014).

Nas bactérias Gram-negativas, a presença da camada de lipopolissacarídeo oferece maior proteção à célula, não permitindo que agentes externos alcancem a membrana citoplasmática. A camada de lipopolissacarídeo é formada por compostos que possuem caráter aniônico, gerando uma superfície hidrofílica. Desse modo, a membrana externa repulsa substâncias hidrofóbicas e macromoléculas, como a nisina (COTTER et al., 2005; WILLIAMS E DELVES-BROUGHTON, 2003).

No entanto, pelo caráter aniônico da camada de lipopolissacarídeo, esta pode se ligar à molécula da nisina, que tem caráter catiônico, formando uma estrutura estável por interações eletrostáticas, mas, mesmo assim, a nisina não conseguiria alcançar a membrana citoplasmática da célula.

A nisina é efetiva sobre bactérias Gram-negativas quando combinada com ácido láctico. O EDTA é o agente quelante mais efetivo que, adicionado juntamente com a nisina, auxilia na inibição de bactérias Gram-negativas, entretanto, o EDTA não pertence à lista de aditivos do RTIQ (BRASIL, 1996).

2.7 Ácido sórbico (sorbatos)

O ácido sórbico foi isolado primeiramente em 1859, a partir da destilação do óleo do fruto *Sorbus aucuparia* (HOFMANN, 1959). Esse ácido é encontrado na forma de cristais ou pó branco, de odor característico, possui pouca solubilidade em água, mas é bastante solúvel em alcoois.

Os sorbatos são os sais do ácido sórbico, como o sorbato de potássio e de cálcio (**Figura 7**). Possuem uma maior ação na forma não dissociada, portanto sendo mais eficaz em alimentos com pH abaixo de 6,5 (STOPFORTH, SOFOS, BUSTA, 2005). Podem ser utilizados para prevenir a formação de leveduras e mofos em alimentos processados, tais como produtos curados derivados do leite, sem intervir na ação das culturas iniciadoras (MORAES et al., 2007).

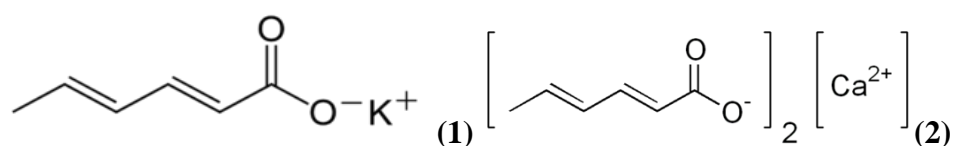


Figura 7: Estrutura química do sorbato de potássio (1) e do sorbato de cálcio (2), ambos utilizados como conservantes em alimentos. Fonte: O próprio autor.

A legislação brasileira permite a utilização do ácido sórbico em queijos com um limite máximo de 1000 mg/ kg (BRASIL, 1996). Testes toxicológicos foram realizados resultando em baixa toxicidade, entretanto foram reportados casos de intolerância idiossincrática, urticárias e pseudo alergias em pessoas sensibilizadas a esse composto (DEUEL et al., 1954; FDA, 1975; HANNUKSELA, GAUNT, 1975; JUHLIN, 1981; WALKER, 1990).

2.7.1 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação do ácido sórbico sobre as bactérias ainda não está totalmente elucidado, porém podem causar modificações na morfologia de células microbianas, alterações nas funções da membrana celular inibindo funções de transporte e da atividade metabólica (SOFOS, 1986).

Alguns estudos relacionados ao mecanismo de defesa em fungos filamentosos, como a redução da assimilação de carbono, e substratos de glicose, acetato, succinato, lactato e enzimas vitais, tais com: malato, isocitrato, α -cetogluturato, desidrogenase, fumarase e aspartase. Também ocorre a inibição da desidrogenases, interferindo na assimilação oxidativa (LIICK, 1976; MORAES et al., 2007; SOFOS, 1986). O sorbato de potássio é legalmente utilizado em alimentos, mas seu controle é requerido para a conformidade de acordo com a legislação pertinente evitando danos para a saúde do consumidor (MAZDEH et al., 2014).

2.8 Aditivos naturais

O uso de antimicrobianos sintéticos é limitado por regulamentos de segurança alimentar devido à toxicidade, efeito ambiental negativo, risco para a saúde, entre outros. Assim, o crescente interesse em novos produtos antimicrobianos pode substituir os convencionais.

A utilização de compostos naturais está entre as tecnologias emergentes de conservação de alimentos, sejam eles aplicados de forma isolada ou combinada com os métodos tradicionais de conservação, com o intuito de aumentar a vida útil do produto, devido às propriedades antimicrobianas e antioxidantes desses compostos, diminuindo a contaminação dos queijos, embutidos e outros alimentos (ZANINI et al., 2014).

2.8.1 Óleo essencial de orégano

O Óleo essencial de orégano é extraído por a hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor de folhas de uma erva de origem Mediterrânea chamada *Origanum vulgare*, pertencente à família Labiatae (CHUN et al., 2005; KOKETSU; GONÇALVES, 1991). São produtos do metabolismo secundário de vegetais e desempenham um papel importante para as plantas, atraindo alguns insetos que promovem dispersão de pólenes e sementes ou mantendo afastados os predadores e outros animais indesejáveis.

Em geral, compostos derivados de plantas dificultam a seleção de bactérias resistentes, provavelmente devido à presença de inúmeros componentes com ação antibacteriana, tais como: fenóis e polifenóis (flavonoides, quinonas, taninos, coumarinas), alcaloides, terpenoides, lectinas e polipeptídeos (UPADHYAY et al., 2014).

Os terpenos, como o limoneno, α -pineno e β -pinenom, por exemplo, possuem atividade antibacteriana moderada. Já os terpenoides (como carvacrol, timol e mentol) e fenilpropenos (como eugenol e cinamaldeído) possuem registros de ótima ação contra diversas bactérias (NAZZARO et al., 2013).

Dentre os óleos essenciais, o de orégano apresenta potente atividade antimicrobiana, sendo relatados resultados positivos quanto testados contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, inibindo importantes bactérias de importância alimentar e infecções hospitalares (BARROS et al., 2009; BURT, 2004; CHAFTAR et al., 2015; NAZZARO et al., 2013; SOKOVIĆ et al., 2007).

Os compostos fenólicos desses óleos são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana, e no caso do OEO, o carvacrol e o timol (**Figura 8**) são os componentes bioativos mais abundantes, podendo variar as concentrações devido a interferentes como região geográfica, solo e sazonalidade (MEDINI et al., 2009).

Em menores quantidades, pode-se encontrar: álcoois monoterpênicos (linalool, 4-terpineol), hidrocarbonetos monoterpênicos (para-cimeno, terpinoleno, terpineno, pineno), sesquiterpenos (betacariofileno, germacreno, espatulenol), mirceno, limoneno, ácido rosmarínico e outros (CLEFF et al., 2008), no entanto, os compostos carvacrol e timol são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana do OEO.

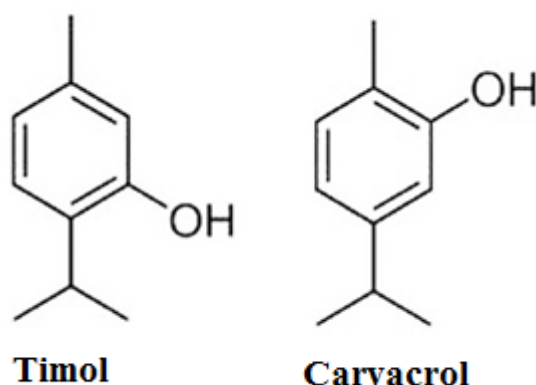


Figura 8: Componentes bioativos antimicrobianos mais abundantes presentes no Óleo essencial de orégano. Fonte: Scandorieiro et al. (2016).

2.8.2 Atividade antimicrobiana

Vários mecanismos antibacterianos potenciais têm sido relatados, embora não sejam totalmente esclarecidos para plantas e óleos essenciais, tais como: o rompimento da membrana celular bacteriana, aumento da suscetibilidade a antibióticos convencionais em bactérias resistentes aos mesmos, atenuação da virulência bacteriana, como ação anti-produção de biofilme, inibição na produção de cápsula bacteriana ou redução na síntese de toxinas (UPADHYAY et al., 2014)

Tanto o carvacrol quanto o timol são moléculas hidrofóbicas e, devido a essa característica, a membrana celular microbiana é o principal alvo da ação do OEO. Ocorre a modificação da estrutura lipídica, aumentando a permeabilidade de forma que haja a expulsão de íons e outros componentes celulares. Assim que a membrana celular é afetada, ocorre o comprometimento da viabilidade bacteriana, pois essa estrutura é fundamental para funções de procariotos (BURT, 2004; NAZZARO et al., 2013).

Alguns autores identificaram que o OEO danifica a integridade da membrana citoplasmática, afetando o equilíbrio de pH e de íons intracelulares (potássio e fosfato) em Gram-positivas; perda de material celular e alterações morfológicas identificadas como vesículas na superfície celular, alterações morfológicas superficiais, interferência na síntese de ATP e de proteínas e inibição do *quorum sensing* nas bactérias (**Figura 9**) (ALVES et al., 2002; DE SOUZA et al., 2010; LAMBERTI et al. 2003; PREUSS et al., 2005; SOUZA et al., 2010; SOUZA et al., 2013; SUZUKI et al., 2015; SZABÓ et al., 2010).

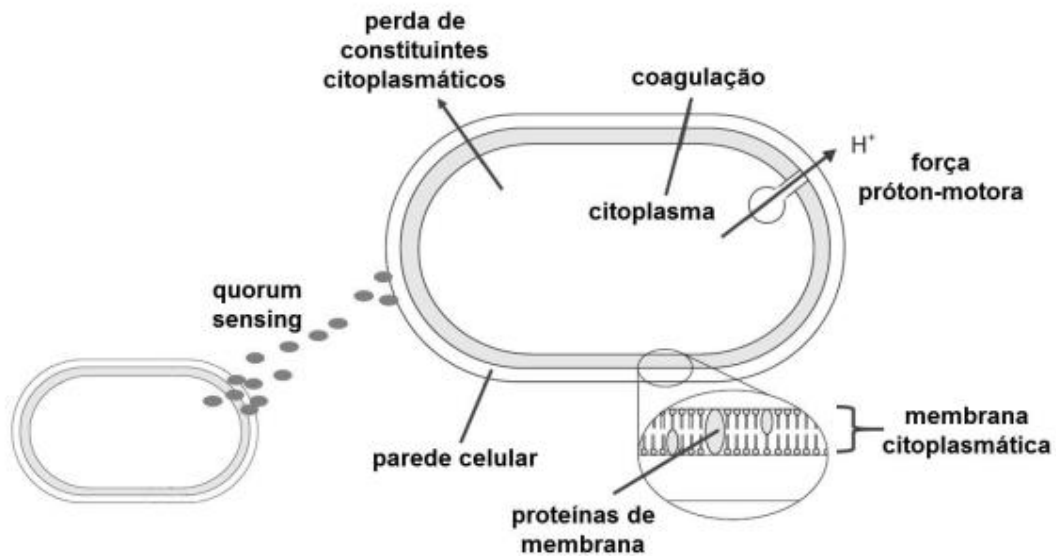


Figura 9: Representação dos alvos bacterianos atingidos pela ação do OEO. Fonte: adaptado de Burt (2004) e Scandorieiro et al. (2016).

Bassolé e Juliani (2012) constataram que o OEO geralmente possui melhor atividade antibacteriana do que o carvacrol e o timol combinados, mostrando que a interação com os componentes minoritários é importante para a atividade antimicrobiana (CERVATO et al., 2000; GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014; GILLING et al., 2014; KALEMBA; KUNICKA, 2003; ROMERO et al., 2012).

Esses compostos, carvacrol e timol, foram relatados como tendo um caráter lipofílico, atuando na parede celular e interferindo em enzimas catalíticas de membrana e enzimas responsáveis pela produção de energia e proteínas, causando como resultado a morte celular. Além disso, a presença de um anel aromático e um grupo hidroxila é importante para a atividade antimicrobiana, sendo que esses grupos químicos são os responsáveis pelas alterações na morfologia e agregados das hifas, inibindo tanto a germinação quanto o crescimento micelial, resultando na lise da parede das hifas, pois interagem com a membrana celular dos agentes patogênicos microbianos (NUMPAQUE et al., 2011; SHIRZAD et al., 2011).

Outros estudos demonstram a atividade do OEO além da ação antibacteriana e antifúngica, possui ação antiviral, antioxidante e anticancerígena (CERVATO et al., 2000; GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014; GILLING et al., 2014; KALEMBA; KUNICKA, 2003; ROMERO et al., 2012).

2.8.3 Aplicação em alimentos

A aplicação do OEO em alimentos tem sido frequentemente descrita, principalmente, quando aplicado em embutidos como salames, com a finalidade de diminuir a incidência de fungos durante a maturação dos mesmos. Outros estudos relatam a utilização em superfícies de manipulação de alimentos, filmes e embalagens, bem como em carnes frescas e frutas. Em laticínios, no Brasil, a sua utilização foi descrita em queijo coalho (BARROS et al., 2009; BOTREL et al., 2010; dos SANTOS RODRIGUES et al., 2017; ELSHAFIE et al., 2015; SOUZA et al., 2014; ZANTAR et al., 2014).

2.8.4 Mel

Entre os compostos produzidos por animais, o mel se destaca, possuindo atividade antimicrobiana bem documentada nas literaturas médicas mais antigas do mundo e, atualmente, tem sido reavaliado como alternativa para combater patógenos multirresistentes. Além do mel, a própolis também tem efeito contra agentes infecciosos (MANDAL; MANDAL, 2011; NISHIO et al., 2014; STEPANOVIĆ et al., 2003).

O mel é uma solução açucarada natural produzida por abelhas a partir de composto de plantas, que é recolhido, transformado, depositado, desidratado e armazenado em favos das colmeias. Ainda deve apresentar teores de açúcares maior que 60%; quantidade de sacarose (indicador de colheita prematura) de menor que 5%; umidade menor que 20%; presença de sólidos insolúveis menores que 0,1%; concentração de ácidos livres menor que 50 mEq/kg; condutividade elétrica menor que 0,8 mS/cm; atividade diastásica maior que 8 Göthe; e concentração de hidroximetilfurfural menor que 40 mg/kg (BRASIL, 2003). Apesar de seu uso ser relatado desde as civilizações antigas, o estudo das propriedades bactericidas da solução foi retomado apenas por Van Ketel no final do século XIX (DUSTMANN, 1979; JONES, 2001; STOBART, 2014;).

Ao mel são atribuídas propriedades medicinais como benefícios ao sistema imunológico e efeitos antidepressivo, anti-inflamatório, analgésico, sedativo, expectorante e antimicrobiano, sendo que seu uso medicinal perdurou na civilização européia até a primeira metade do século XX, usado inclusive pelos russos, como agente curativo, durante a Primeira Guerra Mundial (BOGDANOV, 2016; WIESE, 1986).

Possui uma grande quantidade de açúcares simples, em média 32% de glicose, 38% de frutose, pequenas quantidades de outros açúcares, como sacarose, maltose e outros dissacarídeos. Há ainda sais minerais, como potássio, sódio, cloro, enxofre, cálcio, fósforo, silício, ferro e magnésio, aminoácidos e enzimas, além de outras 200 substâncias diferentes,

como moléculas como ácido glucurônico, responsável pela acidez, enzima glucose oxidase (produção de peróxido de hidrogênio) (EZZ EL-ARAB et al., 2006; KHAN; ABADIN; RAUF, 2007; NOGUEIRA COUTO, COUTO, 2006).

De acordo com Nishio et al. (2016), méis de abelhas indígenas sem ferrão como *S. bipunctata* e *S. postica*, em seu estudo, apresentaram maior efeito antibacteriano do que o mel da abelha *A. mellifera*. Porém méis de abelhas indígenas possuem um valor comercial mais elevado (ALVES et al., 2005).

Os meliponíneos, como são chamadas as abelhas indígenas nativas, entre elas a *S. bipunctata*, produzem mel em menor quantidade quando comparado à produção de *A. mellifera*, porém é considerado um produto diferenciado devido a ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, flavonóides, minerais e uma extensa variedade de compostos orgânicos, contribuem para a cor, odor e sabor específico. Ainda, a principal diferença está na umidade, elevada em méis de abelhas indígenas, tornando-o menos denso quando comparado ao mel das *A. mellifera*, exigindo maiores cuidados para conservação (ANACLETO, et al. 2008; BIJLSMA, 2006; BORSATO, 2013; CARVALHO, et al. 2005).

O mel Manuka, produzido por abelhas na Nova Zelândia produz é o mais estudado e possui ação comprovada cientificamente no combate de diversas bactérias, incluindo as resistentes. As abelhas da Nova Zelândia retiram da flor de manuka uma substância que reforça o poder do mel, que é responsável por todos os benefícios que outros tipos de mel não possuem (LLOYD ROBERTS et al., 2015).

2.8.5 Atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana dos méis está relacionada a inúmeros fatores relacionados à composição química, desde diferenças no solo, condições atmosféricas, diversificação vegetal, que interferem na formação do mel, como baixa A_w que resulta na redução da captação de água pela bactéria, alterando seu metabolismo bacteriano (AMOR, 1978; OLAITAN; ADELEKE; OLA, 2007), alta pressão osmótica, baixo pH, variando entre 3,2 e 4,5, está abaixo do mínimo necessário para o crescimento de bactérias como *P. aeruginosa* (4,5) e *E. coli* (4,0), prejudicando o crescimento bacteriano (HANKIN,1987), o sistema glucose/oxidase com formação de peróxido de hidrogênio, presença de componentes fitoquímicos e de substâncias voláteis (MAVRIC et al, 2008; WESTON, 2000).

Silva et al. (2006) mostram que o mel apresenta uma baixa atividade de água, além da acidificação natural do meio, conferindo condições desfavoráveis para o crescimento de bactéria. Na presença de água e oxigênio, a enzima glicose-oxidase, converte glicose, em

ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, são consideradas substâncias relevantes de ação oxidante, que afetam o envoltório dos microrganismos, conservando a esterilidade do mel durante a maturação (BANG et al., 2003; SATO, MYATA, 2000; WESTON, 2000).

O acúmulo do peróxido de hidrogênio pode variar dependendo da origem do mel, sendo que alguns méis atingem um acúmulo máximo no período de 4 horas após a incubação a uma temperatura de 37 °C (BANG; BUNTTING; MOLAN, 2003).

A capacidade antibacteriana já é comprovada contra diversas bactérias, inclusive cepas de interesse clínico, como MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) e, também são demonstradas na literatura que as bactérias não desenvolvem resistência a ele (SHENOY et al., 2012; SHERLOCK et al., 2010; VIUDA-MARTOS et al., 2008). No entanto, vale a ressaltar que seu potencial antibacteriano varia conforme a origem e o processamento do mel, o que torna importante os ensaios de atividade antibacteriana para avaliar previamente a eficácia de um mel específico antes de aplicá-lo como agente terapêutico (D'AGOSTINO; LA ROSA; ZANELLI, 1961; RADWAN; EL-ESSAWY; SARHAN, 1984).

