



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

LARA BARBOSA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA CULTIVÁVEL DE LEITE BOVINO
E QUEIJO COALHO PRODUZIDOS NO RIO GRANDE DO NORTE**

MOSSORÓ-RN
2015

LARA BARBOSA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA CULTIVÁVEL DE LEITE BOVINO
E QUEIJO COALHO PRODUZIDOS NO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva -
UFERSA

MOSORÓ-RN
2015

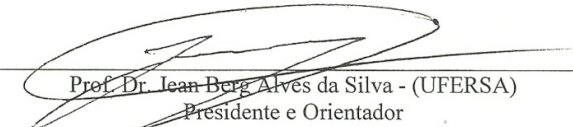


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 142/2015

Às **14:30 horas** do dia 24 de abril do ano de dois mil e quinze, no auditório do Centro Integrado do Departamento de Ciências Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, sob a presidência do Prof. Doutor **Jean Berg Alves da Silva**, reuniu-se a Banca Examinadora de Defesa de Dissertação de Mestrado, de autoria de **Lara Barbosa de Souza**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal desta Universidade com o título: **AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA CULTIVÁVEL DE LEITE BOVINO E QUEIJO COALHO PRODUZIDOS NO RIO GRANDE DO NORTE**. A Banca Examinadora ficou assim constituída: Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva, Presidente da Banca e Orientador, Prof. Dr. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto e Prof. Dr. Fernanda Matias, como examinadores. Não foram registradas ocorrências significativas. Concluída a defesa, foram realizadas as arguições e algumas sugestões feitas e acatadas. Em seguida, procedeu-se o julgamento pelos membros da Banca Examinadora, tendo a dissertação sido **APROVADA**. Tendo o discente o prazo de 90 dias a partir da data de defesa para entregar a versão corrigida na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. E, para constar, eu, *Jean Berg Alves da Silva*, Presidente da Banca Examinadora, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme, foi assinada por mim e demais membros da Banca Examinadora.

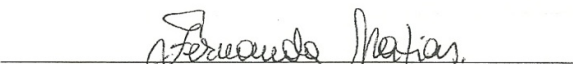
Mossoró, 24 de abril de 2015.



Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva - (UFERSA)
Presidente e Orientador



Prof. Dr. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto
Examinadora



Prof. Dr. Fernanda Matias
Examinadora

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LARA BARBOSA DE SOUZA nasceu no dia 13 de setembro de 1990, na cidade de Aracati/CE. cursou o ensino médio na Escola Geo (em Mossoró), concluindo no ano de 2007. Iniciou o ensino superior em março de 2009, na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), onde cursou Biotecnologia, obtendo o título de Bacharela em abril de 2013. Ingressou, em maio de 2013 no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). No decorrer do curso de mestrado, a bolsista CAPES, realizou estágio em docência na disciplina de Biotecnologia de alimentos, nas turmas do curso de bacharelado em Biotecnologia da UFERSA.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista à meus pais,
pelo amor, carinho e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder, além da vida, fé, saúde, forças, e por guiar minhas escolhas e iluminar meus passos.

Aos meus pais, José Edvaldo e Maria Zeneide, pelo amor incondicional, dedicação e confiança, que sempre depositaram em mim.

Aos meus avós, pelos sábios ensinamentos, abraço apertado e colo acolhedor.

A toda minha família, com os quais eu aprendi o sentido da palavra UNIÃO.

Ao meu namorado, Hector, pelo companheirismo, incentivo, compreensão e conselhos!

Ao meu orientador, Jean Berg, pela oportunidade, estímulo, confiança, e todo apoio nas orientações durante toda execução do presente trabalho. Por sua contribuição fundamental na minha formação acadêmica. A minha gratidão por todo auxílio!

Aos meus amigos, pelos sorrisos sinceros, parceria e descontração!

A minha amiga Karol, pelo apoio, confiança, amizade e exemplo profissional. Com quem aprendi a buscar o conhecimento mais e mais a cada dia, obrigada pelos conselhos.