O mel Manuka, possui a capacidade de atuar de forma sinérgica com antibióticos. Contudo, um dos maiores obstáculos que enfrenta a introdução desse mel como um produto de linha de frente (e não último recurso, como é frequentemente o caso) é a capacidade de reproduzir a excelente eficácia observada in vitro durante os ensaios clínicos in vivo (LLOYD ROBERTS et al., 2015).

Em estudos sobre o possível mecanismo de ação desse mel, observou-se que para inibir o desenvolvimento de MRSA, o mel Manuka afeta os últimos estágios da divisão celular, após a conclusão da formação de septos. Assim, a produção reduzida de peptidoglicano e /ou seu sequestro em um estado inativo resulta em duas células-filhas remanescentes devido à incapacidade do septo a ser degradado, o que, em última instância, leva à morte celular (**Figura 10**).

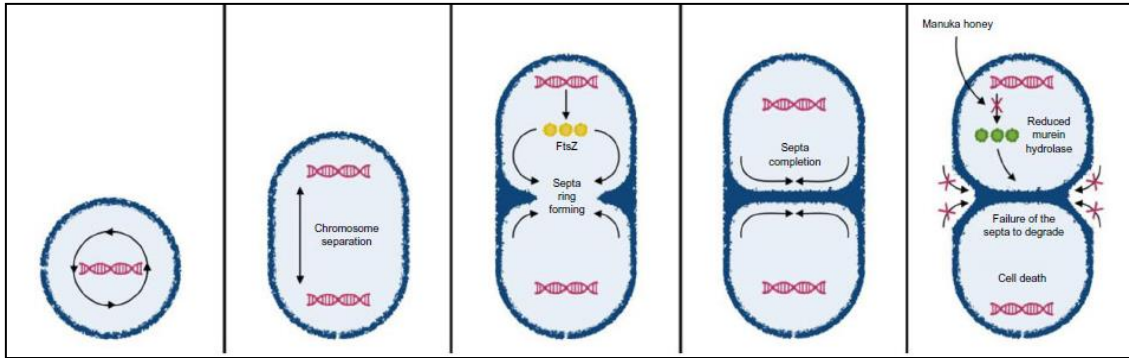


Figura 10: Desenvolvimento celular de *S. aureus* com mel Manuka. O mel atua no último estágio da divisão celular, onde interrompe a capacidade do septo de ser degradado para gerar as duas células-filhas, fazendo com que as células-filhas permaneçam unidas e, posteriormente, levando a morte celular. Fonte: Lloyd Roberts et al. (2015).

Em contraste, o mecanismo de ação proposto, nesse mesmo estudo, para *P. aeruginosa*, é o de lise celular. No entanto, outros estudos apontam a capacidade do mel manuka em afetar o desenvolvimento celular, assim como acontece com *S. aureus* (GOTOH et al., 1989; HENRIQUES et al., 2011; LLOYD ROBERTS et al., 2015; ROBERTS et al., 2012; SUGAWARA et al., 1996).

Lloyd Roberts et al. (2015) propõe que o mel de Manuka causa desestabilização do envelope celular através da regulação negativa de uma proteína estrutural chave (OprF), que está envolvida na manutenção da forma celular e da estabilidade do envelope celular. A perda desta proteína resulta no afrouxamento da membrana, o que diminui a viabilidade celular e, em último caso, leva à lise celular (**Figura 11**).

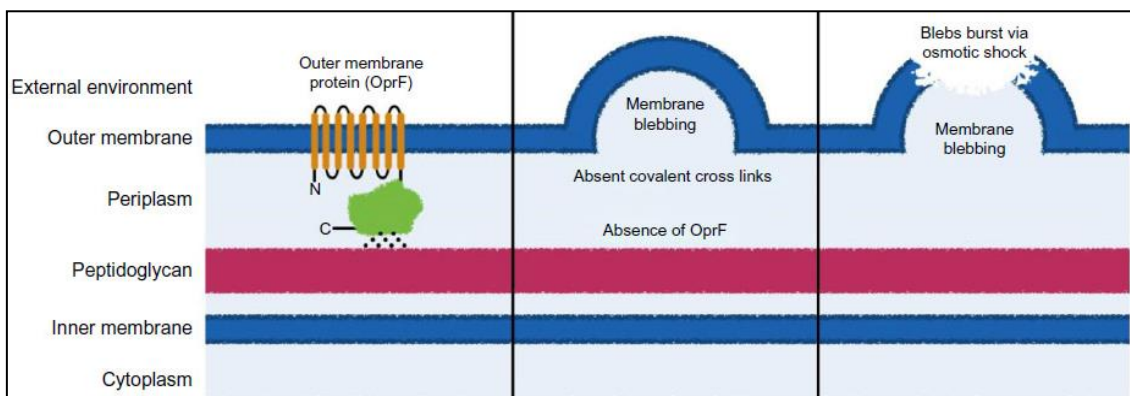


Figura 11: Mecanismo de ação do mel de Manuka para *P. aeruginosa* observado por Lloyd Roberts et al. (2015) em seu estudo. O mel de Manuka causa desestabilização do envelope celular através da regulação negativa de uma proteína estrutural chave (OprF), que está envolvida na manutenção da forma celular e da estabilidade do envelope celular. A perda desta proteína resulta no afrouxamento da membrana, o que diminui a viabilidade celular e, em último caso, leva à lise celular.

Ainda, Belewu e Morakinyo (2009), ao avaliarem a eficácia de mel como conservante biológico em queijos na África Ocidental, constataram que, devido à sua alta pressão osmótica, pH baixo e peróxido de hidrogênio (produto final do sistema de oxidação da glicose), o mel pode ser usado para melhorar a vida útil e as qualidades nutricionais do queijo.

Paralelamente ao uso do mel como antibacteriano, diversas propriedades medicinais do mel são apontadas pela literatura, sendo uma delas seu efeito antioxidante. Substâncias oxidativas reagem com lipídios, proteínas, açúcares e ácidos nucleicos de células; prejudicando o metabolismo celular (VIUDA-MARTOS et al., 2008).

O mel, apesar de conter espécies reativas de oxigênio, também contém compostos fenólicos, ácido fenólico e os flavonoides, provenientes da origem botânica do mel, com capacidade antibacteriana, anticancerígena e antioxidante (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; ESTEVINHO et al., 2008; YAO et al., 2003).

Ainda, o efeito antifúngico de alguns méis, especialmente os provenientes de favas escuras e que contêm altas concentrações de própolis, tem sido relacionado à presença de um número de ácidos aromáticos, incluindo o cinamato de benzilo, cinamato de metilo, ácido cafeico, cinamato de cinamilo, cinnamoylglicine, e os terpenóides (popularmente conhecidos como própolis). Além disso, pode haver proteínas no mel que tenham atividade antifúngica (BOUKRAË et al., 2008; KHOSRAVI et al., 2008; EL-GENDY, 2010; CANDIRACCI et al., 2012; MOUSSA et al., 2012).

Entretanto, são necessários estudos aprofundados sobre os mecanismos de ação de méis de abelhas indígenas brasileiras. Recentemente, trabalhos descrevem os mecanismos responsáveis pelas propriedades medicinais do mel, possibilitando seu “redescobrimto” pela medicina moderna; ainda que haja hesitação em usá-lo na clínica devido à falta de prática (BERGMAN et al., 1983; EMSEN, 2007; MOLAN, 1992; MOLAN, 1997; MOLAN; RHODES, 2015).

2.8.6 Aplicação em alimentos

O mel tem sido utilizado em vários alimentos, sozinho ou associado a outros compostos, como óleos essenciais de alho e de limão. Diversos estudos têm testado o mel na produção de queijos e outros derivados lácteos como antimicrobiano relacionados ao controle de fungos, principalmente leveduras (ADUALEM, 2013; BELEWU; BELEWU; GANIYUL, 2011; BELEWU; MORAKINYO, 2009).

Em iogurtes, além de ser utilizado para dar sabor, vários autores têm estudado a aplicação do mesmo, junto com frutas, para aumentar o tempo de prateleira. No estudo de Rotar et al. (2015), porém, verificaram que o mel utilizado inibe a ação de bactérias lácticas.

Referências

- ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Mercado de queijos tem alto potencial de crescimento no Brasil**, 2017.
- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1997. 464p.
- ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology and Infection**, 16(1), 16-23, 2010.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, v. 22, n. 9, p. 1041–1047, 2002.
- ALVES, C. C. C., GEMAL, N. D. H., CORTEZ, M. A. S., FRANCO, R. M., & MANO, S. B. Lactobacillus acidophilus and of direct acidification to minas frescal cheese production. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, 63(6), 1559-1566, 2011.
- ALVES, R. M. O. et al. **Custo de produção de mel: uma proposta para abelhas africanizadas e meliponíneos**. 1. ed. Série meliponicultura- nº 02. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005. 14 p.
- AMOR, D. M. **Composition, properties and uses of honey: a literature survey**. Leatherhead, Reino Unido: The British Food Manufacturing Industries Research Association, 1978. 84 p.
- ANDUALEM, B. Combined antibacterial activity of stingless bee (*Apis mellipodae*) honey and garlic (*Allium sativum*) extracts against standard and clinical pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 3(9), 725-731, 2013.
- ARIMA, A. A.; PAVINATTO, F. J.; OLIVEIRA, O. N.; GONZALES, E. R. The negligible effects of the antifungal natamycin on cholesterol-dipalmitoyl phosphatidylcholine

monolayers may explain its low oral and topical toxicity for mammals. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 122, 202-208, 2014.

BALAGUER, M. P. et al. Functional properties and antifungal activity of films based on gliadins containing cinnamaldehyde and natamycin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, n.3, p. 62-71, 2014.

BANG, L. M.; BUNTTING, C.; MOLAN, P. The Effect of Dilution on the Rate of Hydrogen Peroxide Production in Honey and Its Implications for Wound Healing. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, n. 2. p. 267-273, 2003.

BARROS, J. C. et al. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 6, p. 1139–1143, 2009.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989–4006, 2012.

BIJLSMA, L. et al. Water content of stingless bee honey (*Apidae, Meliponini*): Interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 37, v.4, p. 480–486, 2006.

BORSATO, D. M. **Composição química, caracterização polínica e avaliação de atividades biológicas de méis produzidos por meliponíneos do Paraná (Brasil)**. 2013. 132 f. Tese (Doutorado em Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2013.

BOTREL, D. A., Soares, N. D. F. F., Espitia, P. J. P., de Sousa, S., & Renhe, I. R. T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Ceres**, 57(3), 2010.

BOUKRAÂ, L.; BENBAREK, H.; AHME,D M. Synergistic action of starch and honey against *Aspergillus niger* in correlation with Diastase Number. **Mycoses**. 51:520–522, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. **Decreto Lei nº 216, 18 de setembro de 2003**. Diário da república - I série-A. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da] União**. Seção 1, p. 3977.

- BRUSTOLIN, J.C. Uso de natamicina no controle e desenvolvimento de fungos em salame tipo italiano. Santa Maria, 2009, 53 f. **Dissertação** (Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria.
- BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.
- CALLON, C.; PICQUE, D.; CORRIEU, G.; MONTEL, M.C. Ripening conditions: a tool for the control of *Listeria monocytogenes* in uncooked pressed type cheese. **Food Control**, v. 22, p.1911-1919, 2011.
- CANDIRACCI, M.; CITTERIO, B.; PIATTI, E. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. **Food Chemistry**, 131(2), 493-499, 2012.
- CERVATO, G.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. Antioxidant properties of (*Oregano vulgare*) leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, 24, 453–465, 2000.
- CHAFTAR, N. et al. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of 19 essential oils. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 2–7, 2015
- CHUN, S. S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809–816, 2005.
- CLEFF, M. B. et al. Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 704–709, 2008.
- COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-788. 2005.
- D'AGOSTINO BARBARO, A.; LA ROSA, C.; ZANELLI, C. Attività antibatterica di mieli Siciliani. **Quadernidella nutrizione**, v. 21, n. 1-2, p. 30-44, 1961
- DE SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 308–311, 2010

- DELVES-BROUGHTON, J. Nisin as a food preservative. **Food Australia**, n. 57, p. 525-527, 2005.
- DEUEL, H. J., JR., CALBERT, C. E., ANISFELD, L., MCKEEHAN, H., & BLUNDEN, H. D. Sorbic acid as fungistatic agent for foods. II Metabolism of b-unsaturated fatty acids with emphasis on sorbic acid. **Food Research**, v.19, n. 1, p. 13–19, 1954.
- DORES, M. T. D.; NOBREGA, J. E. D.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology (Campinas)**, 33(1), 180-185, 2013.
- DOS SANTOS RODRIGUES, J. B. et al. Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. **Food Control**, 73, 1237-1246, 2017.
- DUSTMANN, J. H. Antibacterial effect of honey. **Apiacta**, v. 14, n. 1, p. 7-11, 1979.
- EL-GENDY, M. M. A. In vitro evaluation of medicinal activity of Egyptian honey from different floral sources as anticancer and antimycotic infective agents. **Journal of Microbiology Biochemistry Technology** 2: 118–123, 2010.
- ELSHAFIE, H. S. et al. Camele, I. Antifungal activity of some constituents of *Origanum vulgare* L. essential oil against postharvest disease of peach fruit. **Journal of Medicinal Food**, 18(8), 929-934, 2015.
- ESTEVINHO, L. et al. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 12, p. 3774-3779, 2008.
- EZZ EL-ARAB, A.M.et al. Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1-13, 2006.
- FAJARDO, P. et al. Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 4, p. 349-356, 2010.
- FERREIRA ET AL. Fatores que afetam o crescimento de microrganismos em queijos. **Revista Leite e Derivados**. 76: 91-96, 2004.

- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.
- FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994.
- GARDE, S. et al. Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, n. 1, p. 59-65, 2011.
- GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. **BioMed Research International**. 2014.
- GILLING, D. H.; KITAJIMA, M.; TORREY, J. R.; BRIGHT, K. R. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. **Journal of Applied Microbiology**. 116:5, 1149–1163, 2014.
- GEURTS, T. J.; WALSTRA, P.; MULDER, H. Transport of salt and water during salting of cheese. II. Quantities of salt taken up and of moisture lost. Netherlands **Milk and Dairy Journal**, 34(4), 229-254, 1980.
- GOTOH, N.; WAKEBE, H.; YOSHIHARA, E.; NAKAE, T.; NISHINO, T. Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. **Journal of Bacteriology** 171(2):983–990, 1989.
- HENRIQUES, A. F.; JENKINS, R. E.; BURTON, N. F.; COOPER, R. A. The effect of manuka honey on the structure of *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease** 30(2):167–171, 2011.
- HOFMANN, A. W. Neue flüchtige Säure der Vogelbeeren. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 110, n. 2, p. 129-140, 1859.
- INMETRO. **Relatório sobre Análise de Gorduras e Colesterol em Queijo**. Brasília, DF, 2010.
- JERSEK, B. et al. Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum*. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, 65(2), 199-208, 2014.

- JONES, R. Honey and healing through the ages, In MUNN, P.; JONES, R (eds.). **Honey and healing**. Cardiff, Reino Unido: International Bee Research Association, 2001, p. 1-4.
- KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1991. 24 p.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453–462, 2001.
- LIICK E. Sorbic acid as a food preservative. **International Flavours and Food Additives**. 7, 122-124 and 127, 1976.
- LLOYD, R. E. A; BROWN, H. L.; JENKINS, R. E. On the antibacterial effects of manuka honey: mechanistic insights. **Research and Reports in Biology**, 2015.
- MANDAL, D. M.; MANDAL, S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 154–160, 2011.
- MARQUARDT, L; BACCAR, N. M; ROHLFES, A. L. B; OLIVEIRA, M. S. R. **Manual para elaboração de queijos diferenciados**. Santa Cruz do Sul: UNISC, 2013.
- MARTÍNEZ, M. A. et al. Effect of natamycin on cytochrome P450 enzymes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 281-284, 2013.
- MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo minas artesanal da região do Serro**, 2006.
- MAVRIC, E.; WITTMANN, S.; BARTH, G.; HENLE, T. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. **Molecular Nutrition of Food Research** 52, 483–489, 2008.
- MAZDEH, F. et al. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in Iranian doogh. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 7, n. 2, p. 115-119, 2014.
- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 89-99, 2010.
- McLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in

- microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p.15-33, 2004.
- MEDINI, H. et al. Seasonal and geographical influences on the chemical composition of *Juniperus phoenicea* L. essential oil leaves from the northern Tunisia. **Chemistry and Biodiversity**. 6:9, 1378–1387, 2009.
- MIGLIANELLI, A. **Aditivos em Los Alimentos**. Disponível em: <http://www.ecologiasocialnqn.org.ar/alimentos2.htm>
- MOLAN, P. C. Honey as an antimicrobial agent. In: MIZRAHI, A.; LENSKY, Y. (Eds.). **Bee Products**. Nova Iorque, Estados Unidos: Plenum Press, 1997.p. 27-37.
- MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee world**, v. 73, n. 1, p. 5-28, 1992.
- MOLAN, P. C.; RHODES, T. Honey: A Biologic Wound Dressing. **Wounds**, v. 27, n. 6, 2015.
- MORAES, A. R. F. et al. **Desenvolvimento e avaliação de filme ativo antimicrobiano na conservação de manteiga**. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27 (supl.), p.33-36, 2007.
- MORO, A.; LIBRAN, C. M.; BERRUGA, M. I.; ZALACAIN, A.; CARMONA, M. Mycotoxicogenic fungal inhibition by innovative cheese cover with aromatic plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 93(5), 1112-1118, 2013.
- MOUSSA, A. et al. Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** 7:554–557, 2012.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**. 6: 12, 1451–1474, 2013.
- NISHIO, E. K. et al. Antibacterial activity of honey from stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 5, p. 452-460, 2016.
- NUMPAQUE, M. A.; OVIEDO, L. A.; GIL, J. H.; GARCÍA, C. M.; DURANGO, D. L. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant

pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. **Tropical Plant Pathology**, 36(1), 3-13, 2011.

OLAITAN, P. B.; ADELEKE, E. O.; OLA, O. I. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Science**, v. 7, n. 3, p. 159-165, 2007.

OLIVEIRA, T. M. et al. Avaliação do teor de natamicina em queijos Gorgonzola através de quantificação espectrofotométrica. **Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes**, v. 61, n. 349, p. 48-50, 2006.

OLSON, J. C.; MOCQUOT, Y. G. Leche y Productos láteos. In: Elliott R. P. et al. **Ecología microbiana de los alimentos: productos alimenticios**. Espanha: Acríbia, v.2, 1985.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, 2004.

PREUSS, H. G.; ECHARD, B.; ENIG, M.; BROOK, I.; ELLIOTT, T. B. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 272(1), 29-34, 2005.

RAJCHL, A. et al. Stability of nutritionally important compounds and shelf life prediction of tomato ketchup. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 4, p. 465-470, 2010.

RESA, C. P. O.; JAGUS, R. J.; GERSCHESON, L. N. Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 101-108, 2014.

ROBERTS, A. E.; MADDOCKS, S. E.; COOPER, R. A. Manuka honey is bactericidal against *Pseudomonas aeruginosa* and results in differential expression of oprF and algD. **Microbiology**, 158(Pt 12):3005–3013, 2012.

ROMERO, A. L. et al. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica - Ciências biológicas e da saúde**, v. 14, n. 4, p. 231–235, 2012.

ROTAR, A. M. et al. Effect of goji berries and honey on lactic acid bacteria viability and shelf life stability of yoghurt. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(1), 196, 2015.

- SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, Maria de Lourdes R. de. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista Saúde Pública**, v. 22, p. 458-461, 1988
- SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. **Frontiers in Microbiology**, 7, 2016.
- SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos*. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 4, p. 403- 411, 2009.
- SGHEDONI, A.; RETTL, C.; SOUZA, G. P. Queijo Minas. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 34, n. 203, 1979.
- SHENOY, V. P. et al. Honey as an antimicrobial agent against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infected wounds. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 102-105, 2012.
- SHERLOCK, O. et al. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 47, 2010.
- SHIRZAD, H. et al. Assessment of the antifungal activity of natural compounds to reduce postharvest gray mould (*Botrytis cinerea* pers.: fr.) Of kiwifruits (*actinidia deliciosa*) during storage. **Journal of Plant Protection Research**, 51(1), 1-6, 2011.
- SILVA, E. P.; BERGAMINI, A. M. M.; DE OLIVEIRA, M. A. **Alimentos e agentes etiológicos envolvidos em toxinfecções na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil– 2005 a 2008**. Bepa, São Paulo, v. 7, n. 77, p. 4-10, 2010.
- SOHIER, D. et al. Important genetic diversity revealed by inter-LTR PCR fingerprinting of *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii* strains from French traditional cheeses. **Dairy Science and Technology**, v.89, p.569-581, 2009.
- SOUZA, E. L.; BARROS, J. C.; OLIVEIRA, C. E. V.; CONCEIÇÃO, M. L. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, 137:2-3, 308–311, 2010.

- SOUZA, E. L. et al. Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44, 29–35, 2013.
- STEPANOVIC, S.; ANTIC, N.; DAKIC, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs, **Microbiology Research**, vol. 158, 353-357, 2003.
- STOJKOVIĆ, D. et al. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. **Archives of Biological Sciences**, vol. 65, 639–644, 2013.
- STOPFORTH, J. D.; SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F. 3 Sorbic Acid and Sorbates. **Antimicrobials in Food**, p. 49, 2005.
- SUGAWARA, E.; STEIERT, M.; ROUHANI, S.; NIKAIDO, H. Secondary structure of the outer membrane proteins OmpA of *Escherichia coli* and OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriology**, vol. 178: 6067–6069, 1996.
- SUZUKI, É. Y., SOLDATI, P. P., CHAVES, M. G. A. M., AND NÁDIA, R. B. Essential oil from *Origanum vulgare* Linnaeus: an alternative against microorganisms responsible for bad perspiration odor. **Journal of Young Pharmacists**, vol. 7: 12–20, 2015.
- SZABÓ, M. Á et al. Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. **Phytotherapy Research**. 24:5, 2010.
- TURE, H. et al. Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roqueforti* on fresh kashar cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 154-160, 2011.
- TURNER, K. W.; THOMAS, T. D. Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, 15(3), 265-276, 1980.
- UPADHYAY, A. et al. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: A minireview of the mechanistic basis. **BioMed Research International**, 2014
- VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Editorial Acribia, v. 1, 1995.

- VENTURINI, A. T. Natamicina: análise e controle em sucos de uva e vinhos nacionais e importados comercializados no Brasil. 2012. 57f. **Dissertação** (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012
- VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. R117-R124, 2008. Suplemento.
- WALKER, R. Toxicology of sorbic acid and sorbates. **Food Additives & Contaminants**, v. 7, n. 5, p. 671-676, 1990
- WESTON, R. J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. **Food Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 235-239, 2000.
- WIESE, H. Nova apicultura. Porto Alegre, Brasil: Agropecuária, 1986. 493 p.
- WILLIAMS, G. C.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, v. 2, p. 4128-4135. 2003.
- World Health Organization (WHO, 2006). **Compendium of food additive specifications**. *FAO JECFA Monographs*, 2006.
- YAO, L. et al. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 159-168, 2003.
- ZANINI, S. F.; SILVA-ANGULO, A. B.; ROSENTHAL, A.; RODRIGO, D.; MARTÍNEZ, A. Effect of citral and carvacrol on the susceptibility of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* to antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 58(5), 486-492, 2014.
- ZANTAR, S. et al. Effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum compactum* essential oils on the shelf life of fresh goat cheese. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 26(2), 76-84. 2014.
- ZHOU, H.; FANG, J.; TIAN, Y.; LU, X. Y. Mechanisms of nisin resistance in Gram positive bacteria. **Annals of Microbiology**, vol.64, 413-420, 2014.
- ZOCCAL, R. **Queijos: produção e importação**, 2016.
<http://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao>. Acesso em: 13/06/2017.

ARTIGO 1

Pesquisa de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados de queijos artesanais no Brasil

Anna C. L. P. de Campos¹; Juan J. Puño-Sarmiento¹; Leonardo P. Medeiros¹; Luís E. S. Gazal¹; Renato Pariz Maluta¹; Armando Navarro³; Renata K. T. Kobayashi¹; Eder P. Fagan²; Gerson Nakazato^{1*}

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

²Setor de Veterinária e Produção Animal, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Paraná, Brazil.

³Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico.

Resumo

O queijo artesanal é amplamente consumido no Brasil, no entanto por, em sua maioria, ser fabricados com leite cru, podem estar contaminados com bactérias patogênicas. Neste estudo, pesquisamos a presença de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em queijos artesanais de diferentes estados do Brasil. A partir de 147 amostras de queijo, 39 isolados foram positivas para *E. coli* (28 amostras de queijo), 25 foram positivas para *S. aureus* (10 amostras de queijos). Entre os 39 isolados de *E. coli*, um foi positivo para o gene *eaeA* (codifica a adesina intimina) e negativo para os genes *bfpA* e *efa1/lifA*, usando o método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e, portanto, foi classificado como *E. coli* enteropatogênica atípica (aEPEC). Dois isolados de *E. coli* foram positivos para os genes do pentaplex de Jonhson para *E. coli* patogênica extraintestinais (ExPEC). O isolado aEPEC pertence ao sorogrupo O127, enquanto os isolados ExPEC foram do sorotipo O73: H12 e O64474: H8 (novo sorotipo no Brasil). A maioria dos isolados de *E. coli* pertenceram ao grupo filogenéticos A (28,2%) de Clermont. A maioria dos isolados de *E. coli* apresentaram um padrão de aderência agregativa (46,0%) em cultura de células HeLa (células de origem humana). Quatro isolados de *E. coli* (10,3%) apresentaram formação de biofilme moderado. Três amostras de *S. aureus* mostraram formação de biofilme em placas de poliestireno. Um isolado de *E. coli* mostrou resistência a três classes de antimicrobianos (tetraciclina, ampicilina e ácido nalidíxico). Um dos isolados de *S. aureus* apresentou resistência a cinco antimicrobianos (ampicilina, estreptomicina, cefoxitina, penicilina e ciprofloxacina) e outro a quatro antimicrobianos (tetraciclina, cefoxitina, cloranfenicol e ampicilina). A presença de um isolado aEPEC O127 e de um novo sorotipo (O64474:H8) no Brasil, além das amostras de *S. aureus* resistentes a múltiplos antimicrobianos, representa um risco potencial para a saúde pública.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; EPEC; *Staphylococcus aureus*, queijos artesanais; patogenicidade; resistência aos antimicrobianos.

1 Introdução

O queijo Minas meia cura é um dos queijos mais populares e consumidos no Brasil. Pode ser feito com leite cru ou pasteurizado através de coagulação enzimática. É caracterizado por alto pH e umidade (> 55%) e porcentagem de sal. Este queijo torna-se susceptível à contaminação devido à sua alta umidade, associada a condições de higiene precárias durante a sua produção, uso de leite não pasteurizado e ambiente de maturação e longo tempo de transporte sob temperatura inadequada (Cunha *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2009).

No Brasil, existem regras para a produção e comercialização de produtos lácteos, mas não são aplicadas de forma comum. *E. coli*, assim como todos os coliformes, é utilizada como um indicador de contaminação e condições de higiene, durante o processamento ou pós-processamento de alimentos. Sua presença pode indicar a presença de patógenos entéricos (Moraes *et al.*, 2009; Okura and Marin, 2014). Além disso, algumas cepas de *E. coli* podem adquirir novos genes de virulência e se tornarem patogênicas.

As infecções do trato urinário (UTI) ou doenças entéricas são causadas por grupos específicos de *E. coli*, denominadas ExPEC (*E. coli* patogênica extra-intestinal) ou DEC (*E. coli* diarreogênica). As amostras de DEC podem ser classificadas em seis patotipos (Kaper *et al.*, 2004), os quais são separados por padrões de patogenicidade: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* produtora de shiga-toxina (STEC). O patotipo STEC possui uma subcategoria denominada *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que inclui o sorotipo O157: H7. Alguns estudos sugerem que a contaminação de alimentos por *E. coli* são provenientes da falta de higiene ao manusear alimentos (Rapini *et al.*, 2005; Vicent *et al.*, 2010).

Além dos patotipos de *E. coli*, outros agentes patogênicos, como *Listeria monocytogens*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*, são transmitidos por meio de produtos lácteos. As toxinas produzidas por algumas cepas de *S. aureus* são responsáveis por vários surtos de intoxicação alimentar causada por queijos contaminados (Kadariya *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2016).

Outra preocupação relacionada à contaminação bacteriana em alimentos, é a resistência bacteriana aos múltiplos antimicrobianos. A produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) por *E. coli*, e a resistência à meticilina (MRSA) por *S. aureus*,

estão entre as bactérias multirresistentes mais importantes para infecções humanas (Hiramatsu *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 2015; Bodnar *et al.*, 2016).

Os produtos de origem animal requerem atenção especial, pois eles podem ser veículos para disseminação de microrganismos patogênicos e resistentes aos antimicrobianos. No entanto, o papel dos queijos artesanais como reservatórios para os genes de resistência não é bem conhecido no Brasil (Szmolka *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2016). Portanto, o objetivo deste estudo foi pesquisar a presença de genes de virulência e determinar os padrões de resistência antimicrobiana de *E. coli* potencialmente patogênica, e de resistência aos antimicrobianos de *S. aureus*, em queijos artesanais comercializados no Brasil.

2 Material e mtodos

2.1 Amostras de queijos artesanais e cepas bacterianas

Foram coletadas 147 amostras de queijos minas padrão artesanais, entre julho de 2014 e janeiro de 2016, em feiras livres e mercados municipais de cinco estados brasileiros: Paraná (64), São Paulo (49), Minas Gerais (24), Mato Grosso do Sul (8) e Bahia (2).

Aproximadamente 25 g de cada queijo foram diluídos em 225 mL de água de peptona tamponada (BPW), plaqueados em agar MacConkey (Difco®, Sparks, MD, EUA) e incubados a 37°C durante 24 h. Duas ou três colônias de cada placa foram selecionadas e testadas usando ensaios bioquímicos (Enterokit - Probac®) para identificar *E. coli*. Para o isolamento de *S. aureus*, as amostras diluídas BPW foram plaqueadas em agar Baird Parker (Difco®, Sparks, MD, EUA) adicionado solução de gema de ovo com telurito (5%, v/v) (Laborclin®) e incubadas a 37°C durante 24 h. Duas ou três colônias positivas de cada placa foram selecionadas para testes adicionais de catalase, coagulase, DNase e coloração de Gram. Todas as cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram armazenadas em infusão de cérebro coração (BHI) (Difco®) com 25% de glicerol (Sigma®, St. Louis, MO, EUA) a -80°C.

Os controles positivos e negativos utilizados neste trabalho foram obtidos da Coleção Bacteriana, do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Universidade Estadual de Londrina (**Table 1**).

2.2 Preparação do DNA

A preparação do DNA de *E. coli* foi realizada por lise térmica. As cepas foram crescidas em agar TSA (Difco®) a 37°C durante 24 h. O DNA foi extraído suspendendo sete colônias, da mesma cultura pura, em 200 µL de água esterilizada. A mistura foi submetida a

uma temperatura de 100°C durante 10 min, e centrifugada a 10.000g durante 6 min. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O DNA de *S. aureus* foi extraído utilizando a técnica de lise alcalina. As bactérias foram cultivadas em 3 mL de BHI (Difco, Detroit, EUA), e incubadas a 37°C, durante 24 h. O “pellet” bacteriano obtidos após centrifugação a 10.000g durante 5 min foi ressuspensão em tampão TE (Tris-EDTA) (Sigma, Poole, Reino Unido). Os reagentes utilizados para a extração de DNA genômico foram tampão TE (Sigma, Poole, Reino Unido), 10 µg/mL de lisozima (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 10% (p/v) de sulfato de dodecil de sódio (SDS) (Sigma, Poole, Reino Unido), 20 mg/L de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, EUA), NaCl 5M (Sigma, Poole, Reino Unido), solução de CTAB (Sigma, Poole, Reino Unido), fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1 (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e etanol P.A. (Sigma, Poole, Reino Unido), de acordo com os procedimentos descritos por Sambrook e Russell (2001).

2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de genes de virulência de DEC e ExPEC em isolados de *E. coli*

A presença de genes de virulência foi verificada usando três sistemas de Multiplex-PCR. Os seguintes marcadores de virulência foram utilizados para detectar DEC: *eaeA* (gene estrutural que codifica a adesina intimina em EPEC e EHEC), *bfpA* (gene estrutural para o *bundle forming-pilus* de EPEC típica), *efa1 / lifA* (fator para adesão em EHEC (*efa1*) / fator a inibidor de linfócitos A (*lifA*), *aggR* (ativador transcripcional de EAEC típica), *elt*, *est* (enterotoxinas de ETEC), *ipaH* (gene que codifica o antígeno H do plasmídeo de invasão, encontrado em EIEC), *stx1*, *stx2* (toxinas Shiga de EHEC), e *ehxA* (enterohemolisina, que pode ser encontrado na EHEC e EPEC). Os métodos de PCR foram previamente padronizados (Puño-Sarmiento *et al.*, 2014). Os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, seguido de coloração com Gel Red (Biotium®, Hayward, CA, EUA) e visualização em trans-iluminador-UV.

Outros genes de virulência de EAEC também foram testados. Eles estão localizados no plasmídeo AA, e incluem o gene de adesão fimbrial de aderência agregativa *aaF*, uma proteína anti-agregativa (dispersina) codificada pelo gene *aap* (anteriormente conhecido como *aspU*); *aaIC* (ilha ativada por *aggR*); e *aatA* (transportador de proteínas anti-agregativa).

Para a detecção de genes de ExPEC, os genes *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA* foram pesquisados (**Tabela 1**).

Tabela 1: Sequências dos iniciadores e condições utilizadas nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR).

Genes	Iniciadores	Sequências (5'-3')	Tamanho (pb)	Cepa controle	Referência
Multiplex-PCR (Diarreio gênica 1)					
<i>eaeA</i>	F R	CTGAACGGCGATTACGCGAA CCAGACGATACGATCCAG	917	E2348/69 (EPEC)	Aranda <i>et al.</i> , 2007
<i>bfpA</i>	F R	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326	E2348/69 (EPEC)	Aranda <i>et al.</i> , 2007
<i>aggR</i>	F R	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	254	O42 (EAEC)	Aranda <i>et al.</i> , 2007
<i>Elt</i>	F R	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATATTCCTGTT	450	H10407 (ETEC)	Aranda <i>et al.</i> , 2007
<i>Est</i>	F R	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	190	B41 (ETEC)	Aranda <i>et al.</i> , 2007
<i>ipaH</i>	F R	GTTCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	600	EDL 1284 (EIEC)	Aranda <i>et al.</i> , 2007
<i>Stx</i>	F R	GAGCGAAATAATTTATATGTG TGATGATGGCAATTCAGTAT	518	EDL 933 (EHEC)	Aranda <i>et al.</i> , 2007
Multiplex-PCR (Diarreio gênica 2)					
<i>eaeA</i>	F R	GACCCGGCACAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	E2348 (EPEC)	Paton and Paton, 1998
<i>stx1</i>	F R	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	EDL 933 (EHEC)	Paton and Paton, 1998
<i>stx2</i>	F R	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	EDL 933 (EHEC)	Paton and Paton, 1998
<i>ehxA</i>	F R	GCATCATCAAGCGTAGCTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	EDL 933 (EHEC)	Paton and Paton, 1998
PCR (Filogenético de Clermont)					
<i>chuA</i>	F R	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACAAAGACA	279	<i>E. coli</i> J96	Clermont <i>et al.</i> , 2013

<i>yjaA</i>	F R	TGAAGTGTCAGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	<i>E. coli</i> J96	Clermont <i>et al.</i> , 2013
<i>TspE4C2</i>	F R	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	<i>E. coli</i> Strain 20	Clermont <i>et al.</i> , 2013
<i>arpA</i>	F R	AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCCATACCGTACGCTA	400	<i>E. coli</i> Strain 20	Clermont, 2004
PCR (EAEC atípica 1)					
<i>aaiC</i>	F R	ATTGTCCTCAGGCATTTACACAG ACACCCCTGATAAAACAA	215	JM221, 042, 17-2	Lima <i>et al.</i> , 2013
<i>aatA</i>	F R	CTGGCGAAAGACTGTATCATC AATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	JM221, 042, 17-2	Schmidt <i>et al.</i> , 1995
Multiplex-PCR (EAEC atípica 2)					
<i>Aap</i>	F R	CTTGGGTATCAGCCTGAATG AACCCATTCGGTTAGAGCAC	310	JM221, 042, 17-2	Cerna <i>et al.</i> , 2003
AA probe	F R	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	629	JM221, 042, 17-2	Cerna <i>et al.</i> , 2003
Multiplex-PCR (Pentaplex de Johnson)					
<i>iroN</i>	F R	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTCCGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	553	<i>E. coli</i> 13	Johnson <i>et al.</i> , 2008
<i>ompT</i>	F R	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496	<i>E. coli</i> 13	Johnson <i>et al.</i> , 2008
<i>hlyF</i>	F R	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCGATACTCAG	450	<i>E. coli</i> 13	Johnson <i>et al.</i> , 2008
<i>Iss</i>	F R	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	<i>E. coli</i> 13	Johnson <i>et al.</i> , 2008
<i>iutA</i>	F R	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	<i>E. coli</i> 13	Johnson <i>et al.</i> , 2008
PCR (EPEC atípica)					
<i>efa1/lifA</i>	F R	AGAATGGAAGATCACACCAG ATAATGCCTTTCATCCACAC	310	E2348 (EPEC)	Narimatsu <i>et al.</i> , 2010

2.4 PCR para determinação do grupo filogenético

A determinação do grupo filogenético foi realizado para os isolados de *E. coli*, utilizando um ensaio de Multiplex-PCR como descrito por Clermont *et al.* (2013). Com base na presença ou ausência de genes (*chuA*, *yjaA* e *arpA*) e um fragmento de DNA não

codificado (TSPE4.C2), os isolados foram classificados em sete grupos filogenéticos de Clermont (A, B1, B2, C, D, E, ou F).

2.5 Sorotipagem

A sorotipagem foi realizada com soros específicos monoclonais de coelhos contra 187 antígenos somáticos (antígeno O) e 56 antígenos flagelares (antígeno H) de *E. coli* (Orskov e Orskov, 1984; Scheutz et al., 2004), do Departamento de Saúde Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Cidade do México.