As professoras Fernanda Matias e Raphaela Barreto, que se disponibilizaram a compor a banca avaliadora e contribuir com o trabalho.

Aos membros e amigos do LIPOA, pelo apoio durante as análises, pelo conhecimento compartilhado, pela união e amizade.

A Universidade Federal Rural do Semi-árido.

A CAPES, pelo suporte financeiro;

A todos aqueles que de forma direta ou indireta, influenciaram na realização deste trabalho, e são igualmente merecedores da minha gratidão.

RESUMO

Leite e derivados são alimentos de alto valor nutricional. E, conseqüentemente, fazem parte da dieta da população brasileira em uma ampla faixa etária. Devido a sua composição, estes alimentos representam um ótimo meio para o desenvolvimento de micro-organismos. O interesse dos consumidores por alimentos mais saudáveis faz crescer a busca por novos métodos de conservação, que preservem as características organolépticas do alimento e contribuam na qualidade. O conhecimento da população microbiana de leite e derivados auxilia na caracterização das condições de higiene da matéria-prima e dos processos de produção de derivados. Além disso, também constitui uma ferramenta para o estudo do potencial biotecnológico de bactérias ácido-láticas (BAL), naturalmente presentes nestes alimentos, as quais estão diretamente ligadas à formação do ácido láctico, contribuindo na coagulação do leite. Essas bactérias são apontadas como principal fator capaz de inibir o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Neste contexto, objetivou-se avaliar a microbiota de leite e queijo coalho produzidos no semiárido do Brasil. Foram analisadas 23 amostras, sendo 12 de leite bovino cru e 11 de queijo coalho, submetidas a análises microbiológicas para contagem de bactérias mesófilas, contagem de *Staphylococcus* spp., Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes, isolamento e caracterização de bactérias lácticas e ainda teste de antagonismo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Eschechia coli* ATCC 25922. Apenas uma amostra apresentou contagem bacteriana reduzida, em relação a todos os micro-organismos analisados. Foram obtidas 56 cepas de BAL, das quais 29 (51,78%) foram oriundas das amostras de leite e 27 (48,22%) das amostras de queijo coalho. Do total, 36 (64,3%) isolados de bactérias ácido-láticas (BAL) demonstraram atividade antagonista contra os micro-organismos indicadores. O maior efeito inibitório observado foi obtido pelos isolados das amostras de leite frente a *E. coli*. As cepas de BAL demonstraram efeito inibitório frente aos micro-organismos estudados, evidenciando seu potencial tecnológico e sua possível utilização como bioconservantes em alimentos, contribuindo na melhoria da qualidade do produto e na redução da microbiota indesejada.

Palavras-chave: alimento; bactérias lácticas; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Milk and dairy products are of high nutritional value foods. And thus are part of the Brazilian population diet in a wide age range. Due to its composition, these foods are a great way for development of micro-organisms. The consumer interest in healthier foods increases the search for new conservation methods, for preserving the organoleptic characteristics of the food and contribute to their quality. Knowledge of the microbial population the milk and derivatives assists in the characterization of the hygiene conditions of the raw materials and derivatives production processes. It also provides a tool for the studying the biotechnological potential of lactic acid bacteria (LAB) naturally present in these foods. Which are directly linked to the formation of lactic acid, contributing to the coagulation of the milk. These bacteria are cited as the main factor capable of inhibiting the growth of pathogenic and spoilage micro-organisms. In this context, the objective was to evaluate the microbial rennet milk and cheese produced in the semiarid region of Brazil. Were analyzed 23 samples, 12 raw milk and 11 cheese curd, submitted will microbiological analyzes to count mesophilic bacteria, *Staphylococcus* spp. count, most probable number of total and thermotolerant coliforms, isolation and characterization of lactic acid bacteria and even front antagonism test to *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. Only one sample showed reduced bacterial counts, for all analyzed microorganisms. We obtained 56 isolates of LAB, of which 29 (51.78%) were derived from milk samples and 27 (48.22%) of curd cheese samples. Of the total, 36 (64.3%) isolates of lactic acid bacteria (LAB) have demonstrated antagonistic activity against the indicators microorganisms. The greatest inhibitory effect was observed for isolates obtained from milk samples for *E. coli*. Strains of LAB showed inhibitory effect compared to the studied micro-organisms, showing their technological potential and their possible use as biopreservatives in food, contributing to the improvement of product quality and reducing of unwanted microbiota.