2.6 Formação de biofilme

A produção de biofilme por *E. coli* foi testada conforme descrito por Wakimoto *et al.* (2004), com algumas modificações. As cepas foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) durante 24 h, a 37°C, sem agitação. Em seguida, inoculou-se 5 µL de cultura em 195 µL de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 0,45% de glicose, em placas de poliestireno de microlitros de fundo plano de 96 poços (BD Falcon). As placas foram cobertas e incubadas aerobicamente durante 24 h a 37 °C. Antes de colorir por cinco minutos com 0,5% de violeta de cristal (Sigma®), as amostras foram lavadas duas vezes com PBS 0,01 M, pH 7,4. O corante ligado a células aderentes foi solubilizado com 200 µL de etanol 95% (v/v) por poço. O biofilme foi quantificado usando um leitor de placas automatizado (Synergy™ HT, Bio-Tek, Winooski, VT, EUA) com comprimento de onda de 570 nm. A cepa de EAEC 042 e *E. coli* K12 HB101 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Os isolados foram avaliados de acordo com Wakimoto et al. (2004) em três categorias: grupo 1 ($OD_{570} > 0,2$), forte formação de biofilmes; Grupo 2 ($0,1 \leq OD_{570} \leq 0,2$), formação moderada de biofilme e grupo 3 ($OD_{570} < 0,1$), sem formação de biofilme.

Os isolados de *S. aureus* foram testados para produção de biofilmes em uma superfície de poliestireno corada com cristal violeta de acordo com Stepanovic *et al.* (2007). MRSA BEC 9393 e meio de cultura fresco foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente. A densidade óptica (OD) de cada poço foi medida a um comprimento de onda de 570 nm usando um leitor de placas automatizado (Synergy HT, Biotek, Winooski, EUA). O valor médio da OD do controle negativo (OD_c) foi utilizado para comparação com os obtidos dos isolados (OD_i). O OD_i de cada isolado foi obtido por meio de triplicatas menos a OD_c. Os isolados foram classificados como não produtores de biofilme quando $OD_i \leq OD_c$ e como produtores de biofilme quando $OD_i > OD_c$.

2.7 Ensaio de Adesão

Os ensaios de adesão de *E. coli* às células HeLa foi realizado de acordo com Cravioto *et al.* (1979), com algumas modificações. As células foram cultivadas em microplacas de cultura de tecidos de 24 poços (BD Falcon, Bedford, MA, EUA), onde foram colocadas lamínulas redondas (13 mm de diâmetro) antes da inoculação. O meio de crescimento em cada poço da microplaca continha 0,9 mL de meio essencial mínimo de Eagle (MEM, Invitrogen®) suplementado com 10% de soro de fetal bovino (Invitrogen®) e 1% de solução antibiótica (penicilina 100.000 U e estreptomicina 100 µg/mL, Sigma®). A monocamada HeLa cresceu durante a noite a 37 ° C com 5% de CO₂ para produzir pelo menos 70% de confluência. As lâminas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato esterilizada 0,05 M, pH 7,4 (PBS). Quarenta microlitros da cultura bacteriana durante a noite foram incubados em Luria Bertani Broth (LB, Difco®) a 37°C e adicionados a 0,96 mL de MEM contendo 2% de soro fetal bovino e 3% de D-manose (Sigma®). Após 3 h de incubação a 37°C com 5% de CO₂, as monocamadas foram lavadas com PBS esterilizada, e incubadas durante 3 h, a 37°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas cinco vezes com PBS, fixadas com metanol absoluto durante 10 min, e coradas com May-Grunwald (Sigma®) e Giemsa (Sigma®). As lâminas foram examinadas sob um microscópio de luz usando uma lente de imersão. Para determinar o padrão de adesão, foram utilizados critérios previamente descritos (Nataro *et al.*, 1987; Scaletzky *et al.*, 1999).

2.8 Teste de resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana foi determinada usando o método de disco-difusão em ágar, conforme recomendado pelo protocolo do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2016). Os seguintes agentes antimicrobianos foram utilizados para amostras de *E. coli*: amoxicilina-ácido clavulânico (AMC, 30 ug), aztreonam (ATM, 30 ug), tetraciclina (TET, 30 ug), cefotaxima (CTX, 30 ug), ceftazidima (FOX, 30 ug), ácido nalidíxico (NAL, 30 ug), gentamicina (GEN, 10 ug), cloranfenicol (CHL, 30 ug), ampicilina (AMP, 10 ug), ciprofloxacina (CIP, 5 ug) e estreptomicina (STR, 10 ug). A enrofloxacin (ENR, 5 ug) também foi testada, porque este antimicrobiano é comumente usado na prática veterinária, e a interpretação dos resultados para este antimicrobiano foi determinada usando também o protocolo do CLSI (2016). A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade. A produção de ESBL foi confirmada com testes de difusão de disco duplo para amoxicilina-ácido clavulânico e cefotaxima ou ceftazidima, ou utilizando um teste de

combinação de disco com cefotaxima, ácido cefotaxime-clavulânico (Becton Dickinson, Sparks, MD), ceftazidima e ácido ceftazidime-clavulânico (Becton Dickinson), de acordo com as recomendações do CLSI.

Os seguintes antimicrobianos foram testados para *S. aureus*: ampicilina (AMP, 10 ug), cefalotina (CFO, 30 ug), ciprofloxacina (CIP, 5 ug), eritromicina (ERI, 30 ug), sulfametoxazol-trimetoprim (SUT, 25 ug), Clindamicina (CLI, 10 ug), gentamicina (GEN, 10 ug), tetraciclina (TET, 30 mg), cloranfenicol (CHL, 30 ug), estreptomicina (STR, 30 ug), penicilina-G (PEN, 30 ug) e linezolid (LNZ, 10 ug). Cefoxitina (FOX, 30 ug) foi usada para definir *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Esses testes foram realizados de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2016). *S. aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 foram utilizados como controles.

3 Resultados

Um total de 147 amostras de queijos artesanais foram coletados neste estudo. De 29 queijos, foram isolados e identificados 39 colônias de *E. coli* (alguns queijos apresentaram mais de uma colônia), e 10 queijos apresentaram 25 colônias de *S. aureus*.

Um dos isolados de *E. coli* foi positivo para o gene *eaeA* (codifica a adesina intimina de EPEC) e negativo para *bpfA* e *efa1/ lifA* e, assim, foi classificado como EPEC atípica (**Tabela 2**). Dois outros isolados de *E. coli* foram positivos para genes de ExPEC.

O isolado aEPEC foi do sorogrupo O127 e do grupo filogenético A de Clermont, enquanto os isolados de ExPEC pertencem aos sorotipos O73: H12 (cepa EC-2) e O64474:H8 (cepa EC-9). Estas ExPEC pertencem aos grupos filogenéticos A e C, respectivamente.

A maioria das cepas de *E. coli* isolada pertencia aos grupos filogenéticos A (28,2%), C ou E (23,1%). Seis cepas (15,4%) de *E. coli* foram positivas para o grupo B1 e duas (5,1%) para B2 (**Tabela 2**). Os isolados de *E. coli* apresentaram um padrão de aderência agregativo (46,0%), aderência difusa (12,6%) e o restante não apresentou padrão de adesão (41,4%) (**Tabela 2 e Figura 1**).

Tabela 2. Características genótípicas e fenotípicas dos isolados de *Escherichia coli* de queijos artesanais desse estudo.

Isolados	Estado	Sorotipo	Genes de virulência	Resistência aos antimicrobianos	Aderência em células HeLa	Biofilme	Grupo filogenético de Clermont
EC-1	MG	O127:HNT	<i>eaeA</i>	TET	AA	-	A
EC-2	MG	O73:H12	<i>iroN</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i> , <i>iss</i>	-	AA	-	A
EC-3a	PR	-	-	-	AA	Moderado	A
EC-3b	PR	-	-	TET	AA	-	E
EC-4a	MG	-	-	-	AA	-	A
EC-4b	MG	-	-	-	DA	-	A
EC-4c	MG	-	-	-	NA	-	A
EC-5a	MG	-	-	-	NA	-	C
EC-5b	MG	-	-	-	NA	-	C
EC-5c	MG	-	-	-	NA	-	C
EC-6a	MG	-	-	TET, AMP	NA	Moderado	E
EC-6b	MG	-	-	TET	AA	-	E
EC-7a	MG	-	-	-	AA	-	Desconhecido
EC-7b	MG	-	-	-	NA	-	E
EC-8a	BA	-	-	TET, NAL	NA	-	E
EC-8b	BA	-	-	-	AA	-	E
EC-9	MG	O64474:H8	<i>iroN</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i> , <i>iss</i> , <i>iutA</i>	-	AA	-	C
EC-10	PR	-	-	-	NA	-	B1
EC-11	PR	-	-	-	NA	-	B1
EC-12	MG	-	-	-	DA	-	B1
EC-13	PR	-	-	FOX	AA	-	A
EC-14	MG	-	-	-	NA	-	A

EC-15	MG	-	-	FOX, AMP	AA	-	C
EC-16	MG	-	-	TET, AMP, NAL	NA	-	C
EC-17	SP	-	-	TET, FOX	AA	-	C
EC-18	PR	-	-	TET	NA	-	C
EC-19	MG	-	-	AMP, AMC	NA	-	Desconhecido
EC-20a	MG	-	-	TET, AMP	NA	-	B1
EC-20b	MG	-	-	TET, AMP	DA	-	B1
EC-21	MG	-	-	-	AA	-	E
EC-22	PR	-	-	-	DA	-	A
EC-23	SP	-	-	-	DA	-	A
EC-24	MG	-	-	-	AA	-	E
EC-25	MG	-	-	-	AA	Moderado	B2
EC-26a	MG	-	-	-	AA	-	C
EC-26b	MG	-	-	-	AA	-	B1
EC-27	MG	-	-	AMP	NA	Moderado	B2
EC-28	MG	-	-	-	NA	-	A
EC-29	MG	-	-	-	NA	-	E

Legenda: MG, Minas Gerais; PR, Paraná; BA, Bahia; SP, São Paulo; TET – tetraciclina; NAL – ácido nalidíxico; FOX – cefoxitina; AMP – ampicilina; AMC – amoxicilina e ácido clavulânico. AA, aderência agregativa; DA, aderência difusa. a,b,c: isolados do mesmo queijo artesanal. HNT – antígeno H (flagellar) não tipado. (-), negative.

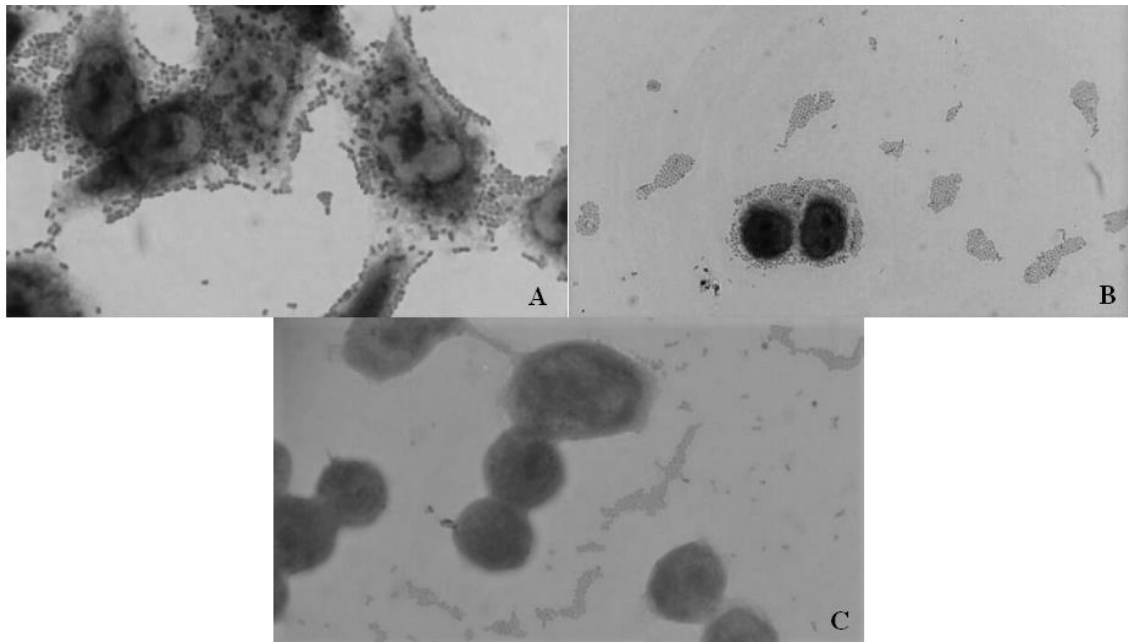


Figura 1: Aderência em células HeLa dos isolados de *E. coli* de queijos artesanais. (A) EAEC com aderência agregativa em células HeLa (Controle positivo *E. coli* K12, Hb101); (B) Isolado de *E. coli* com aderência agregativa (amostra EC-25); (C) aEPEC EC-01 (sorogrupo O127) com aderência agregativa em células HeLa. Magnificação de 1000x.

Com base na absorvência, quatro isolados de *E. coli* (10,3%) mostraram um biofilme moderado (**Tabela 2**). Os restantes isolados de *E. coli* não produziram biofilme. Três cepas de *S. aureus* apresentaram formação de biofilme (**Tabela 3**).

Tabela 3. Resistência bacteriana aos antimicrobianos e produção de biofilme de isolados de *Staphylococcus aureus* de queijos artesanais desse estudo.

Isolados	Estado	Resistência aos antimicrobianos	Biofilme
SC-1	MG	EST, FOX	Não formador
SC-2	MG	CIP, FOX	Não formador
SC-3	PR	CHL, FOX	Formador
SC-4a	MG	TET, FOX, CHL, AMP	Formador
SC-4b	MG	AMP, EST, FOX, PEN, CIP	Formador

Legenda: EST – estreptomicina; FOX – cefoxitina; CIP – ciprofloxacina; TET – tetraciclina; AMP – ampicilina; CHL – cloranfenicol; PEN – penicilina-G. a,b: isolados do mesmo queijo.

Para *E. coli*, o antimicrobiano com maior frequência de resistência foi a tetraciclina (25,6%), seguido de ampicilina (17,9%), cefoxitina (7,7%), ácido nalidíxico (5,1%) e ácido amoxicilina-clavulânico (2,6%) (**Tabela 2**). Não foi demonstrada nenhuma característica de produção de ESBL. Por outro lado, um isolado de *S. aureus* foi resistente a cinco antimicrobianos, e outro a quatro antimicrobianos (**Tabela 2**). Esses isolados resistentes aos múltiplos antimicrobianos também produziram biofilme.

4 Discussão

O queijo artesanal é comercializado em feiras livres e mercados municipais, e também é consumido por uma grande parte da população. Por outro lado, a inspeção é deficiente, o que torna o queijo um veículo potencial para doenças zoonóticas.

No presente estudo, as cepas de *E. coli* foram isoladas em cerca de 20% dos queijos artesanais, diferente de outros trabalhos reportados no Brasil, onde esta bactéria foi isolada em 60-70% das amostras de queijo (Carvalho *et al.*, 2007; Okura e Marin, 2014; Ribeiro *et al.*, 2016). No entanto, esses mesmos trabalhos não relataram a presença de DEC, e em nosso estudo isolamos uma cepa de EPEC atípica (aEPEC). Cepas de aEPEC estão associadas à diarreia em crianças (Croxen *et al.*, 2013), e já foi detectada em queijos frescos no Brasil (Araujo *et al.*, 2002). Um dos marcadores do potencial de virulência de aEPEC é o gene *efa1/lifA*, presente na ilha de patogenicidade OI-122 (Afset *et al.*, 2006), mas este gene é pouco pesquisado em isolados de queijos, e não foi encontrado na aEPEC EC-01.

No entanto, vários estudos reportam um aumento de EPEC atípicas em vez de EPEC típica isoladas e, atualmente, esse patótipo é considerado um importante patógeno diarreiogênico emergente, principalmente em crianças (Afset *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2017). O sorogrupo O127 está entre os 12 sorogrupos reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde como potencialmente patogênicos, sendo bastante isolado em vários estudos, incluindo queijos (Araújo *et al.*, 2002; Paneto *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2012). Nosso estudo mostra a presença do sorogrupo O127, reforçando que esse sorogrupo é importante em queijos, uma vez que ele é uma EPEC, e pode ser transmitida para humanos via alimentos e causar diarreia.

Além disso, o estudo de Levine *et al.* (1985) mostrou que uma cepa de O127: H6, mesmo sem plasmídeo EAF (EPEC atípica) apresentou virulência, e que outros fatores poderiam estar associados a patogenicidade dessa cepa. Algumas cepas do sorogrupo O127 podem expressar um potencial fator de virulência, como a produção da toxina enteroagregativa estável pelo calor (EAST1). As cepas de EPEC atípicas frequentemente

expressam EAST1 e outros fatores de virulência não codificados na região do *Loccus of Enterocyte Effacement* (LEE), como Afa e E-hly (Trabulsi et al., 2002). Esta EPEC EC-01 mostrou ter um padrão de adesão do tipo agregativo (típico de bactérias que expressam EAST1), e com a destruição de muitas células HeLa (citotoxicidade) no ensaio de adesão (Figura 1C), um indicativo da presença dessa toxina ou enzimas semelhantes.

Em nosso estudo, também encontramos sorotipos de ExPEC diferentes dos estudos de Okura e Marin (2014); Guzman-Hernandez *et al.* (2016) e Ribeiro *et al.* (2016). O sorotipo O64474:H8 encontrado apresenta todas as características bioquímicas de *E. coli*, incluindo lactose, motilidade e lisina positiva, além de ter uma capacidade de virulência definida e compartilhar o antígeno O com cepas de *Shigella boydii* 16 (Navarro et al., 2010).

Este sorogrupo foi isolado no Egito, Bangladesh e México, entre 1980 e 2007, e foi descrito por Navarro *et al.* (2010). No entanto, esse sorotipo era encontrado restritamente em cepas de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), mas nosso estudo mostrou que esse sorogrupo O64474 pode ser encontrado em outro grupo de *E. coli* patogênico, como ExPEC, uma vez que tem os genes de virulência do pentaplex de Jonhson. Este resultado é o primeiro relato de *E. coli* O64474 isolado no Brasil, e em queijos.

A ausência de STEC, um importante patógeno (particularmente o sorotipo O157:H7), no presente trabalho e em outros trabalhos no Brasil (Okura e Marin, 2014, Ribeiro *et al.*, 2016) não deve ser negligenciado ou subestimado. Acreditamos que a metodologia empregada na obtenção de colônias isoladas precisa ser melhorada, principalmente na questão de quantidade de colônias estudadas na amostragem, uma vez que essa dificuldade de encontrar STEC já foi constatada pelo nosso grupo de pesquisa em outros trabalhos (fezes de animais) Em outros países, como a Arábia Saudita, Egito, México e Itália, STEC foi isolada de queijo fresco e não pasteurizado (Altalhi; Hanssen, 2009; Guzman-Hernandez et al., 2016; Marozzi et al., 2016; Nobili at al., 2016; Ombarak et al., 2016).

As cepas de *E. coli* com genes de ExPEC também foram isoladas neste trabalho, conforme relatado anteriormente em trabalhos com queijo (Okura; Marin, 2014; Ribeiro *et al.*, 2016). Os isolados de ExPEc desse trabalho apresentaram um repertório de genes de virulência semelhante ao detectado em *E. coli* associado à meningite humana (Lemaître et al., 2013), destacando seu potencial patogênico.

A maioria dos isolados de *E. coli* neste trabalho pertencem ao grupo filogenético A de Clermont, incluindo a aEPEC e uma cepa de ExPEC. Um trabalho anterior também informou que o grupo A foi o filogrupo mais prevalente entre *E. coli*, incluindo ExPEC, em queijos feitos a partir de leite cru (Ribeiro *et al.*, 2016). Além do filogrupo A, este trabalho também

relatou uma alta frequência dos filogrupos C e E. Em contraste, além do filogrupo A, Ribeiro *et al.* (2016) também relataram uma alta frequência de isolados B1. As diferenças podem ter ocorrido porque os autores citados não testaram suas cepas para os filogrupos C e E, uma vez que esses filogrupos foram recentemente estabelecidos (Clermont *et al.*, 2013). Outra questão que não podemos ignorar, é a localidade dos queijos, que podem variar de acordo com cada região onde os queijos são produzidos.

A produção de biofilmes bacterianos também facilita a permanência de bactérias em superfícies distintas, incluindo as glândulas mamárias bovinas. Assim, é possível que o biofilme produzindo por isolados de *E. coli* e *S. aureus* pode ser um fator de persistência bacteriana em enfermidades bovinas, como a mastite subclínica.

A maioria dos isolados de *E. coli* deste trabalho apresentaram resistência a alguns antimicrobianos, de forma semelhante a trabalhos anteriores (Okura e Marin, 2014; Nagy *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2016). A resistência antimicrobiana pode estar associada à pressão seletiva devido ao uso de antimicrobianos em vacas leiteiras. Além disso, as bactérias resistentes poderiam ter sido selecionadas através da utilização de antimicrobianos na área veterinária, ou após a contaminação do leite ou produtos lácteos. De qualquer forma, o surgimento de bactérias resistentes tem sido motivo de preocupação, devido ao risco de disseminação entre os consumidores de queijos.

Todos esses resultados sugerem uma certa preocupação na qualidade microbiológica de queijos artesanais, pois apesar do grau de contaminação não ser alta, alguns isolados apresentaram características patogênicas importantes, que podem ser potencializadas nesses alimentos, e representar um risco para a saúde humana.

5 Conclusão

Em conclusão, os queijos artesanais, coletados nas diversas regiões do Brasil, apresentaram contaminação por *E. coli* e *S. aureus*. O novo sorotipo de *E. coli* O64474:H8 encontrado em nosso estudo demonstra que o queijo artesanal pode ser um importante veículo de transmissão de patógenos, como *E. coli* patogênica.

References

- Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53: 1137–1144.
- Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L, Bergh K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 3703–3711.
- Altalhi AD, Hassan SA. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. *Food Control.* 2009; 20: 913- 917.
- Amador P, Fernandes R, Prudêncio C, Brito L. Resistance to B-lactams in bacteria isolated from different types of Portuguese cheese. *International Journal of Molecular Sciences.* 2009; 10: 1538-1551.
- Ferreira MA, Bernardo LG, Neves LS, Campos MRH, Lamaro-Cardoso J, André MCP. Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. *Journal of Dairy Science.* 2016; 99: 8589-8597.
- Giaouris E, Chapot-Chartier MP, Briandet R. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *International journal of food microbiology.* 2009; 131: 2-9.
- Guzman-Hernandez R, Contreras-Rodriguez A, Hernandez-Velez R, Perez-Martinez I, Lopez-Merino A, Zaidi MB, Estrada-Garcia T. Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with Salmonella spp., non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. coli* strains: A public health risk. *International Journal of Food Microbiology.* 2016; 237: 10-16.
- Hernandes RT, Elias, WP, Vieira MAM, Gomes TAT. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett.* 2009; 297: 137–149.
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2001; 10: 486-493.
- Jamali, H., Paydar, M., Radmehr, B., Ismail, S., & Dadrasnia, A. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Food Control*, 54, 383-388.
- Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of clinical microbiology.* 2008; 46: 3987-3996.
- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. *BioMed. Res. Int.* 2014; ID 827965.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 123–140.
- Lemaître C, Mahjoub-Messai F, Dupont D, Caro V, Diancourt L, Bingen E, Bidet P, Bonacorsi S. A conserved virulence plasmidic region contributes to the virulence of the multiresistant *Escherichia coli* meningitis strain S286 belonging to phylogenetic group C. *PLoS One.* 2013; 8: 74-423.

- Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis.* 1985; 152: 550–9.
- Lima IFN, Boisen N, da Quetz Silva J, Havt A, de Carvalho EB, Soares AM, Lima AÂM. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case–control study among children from north-eastern Brazil. *Journal of medical microbiology.* 2013; 62- 683-693.
- Marozzi S, De Santis P, Lovari S, Condoleo R, Bilei S, Marcianò R, Mezher Z. Prevalence and molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk cheeses from Lazio region, Italy. *Italian Journal of Food Safety.* 2016; 5: 4566.
- Moraes PM, Viçosa GN, Yamazi AK, Ortolani MB, Nero LA. Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2009; 6: 245-249.
- Nagy B, Szmolka A, Smole Mozina S, Kovac J, Strauss A, Schlager S, Beutlich J, Appel B, Lusicky M, Aprikian P, Paszti J, Toth I, Kugler R, Wagner, M. Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and of multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin illegally imported to the EU by flight passengers. *Int J Food Microbiol* 2015; 209: 52–59.
- Narimatsu H, Ogata K, Makino Y, Ito K. Distribution of non-locus of enterocyte effacement pathogenic island-related genes in *Escherichia coli* carrying *eae* from patients with diarrhea and healthy individuals in Japan. *Journal of clinical microbiology.* 2010; 48: 4107-4114.
- Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1987; 6: 829–831.
- Nobili G, Franconieri I, Basanisi MG, La Bella G, Tozzoli R, Caprioli A, La Salandra G. Short communication: Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and mozzarella cheese in southern Italy. *Journal of Dairy Science.* 2016; 99: 7877-7880.
- Okura MH, Marin JM. Survey of Minas frescal cheese from Southwest Minas Gerais for virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates. *Ciência Rural (UFSCM. Impress).* 2014; 44- 1506-1511.
- Omarak RA, Hinenoya A, Awasthi SP, Iguchi A, Shima A, Elbagory ARM, Yamasaki S. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. *Int. J. Food Microbiol.* 2016; 221: 69–76.
- Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. *Meth. Microbiol.* 1984; 14: 43-112.
- Palmer J, Flint S, Brooks J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of industrial microbiology & biotechnology.* 2007; 34- 577-588.
- Paneto BR, Schocken-Iturrino RP, Macedo C, Santo E, Marin JM. Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 2007; 59- 508-512.

- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex pcr assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 598–602.
- Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Mylly V, Honkanen-Buzalski T, 2004. Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci* 87(8): 2433-2441.
- Puño-Sarmiento J, Gazal LE, Medeiros LP, Nishio EK, Kobayashi RK, Nakazato G. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from avian organic fertilizers. *International journal of environmental research and public health.* 2014; 11: 8924-8939.
- Rapini LS, Cerqueira MMOP, Carmo LS, Veras JF, Souza MR. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 2005; 57- 825-829.
- Ribeiro LF, Barbosa MMC, Pinto FDR, Maluta RP, Oliveira MC, de Souza V, Fairbrother JM. Antimicrobial Resistance and Virulence Factors of *Escherichia coli* in Cheese Made from Unpasteurized Milk in Three Cities in Brazil. *Foodborne pathogens and disease.* 2016; 13- 469-476.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th edition. New York: Cold Spring Harb Lab Press. 2001, 999 p.
- Scaletsky IC, Pedrosa MZ, Oliva CA, Carvalho RL, Morais MB, Fagundes-Neto U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 1999; 67: 3410–3415.
- Scheutz F, Cheasty T, Woodward D and Smith H R. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *APMIS* 2004; 112: 569–584.
- Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J, Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J ClinMicrobiol.*1995; 33: 701–705.
- Silva LC, Fonseca CR, Queiroz SRA, Alencar ALF, Godoy SHS, Munin FS, Fernandes AM. Ocorrência de *Escherichia Coli* Potencialmente Causadoras de Toxi-Infecções Alimentares em Queijos Coalho e Ricota Comercializados no Sudeste do Brasil. *Blucher Food Science Proceedings.* 2014; 1: 177-178.
- Silva ZN, da Cunha AS, Lins MC, Carneiro LDA, Almeida ACDF, Queiroz ML. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. *Revista de Saúde Pública.* 2001; 35: 375-379.
- Singh RS, Ranganathan B. Incidence and distribution of *Escherichia coli* in dairy products. *Indian J Dairy sci.* 1978; 31:1–10.
- Spanu V, Viridis S, Scarano C, Cossu F, De Santis EPL, Cosseddu AM. Antibiotic resistance assessment in *S. aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *Veterinary research communications.* 2010; 34; 87-90.

- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*. 2007; 115: 891-899.
- Szmulka A, Anjum MF, La Ragione RM, Kaszanyitzky EJ, Nagy B. Microarray based comparative genotyping of gentamicin resistant *Escherichia coli* strains from food animals and humans. *Vet. Microbiol*. 2012; 156: 110–118.
- Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases*. 2002; 8: 508.
- Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of applied microbiology*. 2010; 109: 1117-1131.
- Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, Reid-Smith RJ, Tellier PP, Tellis PA, Ziebell K, Manges AR. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerging Infectious Diseases*. 2010; 16: 88-95.
- Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, Nataro JP, Sarantuya J, Iwashita M, Manago K, Tokuda K, Yoshinaga M, Kawano Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**; 71: 687–690.

ARTIGO 2

Utilização de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) e a associação de méis de *Scaptotrigona bipunctata* e *Apis mellifera* no controle de microrganismos durante a maturação de queijos

Anna C. L. P. de Campos¹; Renata D. S. Nandi¹; Sara Scandorieiro¹; Victor H. Clébis¹; Erick K. Nishio¹; Guilherme F. Reis¹, Luciano A. Panágio¹; Eder P. Fagan²; Renata K. T. Kobayashi¹; Gerson Nakazato^{1*}

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

²Setor de Veterinária e Produção Animal, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Paraná, Brasil

Resumo

A presença de fungos e bactérias contaminantes em queijos maturados é uma das principais preocupações para as indústrias lácteas. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) (OEO), e da associação de méis de *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier 1836 (HSB) e *Apis mellifera* Latreille africanizada (HAM), contra bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e fungos filamentosos em queijos durante a maturação. Para isso queijos minas padrão foram produzidos e contaminados com *E. coli* e *S. aureus* isolados de queijos artesanais (ARTIGO 1), e fungos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., e maturados por 30 dias, seguindo os seguintes grupos de queijos: *Controle A* – Queijos produzidos sem adição de antimicrobianos e não contaminados; *Controle B* – Queijos produzidos com adição de OEO a 0,02% (v/v) ou 5% de Mel HSB + 25% de mel de HAM; *Controle C* – Queijos produzidos sem adição de antimicrobianos e contaminados por imersão em suspensões bacterianas e fúngicas; *Tratamento A* – Queijos produzidos com adição de 0,02% de OEO ou 5% de Mel HSB + 25% de mel de HAM (Clébis et al., 2017), contaminados por bactérias ou fungos; *Tratamentos B* – Queijos produzidos com adição de nisina a 12,5 mg/ Kg, contaminados por bactérias ou fungos e; *Tratamento C* – Queijos aspergidos com solução de natamicina a 5mg/ Kg, contaminados por bactérias ou fungos. O OEO a 0,02 % (v/v) demonstrou atividade antibacteriana e antifúngica, pois as populações de bactérias foram reduzidas à zero até o sexto dia de maturação, e também inibiu a germinação dos esporos fúngicos. A combinação de méis (HSB 5% e HAM 25%, v/v) também apresentou atividade antibacteriana, reduzindo a população de *E. coli* e *S. aureus* a zero após 15 e 6 dias, respectivamente, bem como a germinação dos fungos nos queijos. Ambos os antimicrobianos utilizados foram eficientes no controle de microrganismos potencialmente patogênicos durante a maturação do queijo.

Palavras-chave: Antimicrobianos naturais; maturação; contaminação microbiana, queijos.

1 Introdução

O queijo é um produto de alto valor nutritivo, maturado em umidade relativa do ar e temperatura controladas, que variam de 80 a 97% e 2 a 17°C, respectivamente (Brasil, 1996; Perry 2004; Callon *et al.*, 2011). Tais condições podem favorecer a contaminação por microrganismos indesejáveis (McLauchlin *et al.*, 2004; Sohier *et al.*, 2009).

A presença de fungos e bactérias em queijos maturados é uma das principais preocupações para as indústrias lácteas. Dentre os microrganismos contaminantes mais importantes, encontram-se *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*, responsáveis por doenças gastrointestinais e zoonóticas (Moro *et al.*, 2013; Allerberger and Wagner, 2010). Ainda, a contaminação por fungos, dentre eles, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.*, tem papel importante, pois também são responsáveis pela diminuição da vida útil e a aparência desagradável dos queijos, bem como pela produção de micotoxinas, que em altas concentrações ou por meio de bioacumulação podem levar a doenças graves na população. A presença de microrganismos contaminantes nos queijos diminui o valor comercial e produz até 5% das perdas que as indústrias de laticínios tentam resolver com o uso de substâncias químicas como a nisina, natamicina, liozima, sorbatos e nitratos de sódio e/ou potássio (Brasil, 1996; McLauchlin *et al.*, 2004; Sohier *et al.*, 2009; Jersek *et al.*, 2014; Resa *et al.*, 2014).

No entanto, o uso de antimicrobianos sintéticos está se tornando progressivamente limitado por regulamentos de segurança alimentar devido à toxicidade, efeito ambiental negativo, risco para a saúde, entre outros. Assim é crescente o interesse em novos produtos antimicrobianos que possam substituir os convencionais.

Estudos diversos vêm reportando as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais, especialmente do óleo essencial de orégano (OEO) (*Origanum vulgare* L.) (Gautam *et al.*, 2014; Gilling *et al.*, 2014; Sobral *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos desses óleos são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana, e no caso do OEO, o carvacrol e o timol são os componentes bioativos mais abundantes, podendo variar as concentrações devido a interferentes como região geográfica, solo e sazonalidade (Medini *et al.*, 2009). OEO possui amplo espectro de ação, pois atua contra diversos microrganismos, tais como, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus e fungos. Inibe a germinação e o crescimento micelial dos fungos e em bactérias interagem com a membrana celular, ocasionando aumento da permeabilidade da célula, interferência na síntese de ATP e de proteínas, distúrbio no pH bacteriano e inibição de *quorum sensing* nas bactérias (Preuss *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2010; Szabó *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2013).

Reportam ainda a incorporação do óleo essencial de orégano em alimentos, para prevenir a contaminação microbiana durante a fabricação e maturação, sendo utilizados em embutidos como salames, queijos, cortes cárneos, frutas, além da aplicação em superfícies (bancadas), filmes e embalagens alimentares (Buzatta *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2009; Botrel *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2014; Zantar *et al.*, 2014; Elshafie *et al.*, 2015; dos Santos Rodrigues *et al.*, 2017).

Assim como os óleos essenciais, os méis também possuem propriedades antimicrobianas, além de anti-inflamatórias, expectorante, entre outras (Wiese, 1986; Israili, 2014). A ação antimicrobiana dos méis é devido a vários fatores, dentre eles, a presença de peróxido de hidrogênio, alta concentração de açúcar e baixo pH, prejudicando o crescimento bacteriano (Olaitan; Adeleke; Ola, 2007; Mavric *et al.*, 2008). O efeito de alguns méis, especialmente os provenientes de favas escuras e que contêm altas concentrações de própolis, como é o caso das abelhas indígenas e monoflorais, pode ser devido à presença de um número de ácidos aromáticos e terpenóides (popularmente conhecidos como própolis). Além disso, pode haver proteínas no mel que tenham tal atividade (Boukraâ *et al.*, 2008; Khosravi *et al.*, 2008; El-Gendy, 2010; Candiracci *et al.*, 2012; Moussa *et al.*, 2012). Assim, méis de abelhas indígenas sem ferrão como *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier 1836 e *S. postica* Latreille, 1807 apresentaram maior efeito antibacteriano do que o mel da abelha *Apis mellifera*, no entanto os méis de abelhas indígenas possuem um valor comercial mais elevado (Alves *et al.*, 2005; Nishio *et al.*, 2016).

Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) e da associação de méis de *S. bipunctata* Lepeletier 1836 e *Apis mellifera* Latreille africanizada e verificar a atividade antimicrobiana no controle de microrganismos contaminantes de queijos durante a maturação.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção dos compostos antimicrobianos

O óleo essencial de orégano (OEO) utilizado foi obtido da Ferquima Indústria e Comércio de Óleos Essenciais (São Paulo, Brasil). Este óleo (lote 227) foi extraído por destilação a vapor e sua densidade (0,954 g / mL) e composição (componentes principais: 71% de carvacrol, 3% de timol, 4,5% de gama de terpineno, 3,5% de para-cimeno e 4% de betacarofileno) foram descritos em um relatório técnico.

Os méis foram coletados no período de 2015 a 2016, de ninhos dos melipolinários de abelhas *S. bipunctata* Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) (HSB) e de *A.*

mellifera Latreille africanizada (Hymenoptera: Apidae) (HAM), na Universidade Estadual de Londrina (Londrina- PR, Brasil) e na Fazenda Monte Sinai, (Mauá da Serra- PR, Brasil). Os méis foram coletados com seringas de vidro e espátulas de metal e, em seguida, foram depositados em frascos esterilizados para o armazenamento e transporte. Previamente aos experimentos, foram preparadas soluções estoque de cada mel pela diluição deles em água deionizada estéril na proporção de 1:1 (v/v), que em seguida foram filtradas em filtro com microporos de 0,22 µm (Millipore®).

Nisina e natamicina foram cedidas pela empresa Granolab/Granotec Nutrição e Tecnologia (Curitiba, Paraná, Brasil). As diluições seguiram as recomendações do fabricante em acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de queijos (RTIQ) (BRASIL, 1996).

2.2 Microrganismos utilizados na contaminação dos queijos

Foram utilizadas as cepas bacterianas, *E. coli* EPEC EC01 e *S. aureus* SC05 (ARTIGO 1) isoladas de queijos minas padrão comercializados no Brasil, da coleção do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, além dos gêneros de fungos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., da coleção do Laboratório de Micologia e Métodos Alternativos ao Uso de Animais. Ambos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

2.3 Microrganismos utilizados na produção dos queijos

Os queijos foram produzidos utilizando a cultura lática mesofílica tipo O (R704), composta por *Lactococcus lactis lactis* e *Lactococcus lactis cremoris*, cedidas pela Christian Hansen S/A (Valinhos, São Paulo, Brasil) e adicionadas na proporção de 0,6% (p/v), conforme indicado por Campos (2013).