Keywords: food; lactic acid bacterial; antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma das análises realizadas no estudo.....	26
Figura 2: Inibição de <i>E.coli</i> (A) e inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> (B) observadas no experimento.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contagem microbiana logarítima (log UFC/g ou ml) de bactérias mesófilas, *Staphylococcus* spp., coliformes totais e termotolerantes em amostras de leite cru e queijo coalho, utilizadas para isolamento das BAL.....28

Tabela 2: Potencial inibitório dos isolados de BAL de leite bovino e queijo coalho frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Eschechia coli* ATCC 25922.....29

Tabela 3: Atividade inibitória (média dos halos de inibição em mm) obtidos com os isolados de BAL de leite bovino e queijo coalho frente a patógenos de referência.....29

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Leite	5
3.2 Queijo	7
3.3 Importância da avaliação microbiológica de leite e queijo	9
3.4 Bactérias ácido-láticas	11
4. Referências bibliográficas.....	17
5. CAPÍTULO II – Atividade antagonista contra <i>Eschechia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> de bactérias láticas isoladas de leite e queijo coalho do semiárido brasileiro. ...	23
Resumo	23
Abstract.....	23
Introdução	24
Material e métodos	25
Resultados e discussão.....	27
Conclusão.....	30
Agradecimentos.....	31
Referências.....	31

1. INTRODUÇÃO

A população microbiana dos alimentos é composta por diferentes grupos de micro-organismos nativos, ou incorporados a estes durante as etapas de produção, armazenamento e processamento. De acordo com as características do alimento, da produção, contaminação e natureza, ocorrem alterações que determinam a microbiota do produto. Devido à composição do leite, este representa um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de micro-organismos (CHAMBERS, 2002).

O leite produzido no Brasil é obtido em condições deficientes de higiene, com prevalência de altas contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes e presença de patógenos. A fim de reduzir essa população indesejada, a legislação brasileira estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou a tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996). A pasteurização embora destrua micro-organismos indesejáveis, ocasiona também a destruição da microbiota láctica natural do leite, a qual é responsável pelo desenvolvimento das características sensoriais dos queijos (GRAPPIN; BEUVIER, 1997).

Várias pesquisas têm caracterizado a microbiota de diversos queijos artesanais produzidos a partir de leites crus de vaca, cabra e/ou ovelha visando identificação, quantificação e diversidade dos principais grupos microbianos e estabelecendo o papel destes micro-organismos no desenvolvimento das características sensoriais destes produtos (ORTOLANI et al., 2010; GIRAFÁ, 1997; GONZALES et al., 2006; MADRAU et al., 2006). Existe também a preocupação em preservar as características destes queijos, bem como o processo de fabricação em determinadas regiões (BRUNO; CARVALHO, 2009).

Bactérias ácido-láticas (BAL) fazem parte da microbiota natural do leite e sua aplicação no processo de fermentação, para melhoria e preservação de alimentos é bastante antigo. Esse grupo microbiano é composto por vários gêneros, que se apresentam na forma de cocos e bacilos e têm diversas características comuns: são todas Gram positivas, na maioria das vezes catalase negativas, são raros os casos de motilidade e não esporulam. A principal particularidade das BAL é a habilidade de fermentar açúcares, predominantemente em ácido láctico, promovendo uma acidificação

ambiental (GALVEZ et al., 2007). Estas bactérias produzem grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais diversas e desejáveis (LIMA et al., 2009).

Na fermentação dos alimentos o papel das BAL é duplo. A degradação dos carboidratos presentes na matéria-prima, contribui para o aumento da vida útil do produto, devido a diminuição do pH, que torna o meio inadequado para a maioria dos micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Além disso, algumas BAL também são capazes de produzir peptídeos antagônicos contra outras bactérias (MADERA et al., 2003). Esse fenômeno tem recebido mais atenção científica, nomeadamente pela utilização de várias culturas de bactérias do ácido láctico, ou dos seus produtos, para controlar bactérias patogênicas ou deteriorantes.