2.4 Concentração inibitória mínima (CIM) de OEO e dos méis frente à cultura lática

A concentração inibitória mínima (CIM) do OEO e dos méis foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo proposta pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards (Clinical and Laboratory Standards Institute)* (CLSI, 2016), com modificações. A cultura R704 foi crescida em leite UHT desnatado por 3 horas. Posteriormente, o leite foi semeado em ágar MRS (Difco®) e incubado por 18-24 h a 37°C. Após isso, colônias foram retiradas, colocadas em salina 0,85% m/v e comparadas com a escala 0,5 de MacFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/ mL. Foram diluídos 10 µL em 990 µL de MRS (Difco®), para chegar a uma concentração de 10^5 UFC/mL, para então iniciar o teste que foi realizado

utilizando o MRS (Difco®). Para o OEO, o teste foi realizado em microtubos de 200 µL (Ependorf®) e microplacas de 96 poços (Corning®) para os méis. Diferentes concentrações dos compostos (0,015% a 5%) foram utilizadas, para determinar a CIM frente às culturas lácticas R704 utilizada na fabricação dos queijos.

2.5 Interação entre méis na atividade antibacteriana (*Checkerboard*) frente à cultura láctica

O grau interação entre os méis na atividade antibacteriana foi determinado pelo ensaio de microdiluição em placas de 96 poços, com dois gradientes de diluição (um para cada mel) em meio MH, conforme o protocolo de Kelly e Masten (1976). As diluições ente os dois méis variaram entre 0,2% e 25%, e os testes foram realizados em triplicata para a cultura láctica de acordo com a metodologia anterior.

2.6 Preparo dos queijos

Os queijos minas padrão foram fabricados com leite oriundo de vacas sadias, raça mista de Jersey e Holandesa PB, provenientes da Fazenda Escola da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, Paraná, de acordo com o protocolo descrito por Campos (2013), com modificações, seguindo o fluxograma da **Figura 1**, obedecendo aos padrões de matéria prima e de fabricação regidos pela Instrução Normativa nº 62 de 2011, RDC nº 12 de 2001 e o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos descrito pela Portaria nº 146 (BRASIL, 1996; ANVISA, 2001; BRASIL, 2011) Os antimicrobianos foram adicionados na etapa anterior a adição do coalho, enquanto que a imersão em suspensão microbiana foi realizada após a secagem de 24 h.

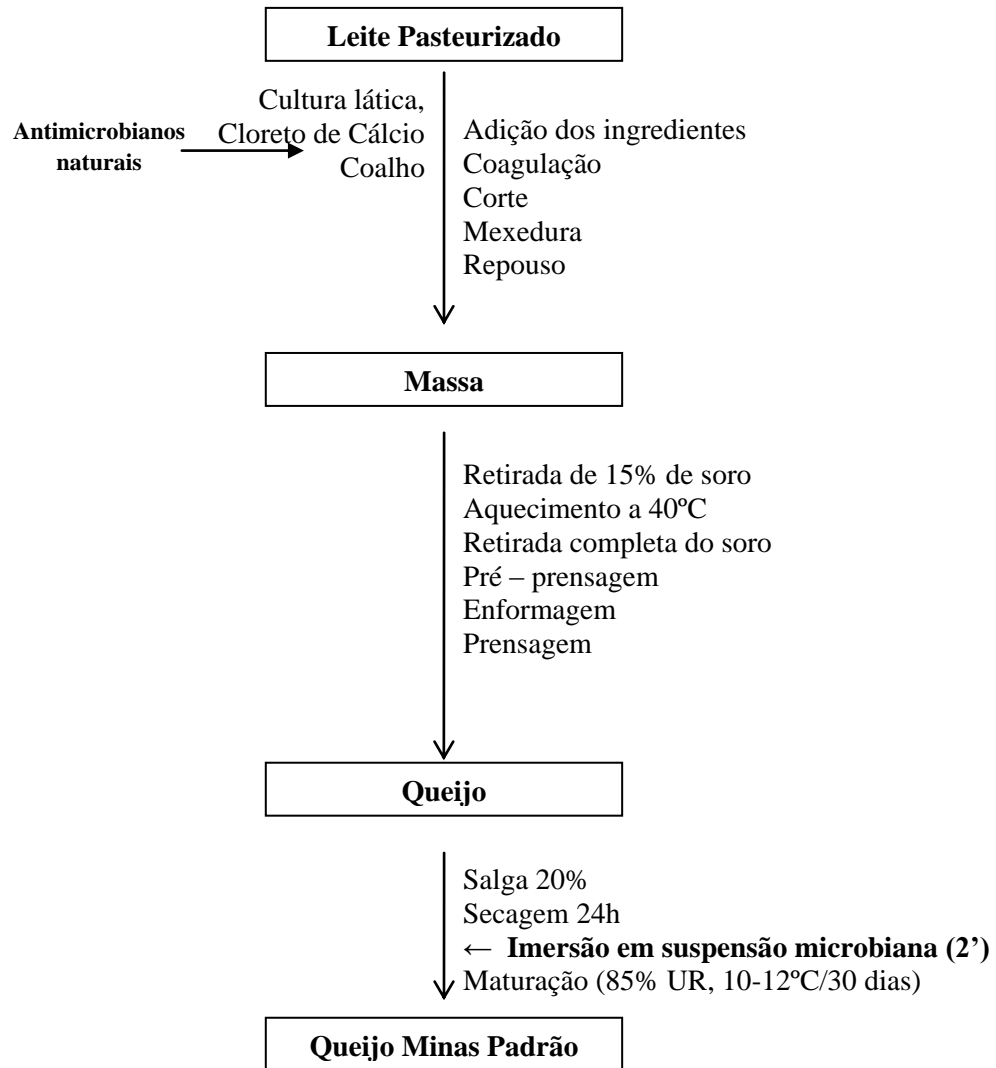


Figura 1: Fluxograma da produção de queijo minas padrão. Anterior à adição do coalho, foi adicionado o antimicrobiano natural e, após a secagem, os queijos foram imersos em suspensão microbiana e levados à maturação, por 30 dias.

2.6.1 Tratamentos experimentais e controles

O experimento compreendeu três tratamentos e três controles: *Controles A* – Queijos produzidos sem adição de antimicrobianos e não contaminados; *Controle B* – Queijos produzidos com adição de OEO a 0,02% (v/v) ou 5% de Mel HSB + 25% de mel de HAM (Clébis *et al.*, 2017); *Controle C* – Queijos produzidos sem adição de antimicrobianos e contaminados por imersão em suspensões bacterianas e fúngicas; *Tratamento A* – Queijos produzidos com adição de 0,02% de OEO ou 5% de Mel HSB + 25% de mel de HAM (Clébis *et al.*, 2017), contaminados por bactérias ou fungos; *Tratamentos B* – Queijos produzidos com adição de nisina a 12,5 mg/ Kg, contaminados por bactérias ou fungos e; *Tratamento C* –

Queijos aspergidos com solução de natamicina a 5mg/Kg, contaminados por bactérias ou fungos.

A adição da nisina para o tratamento B ocorreu posteriormente à adição do antimicrobiano natural e antes da coagulação. Para o tratamento C, os queijos foram aspergidos com natamicina logo após a imersão em solução microbiana. As amostras experimentais de queijo foram mantidas em laboratório durante 30 dias, em temperatura de 10 a 12°C e 85% de umidade relativa do ar, e nos dias 0, 1, 3, 6, 15 e 30 os parâmetros microbiológicos (UFC/ g) foram monitorados.

2.7 Preparo das suspensões bacterianas e fúngicas para contaminação dos queijos

E. coli e *S. aureus* foram cultivados em 5 mL de caldo BHI, a 37°C por 18-24 h, sob agitação. A cultura foi semeada em ágar Müller-Hinton (Difco®) e novamente incubada a 37°C por 18-24 h. Em seguida, colônias bacterianas foram transferidas da placa de Petri para frasco Erlenmeyer contendo 300 mL Salina Tamponada Fosfatada (PBS) pH 7,4, até esta atingir a turbidez equivalente à escala 0.5 de MacFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Os fungos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram cultivados em tubos contendo ágar Sabouraud (Oxoid®) a 28°C por 7-10 dias e, posteriormente, lavados com Salina Peptonada Tamponada (PBS) pH 7.4. A contagem de esporos foi realizada em câmaras *de Newbauer*, utilizando microscópio óptico Olympus®, em aumento de 40x, para que 10^8 esporos/mL fossem inoculados nos queijos.

Os meios foram transferidos para bolsas Nasco® estéreis para posterior submersão dos queijos.

2.8 Inoculação microbiana dos queijos

A contaminação dos queijos pelos microrganismos foi realizada por meio de imersão dos mesmos em suspensão contendo, aproximadamente, 10^8 UFC/mL de células, por 2 min. Após esse período, os queijos foram retirados da bolsa contendo a suspensão microbiana e levados à câmara de maturação.

2.9 Contagem de microrganismos

Em diferentes tempos (0 (1 hora após), 3, 6, 15 e 30 dias), após a contaminação e início da maturação, os queijos foram retirados para análise microbiológica. Uma alíquota de 25 g de cada queijo foi transferida para um frasco contendo 225 mL de Salina Peptonada

Tamponada (PBS) pH 7,4 (Brasil, 2003). Essa amostra de queijo (25 g) foi submetida à agitação stomacher (ITR), a 240 BPM (batimentos por minuto), por 10 minutos, posteriormente foi realizada diluição seriada (Brasil, 2006) e plaqueamento de 100 µL de cada diluição e da amostra pura em Petrifilm EC® e Petrifilm Staph Express®. Os resultados foram expressos em UFC/g de queijo.

Para os queijos contaminados com fungos, analisou-se uma área de aproximadamente 4 cm² de cada queijo, com auxílio de haste flexível com extremidades de algodão (“swabs”). Para verificar a viabilidade dos esporos, as amostras foram inoculadas em Agar Sabouraud (Oxoid®), incubadas a 28°C por sete dias e os resultados expresso em positivo (+) ou negativo (-) para germinação dos esporos.

2.10 Análise estatística

Os dados apresentados representam valores médios de três experimentos replicados que foram analisados por ANOVA unidirecional, e as diferenças entre os tratamentos foram determinadas pelo teste Qui-quadrado ($\alpha = 5\%$), utilizando o programa estatístico BioEstat versão 5.3.

3. Resultados e discussão

Os valores de CIM do OEO e dos méis HSP e HAM frente à cultura láctica utilizada na fabricação dos queijos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) de óleo essencial de orégano e méis contra a cultura láctica R704 utilizada no experimento.

Antimicrobianos	R704
OEO	0,15 %
HSB	5 %
HAM	ND
HSB/ HAM	0,8% / 12,5%*

OEO – Óleo essencial de orégano; HSP – Mel de *Scaptotrugona bipunctata*; HAM – Mel de *Apis mellifera*. ND – não determinado (valor acima de 5 % de CIM). R704 - *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *lactis*. *Valores obtidos pelo método de *Checkerboard*. O valor de CIM é fornecido em % (v/v).

A cultura de bactérias lácticas (BAL) apresentou valores de CIM para OEO de 0,15 % (v/v) e para o mel HSB de 5% (v/v), enquanto que para a interação dos méis HSB e HAM, o valor de CIM foi de 0,8% (v/v) e 12,5% (v/v), respectivamente.

O OEO mostrou maior atividade antibacteriana do que ambos os méis, apresentando menor CIM em comparação aos méis HSB e HAM, separados ou combinados (**Tabela 1**). A CIM do OEO foi cerca de 16 vezes maior do que a CIM de HAM e quase 100 vezes quando HAM combinado a HSB e, não foi verificada inibição das BAL nas concentrações de HAM separadamente testadas.

Quando testados os antimicrobianos naturais frente a *E. coli* EPEC EC-01 e *S. aureus* SC-05 isoladas de queijos “in vitro”, foi possível observar que a CIM para o OEO frente a *E. coli* foi de 0,06% (v/v) e 5% (v/v) para HSB, enquanto que a CIM encontrada para *S. aureus* foi de 0,31% para OEO e 2,5% para HSB, valores esses abaixo (para *E. coli*) e semelhante (para *S. aureus*) dos encontrados para a cultura láctica utilizada na produção dos queijos. Entretanto, quando os ensaios foram realizados nos queijos, foram necessários apenas 0,02% (v/v) de OEO, valor abaixo das CIM para microrganismos contaminantes e cultura láctica, e 5% de HSB + 25% de HAM (valor igual à CIM da BAL) para inibir o crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e fungos.

A concentração utilizada de 0,02 % de OEO, portanto, não afeta a cultura R704 e, conseqüentemente, não interfere nas características do queijo dependentes dessas bactérias lácticas; mas é capaz de inibir o crescimento de bactérias contaminantes (*E. coli* e *S. aureus*) porque há outros fatores inerentes ao queijo que interferem no crescimento desses microrganismos, porém não são suficientes durante o período de maturação, tais como a acidez elevada pela fermentação da lactose, a ação do sal sobre a atividade de água e a temperatura que não é ótima para esses microrganismos (Forsythe, 2013).

Já a combinação de méis HSB (5%, v/v) e HAM (25%, v/v) utilizada, também foi suficiente para inibir o crescimento dos microrganismos contaminantes no queijo, entretanto, observamos que essa combinação (HSB/ HAM) nas concentrações utilizadas inibe o crescimento da cultura R704 (“in vitro”) quando está a uma concentração de 10^5 UFC/ mL. No entanto, estudos relacionados à contagem de BAL em queijos brasileiros indicam que a quantidade de UFC/ g é, em média, 3 log acima da utilizada no teste “in vitro” (Buriti *et al.*, 2004; Lacerda *et al.*, 2005; Paiva *et al.*, 2015), podendo inferir que a atividade da combinação de méis quando aplicada no queijo pode não interferir ou ter menor ação frente as bactérias lácticas.

Um estudo desenvolvido por Souza *et al.* (2014) demonstrou a capacidade inibitória do OEO, frente a *S. aureus* de 0,25% (v/v), enquanto que para a cultura láctica utilizada, composta por *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, a concentração de OEO necessária para inibir seu desenvolvimento foi menor, 0,06% (v/v). Concentrações essas que

divergem das encontradas em nosso estudo, mostrando que para a inibição do crescimento da cultura láctica são necessárias concentrações maiores do composto, que as utilizadas nesse estudo (**Figuras 2A e 2B**).

Gann (2013) verificou a capacidade inibitória de diferentes compostos presentes em óleos essenciais contra diferentes espécies de LAB, dentre elas *Leuconostoc mesenteroides*, concluindo que os constituintes presentes no OEO, carvacrol e timol, apresentaram a maior capacidade inibitória em comparação a todos os compostos testados. Tanto o carvacrol quanto o timol foram capazes de inibir *Ln. mesenteroides* numa concentração de 0,05 % (v/v), que é um valor próximo do encontrado em nossos estudos para a atividade do OEO (0,15%, **Tabela 1**).

Dentre os estudos envolvendo antimicrobianos naturais e BAL, não foram observados resultados de CIM para compararmos com os resultados obtidos nesse estudo, mostrando que a utilização do mel como antimicrobiano em alimentos ainda é escassa. Entretanto, Rotar *et al.* (2015) utilizou uma combinação de mel e bagas de goji berry na produção de iogurtes e, observaram que o iogurte adicionado apenas de 7% do fruto goji berry permaneceu com o nível de BAL probiótica (entre $10^6 - 10^7$ UFC/ mL), enquanto que quando adicionado em iogurte com mel, a concentração de BAL diminuiu durante o armazenamento, inferindo que o mel possui ação contra bactérias ácido lácticas.

Estudos anteriores mostraram a atividade antibacteriana do OEO, de mel e da associação com outros compostos, frente às cepas de *E. coli* e *S. aureus* isoladas de queijos (Andualen, 2013; Souza *et al.*, 2014). Os valores relatados de CIM do OEO, do mel HSB e HAM estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2: Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) do OEO, HSB e HAM frente os microrganismos isolados de queijos *E. coli* EC-01 e *S. aureus* SC-05.

Antimicrobianos	<i>E. coli</i> EC-01	<i>S. aureus</i> SC-05
OEO	0,06 %	0,31 %
HSB	5 %	2,5 %
HAM	ND	ND

OEO – Óleo essencial de orégano; HSB – Mel de *Scaptotrugona bipunctata*; HAM – Mel de *Apis mellifera*. ND – não determinado (valor acima de 5 % de CIM). R704 - *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *lactis*. Valores obtidos pelo método de checkerboard. O valor de CIM é fornecido em % (v/v).

Comparando nossos resultados com dados da literatura, verificamos que os valores de CIM do OEO contra bactérias contaminantes (*E. coli* e *S. aureus*) e contra bactérias lácticas são próximos. No entanto, nosso estudo mostrou que a CIM deste óleo contra R704 (0,15 %, v/v) é intermediária a CIM relatada na **Tabela 2** para *E. coli* e para *S. aureus*.

Ao estudar o mel como antimicrobiano, Nishio *et al.* (2016) verificaram a capacidade inibitória de dois tipos de méis, produzidos respectivamente por *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836) e *S. postica* (Latreille, 1807) contra cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Os valores da concentração capaz de inibir *S. aureus* foram de 0,62-1,25 % para o mel produzido por *S. bipunctata* e 1,25-2,5 % para o mel produzido por *S. postica*, mostrando que para inibir a bactéria foi necessário uma CIM menor do que a necessária para inibir o *S. aureus* isolado de queijo (2,5 %, v/v) e do que a necessária para inibir a cultura láctica R704 (5 %, v/v), indicando que a utilizando no mel HSB pode ser utilizado na produção de queijos para inibir patógenos sem atingir as bactérias lácticas.

Wasihun e Kasa (2016) avaliaram a capacidade inibitória e bactericida de seis tipos de méis obtidos em três distritos diferentes da Etiópia contra diversas bactérias patogênicas, dentre elas, *E. coli* e *S. aureus*. Com relação a *E. coli*, os méis foram capazes de inibir seu crescimento numa concentração entre 25-12,5 % (v/v). Para *S. aureus* a concentração de inibição foi de 12,5-6,25 % (v/v). A capacidade bactericida dos méis foi em 50 % para *E. coli* e entre 50-25 % para *S. aureus*, demonstrando que os méis utilizados em nosso estudo apresentam maior CIM, pois necessitam de, apenas, 2,5 a 5% (v/v) para inibir o crescimento dessas mesmas bactérias.

Quando utilizada a combinação de HSB/ HAM (2,5 % + 12,5%, v/v) na fabricação dos queijos, não houve diminuição de log nas contagens de *E. coli* e *S. aureus* até o trigésimo dia, ao passo que quando as concentrações utilizadas foram (HSB 5 %, v/v + HAM 25%, v/v), inibiram o crescimento dos patógenos no queijo. Já a fabricação do queijo com a utilização de 0,02 % (v/v) de OEO foi o suficiente para inibir o crescimento desses microrganismos e de fungos até o sexto dia de maturação.

A redução na contagem bacteriana de *E. coli* e *S. aureus* utilizando OEO a 0,02% (v/v) encontram-se descritas nas **Figuras 2A e 2B**.

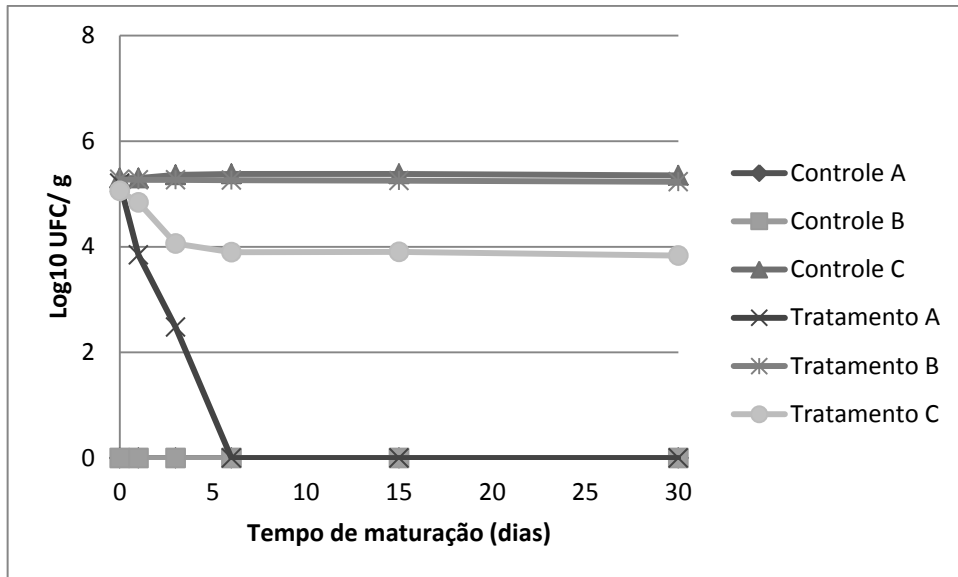


Figura 2A: Curva de crescimento e morte de *Escherichia coli* EPEC EC01 presente em queijos contaminados não tratados com antimicrobianos e queijos contaminados que receberam tratamento com OEO, nisina e natamicina. Controle A: queijo não contaminado com *E. coli* e não tratado, Controle B: queijo não contaminado com *E. coli* e tratado com OEO a 0,02%, Controle C: queijo contaminado com *E. coli* e não tratado com OEO. Tratamento A: queijo contaminado com *E. coli* e tratado com OEO a 0,02%, Tratamento B: queijo contaminado com *E. coli* e tratado com nisina (12,5 mg/ kg), Tratamento C: queijo contaminado com *E. coli* e tratado com natamicina (5 mg/ kg).

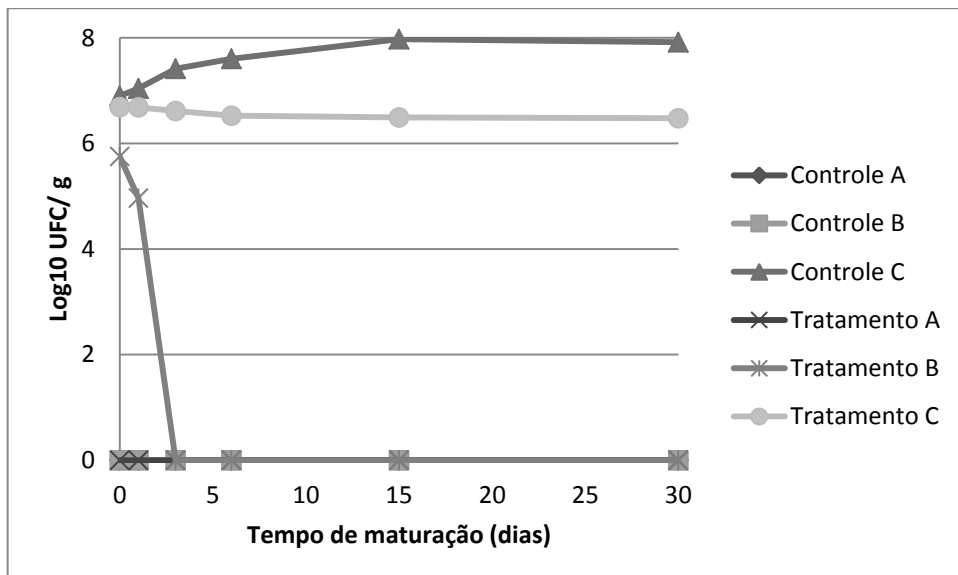


Figura 2B: Curva de crescimento e morte de *Staphylococcus aureus* SC05 presente em queijos contaminados não tratados com antimicrobianos e queijos contaminados que receberam tratamento com OEO, nisina e natamicina. Controle A: queijo não contaminado com *S. aureus* e não tratado, Controle B: queijo não contaminado com *S. aureus* e tratado com OEO a 0,02%, Controle C: queijo contaminado com *S. aureus* e não tratado com OEO. Tratamento A: queijo contaminado com *S. aureus* e tratado com OEO a 0,02%, Tratamento B: queijo contaminado com *S. aureus* e tratado com nisina (12,5 mg/ kg), Tratamento C: queijo contaminado com *S. aureus* e tratado com natamicina (5 mg/ kg).

OEO a 0,02% (v/v) apresentou amplo espectro de ação sobre os contaminantes dos queijos analisados, inibindo o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* ao longo dos 30 dias de maturação desse produto lácteo. Essa concentração do óleo essencial inibiu o crescimento de *S. aureus*, reduzindo 7 log (10^7 UFC/ mL) da população bacteriana na primeira hora de maturação (**Figura 2B**). O tratamento com 0,02% de OEO inibiu o crescimento bacteriano de 10^5 UFC/ mL para *E. coli*, eliminando todas as células viáveis (5 log) após 3 dias de maturação (**Figura 2A**). Rosato *et al.* (2010) e Scandorieiro *et al.* (2016) também concluíram que este óleo essencial possui ação frente a microrganismos, tanto Gram-positivos quanto Gram-negativos; inclusive bactérias multirresistentes. Nosso estudo mostra que o contaminante Gram-positivo é mais sensível à ação do OEO do que o contaminante Gram negativo, corroborando com resultados de Lambert *et al.* (2001) e Stojković *et al.* (2013), pois a mesma concentração do OEO apresentou tempos de ação antibacteriana diferentes para ambos tipos celulares.

A diferença de estrutura de parede celular encontrada entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pode justificar os diferentes perfis de atividade antibacteriana do OEO contra esses dois agentes contaminantes. A parede celular de bactérias Gram-positivas pode ser mais susceptível à ação do OEO, por ser estruturalmente mais simples, contendo apenas uma camada (peptideoglicana). A parede das bactérias Gram-negativas também é composta por peptideoglicana, no entanto, possuem uma camada adicional contendo LPS e porinas. As porinas são canais transmembranares hidrofílicos, e estes, juntamente com demais porções da membrana externa, servem como uma barreira que limita a entrada de macromoléculas e compostos hidrofóbicos na célula microbiana como, por exemplo, os óleos essenciais e, por esta razão, as bactérias Gram-negativas são relativamente tolerantes aos antibióticos hidrofóbicos, como o OEO (Nikaido, 1996).

Há estudos que mostram que bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam a mesma sensibilidade ao OEO, pois o tempo de ação e a CIM deste composto são semelhantes para os dois tipos bacterianos (Millezi *et al.*, 2014; Scandorieiro *et al.*, 2016). Tais diferenças, encontradas entre estudos distintos, de ação do OEO frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos ainda podem ser devido às variações na composição do óleo essencial, diferenças na concentração de compostos fenólicos (como carvacrol e timol, no caso do OEO) podem influenciar a ação antimicrobiana do composto (Medini *et al.*, 2009; Gann, 2013). Os bioativos hidrofóbicos dos óleos essenciais interagem com a membrana celular dos microrganismos, alterando a permeabilidade da célula e ocasionando a perda de íons e constituintes citoplasmáticos, afetando a produção de ATP e a homeostase do pH do citosol,

danificando proteínas de membrana, além de afetar a estrutura da parede celular, e interferir no *quorum sensing* (Ultee *et al.*, 1999; Lambert *et al.*, 2001; Medini *et al.*, 2009; Szabó *et al.*, 2010; Hyldgaard *et al.*, 2012).

A utilização de OEO 0,02% na formulação do queijo minas padrão também foi capaz de inibir a germinação dos esporos, até os 15 dias de maturação, de *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp., enquanto que para *Fusarium* sp., os esporos não germinaram dentro dos 30 dias de maturação do queijo. Para todos os gêneros, na primeira hora o OEO não foi capaz de inibir a germinação, porém o tratamento do queijo com OEO a 0,02% foi capaz de inibir a germinação dos esporos durante o período de maturação (**Tabela 3**). Carvacrol e timol foram relatados como tendo um caráter lipofílico, atuando na parede celular e interferindo em enzimas catalíticas de membranas e enzimas responsáveis pela produção de energia e proteínas, causando como resultado a morte celular. Além disso, a presença do anel aromático e do grupo hidroxila nesses compostos é importante, pois esses causam alterações na morfologia e agregados das hifas, resultando em diâmetros reduzidos e lises da parede, uma vez que interagem com a membrana celular dos agentes patogênicos microbianos (Elshafie *et al.*, 2015).

O tratamento com natamicina também foi eficiente contra os fungos; enquanto que queijos tratados somente com nisina, apresentaram germinação dos esporos durante todo o período de maturação, mostrando que a nisina não tem efeito sobre os fungos testados (Tabela 2).

Tabela 3: Germinação de esporos dos fungos durante o período de maturação, para os queijos tratados com OEO 0,02%, Nisina e Natamicina.

Fungo	Tratamento	Tempo em dias					
		0	1	3	6	15	30
<i>Aspergillus</i> sp.	OEO (0,02%)	+	-	-	-	-	+
	Nisina (12,5mg/ Kg)	+	+	+	+	+	+
	Natamicina(1ng/ dm ²)	+	-	-	-	-	+
<i>Fusarium</i> sp.	OEO (0,02%)	+	-	-	-	-	-
	Nisina (12,5mg/ Kg)	+	+	+	+	+	+
	Natamicina(1ng/ dm ²)	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	OEO (0,02%)	+	-	-	-	-	+
	Nisina (12,5mg/ Kg)	+	+	+	+	+	+
	Natamicina(1ng/ dm ²)	+	-	-	-	-	+

(+) – presença de germinação de esporos; (-) – ausência de germinação de esporos.

Diversos autores consideram que o OEO pode representar uma alternativa para tratamentos de candidíase, otites, dermatites e, principalmente, como conservantes de

alimentos, visto que poucas concentrações podem reduzir a contaminação por fungos e bactérias (Busatta *et al.*, 2007; Cleff *et al.*, 2010; Giordani *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014). Nesse caso, o OEO incorporado à massa do queijo como conservante, com a finalidade de controlar a contaminação por fungos e bactérias durante a maturação, mostrou-se eficiente do ponto de vista microbiológico.

Os resultados para os queijos tratados com a associação dos méis HSB e HAM (5%+25%, v/v) estão descritos nas **Figuras 3A e 3B**, para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

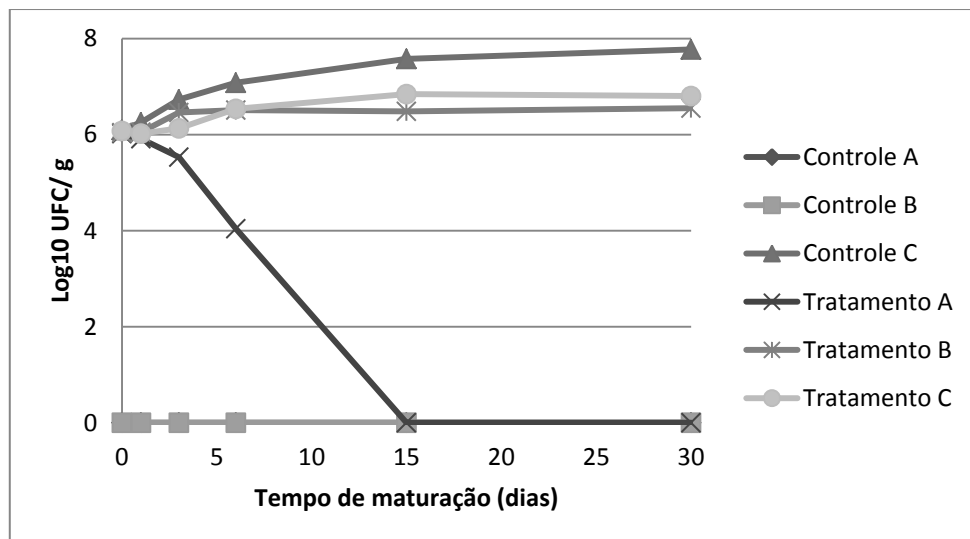


Figura 3A: Curva de crescimento e morte de *Escherichia coli* EPEC EC01 presente em queijos contaminados não tratados com antimicrobianos e queijos contaminados que receberam tratamento com a associação de méis, nisina e natamicina. Controle A: queijo não contaminado com *E. coli* e não tratado, Controle B: queijo não contaminado com *E. coli* e tratado com a combinação de HSB e HAM (5% + 25%, v/v), Controle C: queijo contaminado com *E. coli* e não tratado com a combinação de HSB e HAM (5% + 25%, v/v). Tratamento A: queijo contaminado com *E. coli* e tratado com a combinação de HSB e HAM (5% + 25%, v/v), Tratamento B: queijo contaminado com *E. coli* e tratado com nisina (12,5 mg/ kg), Tratamento C: queijo contaminado com *E. coli* e tratado com natamicina (5 mg/ kg).

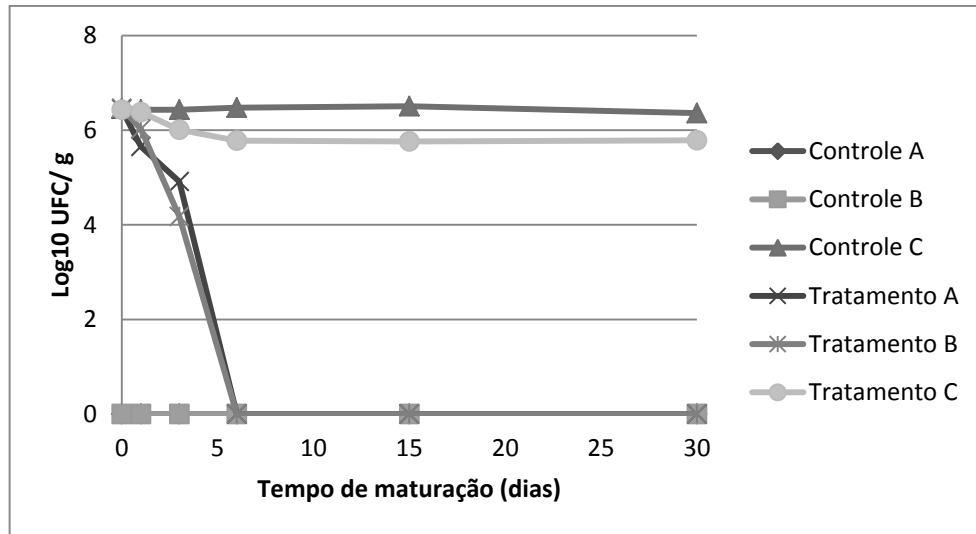


Figura 3B: Curva de crescimento e morte de *Staphylococcus aureus* SC05 presente em queijos contaminados não tratados com antimicrobianos e queijos contaminados que receberam tratamento com a combinação de HSB e HAM (5% + 25%, v/v), nisina e natamicina. Controle A: queijo não contaminado com *S. aureus* e não tratado, Controle B: queijo não contaminado com *S. aureus* e tratado com a combinação de HSB e HAM (5% + 25%, v/v), Controle C: queijo contaminado com *S. aureus* e não tratado com OEO. Tratamento A: queijo contaminado com *S. aureus* e tratado com a combinação de HSB e HAM (5% + 25%, v/v), Tratamento B: queijo contaminado com *S. aureus* e tratado com nisina (12,5 mg/ kg), Tratamento C: queijo contaminado com *S. aureus* e tratado com natamicina (5 mg/ kg).

Para ambos os microrganismos, a associação dos méis foi eficiente na eliminação, pois após 6 e 15 dias, *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente, não apresentaram contagem. O mesmo foi observado por Belewu e Morakinyo (2009), que testaram a aplicação de mel em queijos macio da África ocidental e obtiveram resultados satisfatórios após 2 e 4 semanas, para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente, indicando a eficiência do tratamento com o mel utilizado a 5% e 10% de concentração, porém em um espaço de tempo maior. Possivelmente, pela diferença na composição e concentrações dos méis utilizados, estes autores demoraram mais tempo para obter resultados na diminuição de microrganismos. Outro estudo realizado com mel de *A. mellipodae* inibiu o crescimento de *S. aureus* a uma concentração de 15 a 20 % (v/v) (Effen *et al.*, 1992), enquanto que Andualen (2013) obteve resultados utilizando esse mel de 12,5 e 6,25 % (v/v) para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

A baixa contagem bacteriana ao longo dos dias de maturação concordou com o relatório de Molan (1992) e Belewu e Morakinyo (2009) que relataram que queijos e cortes de aves tratados com mel resultaram em baixo nível de crescimento bacteriano. A eliminação de cocos viáveis, bactérias sem formação de esporos, mofos que podem crescer em alimentos

ácidos também são relatados em outras literaturas (El-Sukhou *et al.*, 1994; Mundo *et al.*, 2004; Snow *et al.*, 2004).

Vale ressaltar que nas concentrações utilizadas, tanto a combinação de méis quanto a nisina eliminaram os microrganismos Gram-positivos no mesmo espaço de tempo, demonstrando que possuem semelhante eficiência. O mesmo não foi observado na comparação com *E. coli*, possivelmente devido a diferença na constituição da parede.

Cada componente do mel exerce um mecanismo de ação em relação aos microrganismos. A produção de H₂O₂ é notadamente eficiente contra *E. coli* e *P. aeruginosa* (bactérias Gram-negativas), enquanto que a soma de vários fatores é o que torna o mel um antibacteriano para Gram-positivas (Kwakman *et al.*, 2010). Ainda, demonstraram que a neutralização de MgO ou H₂O₂ sozinho não alterou a atividade bactericida do mel estudado, mas a neutralização simultânea de MgO e H₂O₂ em 10% de mel reduziu a morte de *Bacillus subtilis* em 4 logs, constatando que a ação em Gram-positivas está associada a ação vários componentes do mel simultaneamente.

A utilização dos méis combinados foi uma alternativa ao alto custo do HSB, assim, com a utilização de uma proporção HSB/HAM, foi possível eliminar 6 log de *E. coli* e *S. aureus*, em um espaço de tempo inferior a 15 dias (**Figuras 3A e 3B**), ao passo que em concentrações menores, esse tempo foi no mínimo, duplicado. Clébis *et al.* (2017) verificou em um estudo “in vitro” que para as bactérias Gram-negativas, o mel HSB foi capaz de reduzir a CIM do HAM pela metade. E para Gram-positivas, o uso do mel HAM também teve como resultado, a redução da CIM do HSB pela metade. Constando assim, que esta interação dos méis sugere uma diferença no espectro de ação entre eles, viabilizando o uso clínico deles através da formulação de misturas com diferentes méis.

Entretanto, o mesmo não foi observado quando aplicados ao queijo e, para fungos, a associação de méis HSB e HAM apenas inibiu o crescimento na superfície do queijo, mostrando a ação fungistática dos méis em relação aos fungos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Belewu e Morakinyo (2009) em seu estudo observaram que os fungos do gênero *Aspergillus* apresentaram crescimento nos queijos tratados com mel até a quarta semana de maturação, o que não foi constatado nesse trabalho.

Estudos apresentaram a eficácia da utilização de méis monoflorais contra fungos de leveduriformes (*Candida* sp.), bem como *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea* e *Aspergillus flavus*. O efeito antifúngico de alguns méis, especialmente os provenientes de favas escuras e que contêm altas concentrações de própolis, pode ser devido à presença de um número de ácidos aromáticos, incluindo o cinamato de benzilo, cinamato de

metilo, ácido cafeico, cinamato de cinamilo, cinnamoylglcine, e os terpenóides (vulgarmente conhecidos como própolis). Além disso, pode haver proteínas no mel que tenham atividade antifúngica (Boukraâ *et al.*, 2008; Khosravi *et al.*, 2008; El-Gendy, 2010; Candiracci *et al.*, 2012; Moussa *et al.*, 2012).

Industrialmente, o uso da natamicina é efetivo no controle do crescimento de fungos, bolores e leveduras e, por esse motivo, é empregada no processamento de alimentos, durante a maturação, porém não possui efeito em bactérias ou vírus (Brustolin *et al.*, 2009). Por apresentar baixa solubilidade, é utilizada na superfície dos alimentos a uma dose de 5 mg/ Kg-1; deve-se garantir que o antibiótico não migre para o interior do alimento, não podendo ser detectado a uma profundidade de 2 mm do produto alimentício (Brasil, 1996; EFSA, 2009). Na Alemanha, seu uso foi sugerido como aditivo em cervejas, vinhos e sucos de frutas, entretanto a prática não foi implementada porque a substância provocava alterações irreversíveis em cepas de leveduras. Por ser um antibiótico polieno, faz distender a parede celular pela ligação com os esteróis da membrana e, em fungos, ocorre à ruptura do ergosterol da membrana fúngica, com perda do conteúdo celular (THOMAS *et al.*, 2005).

Já a utilização da nisina como conservante alimentício é aprovado em muitos países, porém com aplicações alimentícias restritas (perda de atividade em torno de pH 4 e sob temperaturas inferiores a 20°C, imobilização pelas gorduras e outros compostos alimentícios). É uma das raras bacteriocinas de uso autorizado na indústria alimentícia, tendo atividade antimicrobiana devido à ação na membrana citoplasmática, por isso, tem pouca ou nenhuma ação sobre bactérias Gram-negativas, pois a presença da camada de lipopolissacarídeo oferece maior proteção à célula, não permitindo que agentes externos alcancem a membrana citoplasmática e sobre fungos filamentosos e leveduras (Henning *et al.*, 1986; Gharsallaoui *et al.*, 2015).

Devido às limitações e desvantagens encontradas nos antimicrobianos convencionalmente incorporados em alimentos, tem aumentado a procura por produtos mais saudáveis e naturais, usando matérias-primas de fontes seguras e tecnologias adequadas, na tentativa de que indústria e produtores se adequem para melhorar a qualidade dos alimentos fornecidos aos consumidores. Devido a isso, alguns estudos sugerem que a ação antibacteriana múltipla do OEO, de méis e da combinação de méis, é uma vantagem para minimizar a seleção de cepas resistentes, visto que são compostos, possuem várias moléculas bioativas e, por esse motivo, atuam por vários mecanismos antimicrobianos (Lambert *et al.*, 2001; de Camargo *et al.*, 2006; Rivas *et al.*, 2010; Bassolé e Juliani, 2012). Além disso, existem outras vantagens que esses compostos naturais apresentam, o OEO possui baixa

toxicidade contra células epiteliais de laringe humana e ausência de atividade hemolítica nas concentrações de ótima atividade antibacteriana (Scandorieiro *et al.*, 2016). Já o mel HSB também possui baixo valor de toxicidade em células HeLA (CC_{50} máximo de 13%) (Fauzi *et al.*, 2011; Nishio *et al.*, 2016). Ainda, o OEO apresenta ampla atividade antimicrobiana, atuando contra fungos leveduriformes, filamentosos e bactérias Gram positivas e Gram negativas (Busatta *et al.*, 2007; Cleff *et al.*, 2010; Giordani *et al.*, 2014; Millezi *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014; Scandorieiro *et al.*, 2016), bem como apresenta atividade antimicrobiana em baixas concentrações, contribuindo para a baixa toxicidade e redução de custos para a indústria alimentícia.

Conclusão

A utilização de OEO na produção de queijos maturados apresentou efeitos antimicrobianos consideráveis, tais como amplo espectro de ação, atuando contra fungos e bactérias presentes na superfície do queijo, além do OEO apresentar ação antimicrobiana rápida e em baixa concentração e, a concentração utilizada, não inibir o crescimento das bactérias lácticas da cultura adicionada. A combinação dos méis HSB e HAM fez com que houvesse inibição do crescimento microbiano no queijo, porém em concentrações semelhantes às CIMs dos mesmos (sem diminuir consideravelmente a concentração de cada mel).

Considerações finais

Foram isolados genes de virulência de *E. coli* enteropatogênia (*eaeA*) e pelo menos quatro dos cinco genes de ExPEC de queijos artesanais, além de encontrar um sorogrupo patogênico nunca descrito em isolados de queijos no Brasil;

Tanto o OEO quanto a combinação de HSB e HAM foram eficientes na inibição do crescimento de cepas isoladas de queijos artesanais;

A utilização de OEO na produção de queijos teve resultados satisfatórios, visto que foi necessária uma concentração abaixo da CIM para eliminar os patógenos e fungos;

O mesmo não ocorreu com a combinação de méis que, embora tenha sido efetiva na concentração utilizada, foi necessária uma concentração igual à CIM para eliminar os patógenos, não reduzindo o custo da utilização do mel;

Quando comparamos OEO e os antimicrobianos nisina e natamicina, observamos um amplo espectro de ação, pois atuou em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Enquanto que a nisina atuou mais efetivamente em Gram-positivas e a natamicina nos fungos, mostrando uma vantagem microbiológica na utilização do OEO na produção de queijos submetidos à maturação. O mel também mostrou ter amplo espectro de ação, no entanto, foram necessárias concentrações altas para eliminar os microrganismos contaminantes;

A utilização de OEO a 0,02% não interferiu na cultura láctica, pois a concentração foi três vezes menor que a CIM, no entanto, as concentrações de méis utilizadas podem ter interferido no crescimento das bactérias lácticas, pois foram inseridas proporções iguais ou maiores que a CIM.

Portanto, pode-se fazer o uso do OEO em substituição a nisina e a natamicina sem afetar as bactérias lácticas e com a vantagem de atingir vários grupos de microrganismos. Entretanto, a utilização da combinação de méis fica restrita devido à alta concentração necessária. Mais estudos deverão ser realizados para identificar uma proporção/ concentração adequada para microrganismos contaminantes e bactérias lácticas.

Referências

Allerberger, F., and Wagner, M. (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(1), 16-23.

- Alves, R. M. O. et al. (2005) Custo de produção de mel: uma proposta para abelhas africanizadas e meliponíneos. 1. ed. Série meliponicultura- nº 02. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005. 14 p
- Anduaem, B. (2013). Combined antibacterial activity of stingless bee (*Apis mellipodae*) honey and garlic (*Allium sativum*) extracts against standard and clinical pathogenic bacteria. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 3(9), 725-731.
- ANVISA. Resolução, R. D. C. nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.
- Barros, J. C., Conceição, M. L., Gomes Neto, N. J., Costa, A. C. V., Siqueira Júnior, J. P., and Basílio Júnior, I. D. (2009). Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. LWT Food Sci. Tech. 42, 1139–1143.
- Bassolé, I. H. N., and Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules 17, 3989–4006.
- Belewu, M. A., and Morakinyo, O. A. (2009). Nutritional, Microbiological and Sensory evaluation of honey treated and untreated soft cheese. Eur. J. Sci. Res, 26, 124-131.
- Belewu, M. A., Belewu, K. Y., and Ganiyu, R. O. (2011). Evaluation of lemon grass (*Cymbopogon citrates*) oil and pure natural honey on the shelf life of cheese. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 10(4), 2129-2134.
- Botrel, D. A., Soares, N. D. F. F., Espitia, P. J. P., de Sousa, S., and Renhe, I. R. T. (2010). Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. Ceres, 57(3).
- Boukraâ L, Benbarek H, and Ahmed M. (2008). Synergistic action of starch and honey against *Aspergillus niger* in correlation with Diastase Number. Mycoses. 51:520–522.
- BRASIL. (2003) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.
- BRASIL. (1996). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Diário Oficial da União, Brasília, 1996.
- Brustolin, J. C. (2009). Uso da natamicina no controle do desenvolvimento de fungos em salame tipo italiano. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2009
- Buriti, F. C., Da Rocha, J. S., and Saad, S. M. (2004). Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. International Dairy Journal, 15(12), 1279-1288.
- Busatta, C., Mossi, A. J., Rodrigues, M. R. A., Cansian, R. L., and Oliveira, J. V. (2007). Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. Braz. J. Microbiol. 38, 610–616. doi: 10.1590/S1517- 83822007000400006
- Callon, C.; Picque, D.; Corrieu, G.; Montel, M.C. (2011). Ripening conditions: a tool for the control of *Listeria monocytogenes* in uncooked pressed type cheese. Food Control, v. 22, p.1911-1919.

- Candiracci, M., Citterio, B., Piatti, E. (2012). Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food Chemistry*, 131(2), 493-499.
- Clébis, Victor Hugo. (2017). Estudo da Ação Antibacteriana e Efeito Aditivo da Associação Entre os Méis de *Apis mellifera* Latreille Africanizada (Hymenoptera: Apidae: Apinae) e *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, 2017.
- Cleff, M. B., Meinerz, A. R. M., Faria, R. O. D., Xavier, M. O., Santin, R., Nascente, P. D. S., and Meireles, M. C. A. (2010). Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária.
- CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2016). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, Ninth Edition. Pensilvânia, Estados Unidos: Wayne, 2016.
- de Camargo, R. C. R., PEREIRA, F. D. M., LOPES, M. D. R., and Wolff, L. F. (2006). Mel: características e propriedades. Embrapa Meio-Norte-Documents (INFOTECA-E).
- Delves-Broughton, J. Nisin as a food preservative. *Food Australia*, n. 57, p. 525-527, 2005.
- dos Santos Rodrigues, J. B., de Carvalho, R. J., de Souza, N. T., de Sousa Oliveira, K., Franco, O. L., Schaffner, D., and Magnani, M. (2017). Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. *Food Control*, 73, 1237-1246.
- Efem SEE, Udoh KT, Iwara CI. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infect* 1992; 20(4): 227-229
- EFSA (European Food Safety Agency). Scientific opinion on the use of natamycin (E 235). *EFSA Journal*, n. 7, 2009.
- El-Gendy MMA. In vitro evaluation of medicinal activity of Egyptian honey from different floral sources as anticancer and antimycotic infective agents. *J Microbiol Biochem Technol*. 2010;2:118–123
- Elshafie, H. S., Mancini, E., Sakr, S., De Martino, L., Mattia, C. A., De Feo, V., and Camele, I. (2015). Antifungal activity of some constituents of *Origanum vulgare* L. essential oil against postharvest disease of peach fruit. *Journal of medicinal food*, 18(8), 929-934.
- El-Sukhon, S. N., Abu-Harfeil, N., and Sallal, A. K. (1994). Effect of honey on bacterial growth and spore germination. *Journal of Food Protection*, 57(10), 918-920.
- Fauzi, A. N., Norazmi, M. N., and Yaacob, N. S. (2011). Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 871–878. doi:10.1016/j.fct.2010.12.010
- Forsythe, S. J. (2013). *Microbiologia da segurança dos alimentos*. Artmed Editora.
- Gann, L. D. *Antimicrobial activity of Essential Oils and their components against lactic acid bacteria*. 2013.
- Gautam, N., Mantha, A. K., and Mittal, S. (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *Biomed. Res. Int*. 2014:154106.
- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., and Degraeve, P. (2015). Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(8), 1262-1274.

- Gilling, D. H., Kitajima, M., Torrey, J. R., and Bright, K. R. (2014). Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1149–1163. doi: 10.1111/jam.12453.
- Giordani, R.; Regli, P.; Kaloustian, J., et al. (2004). Antifungal effect of various essential oils against *C. albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytot. Res.*, v.18, p.990-995.
- Henning, S., Metz, R., and Hammes, W. P. (1986). Studies on the mode of action of nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 3(3), 121-134.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3:12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012
- Israili, Z. H. (2014). Antimicrobial properties of honey. *American journal of therapeutics*, 21(4), 304-323.
- Jersek, B., Poklar Ulrih, N., Skrt, M., Gavaric, N., Bozin, B., and Smole Mozina, S. (2014). Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum*. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 65(2), 199e208.
- Kelly, M. T.; Matsen, J. M. (1976). In vitro activity, synergism, and testing parameters of amikacin, with comparisons to other aminoglycoside antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 9, n. 3, p. 440–447.
- Khosravi AR, Shokri H, Katirae F, et al. (2008). Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species. *J Apicult Res.* 47: 256–260.
- Khosravi AR, Shokri H, Katirae F, Ziglari T, and Forsi M. (2008). Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species. *J Apic Res*; 47(8): 256-260
- Kwakman, P. H., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M., and Zaat, S. A. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24(7), 2576-2582.
- Lacerda, I. C., Miranda, R. L., Borelli, B. M., Nunes, Á. C., Nardi, R. M., Lachance, M. A., and Rosa, C. A. (2005). Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *International journal of food microbiology*, 105(2), 213-219.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., and Nychas, and G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, 453–462. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x
- Mavric, E. et al. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 52, n. 4, p. 483-489.
- McLauchin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., and Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.92, p.15-33.
- Medini, H., Elaissi, A., Farhat, F., Khouja, M. L., Chemli, R., and Harzallah-Skhiri, F. (2009). Seasonal and geographical influences on the chemical composition of *Juniperus*

- phoenicea* L. essential oil leaves from the northern Tunisia. Chem. Biodivers. 6, 1378–1387. doi: 10.1002/cbdv.200800202.
- Melo, N. R.; Soares, N. F. R.; and Gonçalves, M. P. J. C. (2005). Nisina: um conservante natural para alimentos. Revista Ceres, v. 52, n. 303, p. 921-938, 2005.
- Millezi, A. F. et al. (2014). Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 16, n. 1, 2014.
- Molan, P. C. (1992) The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. Bee World 73, 5–28.
- Moro, A., Libran, C. M., Berruga, M. I., Zalacain, A., and Carmona, M. (2013). Mycotoxicogenic fungal inhibition by innovative cheese cover with aromatic plants. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93(5), 1112e1118
- Moussa A, Noureddine D, Saad A, et al. (2012). Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. Asian Pacific J Trop Biomed. 2012;7:554–557.
- Mundo, M. A., Padilla-Zakour, O. I., and Worobo, R. W. (2004) Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. Int. J. Food Microbiol. 97, 1–8
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR. v. 67, n. 4, p. 593-656.
- Nishio, E. K. et al. Antibacterial activity of honey from stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Journal of Apicultural Research, v. 54, n. 5, p. 452-460, 2016.
- Olaitan, P.B.; Adeleke, E.O.; and Ola, O.I. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. African Health Science, v. 7, n. 3, p. 159-165.
- Paiva, V. N., Cunha, A. L. F. S., da Cruz, R. R., Sobral, D., de Souza, R. M., and Pinto, M. S. (2016). Efeito da adição do fermento natural sobre a contagem de bactérias lácticas em queijo minas artesanal do serro. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 70(5), 279-285.
- Perry, K. S. (2004). Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. Química Nova, 27(2), 293-300.
- Preuss, H. G., Echard, B., Enig, M., Brook, I., and Elliott, T. B. (2005). Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. Molecular and cellular biochemistry, 272(1), 29-34.
- Resa, C. P. O.; Jagus, R. J.; and Gerscheson, L. N. (2014). Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces. Food Control, v. 35, n. 1, p. 101-108.
- Rosato, A., Piarulli, M., Corbo, F., Muraglia, M., Carone, A., Vitali, M. E., et al. (2010). In vitro synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. Curr. Med. Chem. 17, 3289–3295.
- Rotar, A. M., Vodnar, D. C., Bunghez, F., Catunescu, G. M., Carmen, R. P., Jimborean, M., and Semeniuc, C. A. (2015). Effect of goji berries and honey on lactic acid bacteria

- viability and shelf life stability of yoghurt. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(1), 196.
- Scandorieiro, S., et al. (2016). Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Frontiers in microbiology*, 7.
- Snow, M.J. and Manley-Harris, M. (2004). On the nature of non-peroxide antibacterial activity of Newzealand Manuka honey. *Food Chem.* 84 :145-147
- Sobral, M. V., Xavier, A. L., Lima, T. C., and de Sousa, D. P. (2014). Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Sohier, D., et al. (2009). Important genetic diversity revealed by inter-LTR PCR fingerprinting of *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii* strains from French traditional cheeses. *Dairy Science and Technology*, v.89, p.569-581.
- Souza, E. L., Barros, J. C., Oliveira, C. E. V., and Conceição, M. L. (2010). Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 308–311. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.025.
- Souza, E. L., Oliveira, C. E. V., Stamford, T. L. M., Conceição, M. L., and Gomes Neto, N. J. (2013). Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Braz. J. Microbiol.* 44, 29–35. doi: 10.1590/S1517-83822013005000001
- Souza, G. T., de Carvalho, R. J., de Souza, N. T., dos Santos Rodrigues, J. B., Xavier, D. E., de Souza, E. L., and Magnani, M. (2014). Antimicrobial Activity of the *Origanum Vulgare* L. Essential Oil Against Pathogenic and Starter Bacteria Species Related To Brazilian Semi-Hard Cheese (Coalho). *Blucher Food Science Proceedings*, 1(1), 111-112.
- Stojkovic, D., Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Ristić, M., and Šiljegović, J. (2013). Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Arch. Biol. Sci.* 65, 639–644. doi: 10.2298/ABS1302639S
- Szabó, M. Á., Varga, G. Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L., et al. (2010). Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytother. Res.* 24, 782–786. doi: 10.1002/ptr.3010
- Theunissen F, Grobler S, and Gedalia I. (2001). The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. *Apidologie.* 32:371–379.
- Thomas, L. V., et al. (2005). Natamycin Control of Yeast Spoilage of Wine. *International Association for Food Protection - Food Protection Trends*, v. 25, p. 510-517.
- Ultee, A., Kets, E. P. W., and Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4606–4610.
- Wasihun, A. G., and Kasa, B. G. (2016). Evaluation of antibacterial activity of honey against multidrug resistant bacteria in Ayder Referral and Teaching Hospital, Northern Ethiopia. *SpringerPlus*, 5(1), 842.
- Wiese, H. (1986). *Nova apicultura*. Porto Alegre, Brasil: Agropecuária, 1986. 493 p.
- Zantar, S., Yedri, F., Mrabet, R., Laglaoui, A., Bakkali, M., and Zerrouk, M. H. (2014). Effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum compactum* essential oils on the shelf life of fresh goat cheese. *Journal of Essential Oil Research*, 26(2), 76-84.