Identificar BAL naturalmente presentes em leite cru e derivados que apresentem atividade antimicrobiana é de extrema importância para elucidar as interações microbianas que podem ocorrer nesses alimentos e explicar a baixa ocorrência de micro-organismos patogênicos. A partir destes estudos, as culturas de BAL podem ser utilizadas em indústrias de alimentos como ferramentas importantes para a garantia da qualidade e segurança microbiológica de leite e derivados (ORTOLANI, 2009).

O uso de uma microbiota protetora ou seus peptídeos antimicrobianos para prolongar a vida útil e aumentar a segurança de alimentos é denominado de bioconservação ou biopreservação. Consiste em uma ferramenta tecnológica, que torna os alimentos mais competitivos, permitindo a redução no uso de compostos exógenos (NASCIMENTO, 2007). A presença de bactérias lácticas dos gêneros *Streptococcus* spp, *Lactococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Lactobacillus* spp e *Leuconostoc* spp, podem exercer efeito antagonista sobre outros micro-organismos impedindo sua proliferação nos queijos elaborados com leites não pasteurizados (GERMANO; GERMANO, 2008).

A atividade antagonista de BAL sobre outros micro-organismos ocorre por diversos mecanismos, como sensibilidade às interações microbianas, competição por nutrientes e sítios de adesão, e produção de substâncias inibitórias potencialmente letais. Visto que as BAL são consideradas seguras, seu potencial de inibição frente a micro-organismos patogênicos e deteriorantes tornou-se foco de estudo devido a probabilidade de aplicação como conservantes naturais (ORTOLANI, 2009).

Conhecer a microbiota láctica endógena dos produtos lácticos, ajuda na prevenção da perda da biodiversidade presente nos queijos produzidos por diferentes métodos típicos das tradições locais e regionais, contribuindo ainda para seleção de novas estirpes que possam ser utilizadas como culturas iniciadoras na produção industrial de queijos tradicionais ou como culturas iniciadoras clássicas na fabricação de produtos lácteos já consagrados (FORTINA et al., 2003).

A produção e comercialização de leite e derivados na região semi-árida do Brasil é bastante expressiva. Apesar de constituir uma fonte biológica para o estudo da diversidade microbiana destes alimentos, poucas pesquisas são desenvolvidas buscando caracterizar essa população, que é composta por micro-organismos inerentes ao leite e de fontes externas. Dentre os micro-organismos endógenos ao leite, as BAL apresentam grande importância tecnológica e agregam valor a estes produtos. Conhecer esta população é um dos fatores que podem contribuir na melhoria da qualidade destes alimentos, visto que algumas cepas podem inibir o desenvolvimento de patógenos e deteriorantes, e que a maior parte da produção de queijo coalho na região é feita com a utilização de leite cru. O estudo de fontes naturais que possibilitem o aumento da vida útil do alimento é interessante para produtores e consumidores, pois possibilita redução no uso de compostos exógenos e reduz as etapas de processamento.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a microbiota autóctone e contaminante de leite bovino cru e queijo coalho produzido no Rio Grande do Norte.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a qualidade de amostras de leite bovino e queijo de coalho quanto a presença de bactérias mesófilas, contagem de *Staphylococcus* spp., Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes;
- Isolar e caracterizar a microbiota láctica presente em leite e queijo de coalho produzido na região semiárida do Brasil;
- Avaliar o efeito antagônico das estirpes de BAL isoladas de amostras de leite e queijo coalho frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e a *Escherichia coli* ATCC 25922.

3. CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leite

Entende-se por leite, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 2002). A produção de leite no Brasil apresenta importância nos mercados nacional e internacional, e contribui consideravelmente para a economia do país, com grande volume comercializado informalmente para consumo, sem nenhum tipo de fiscalização (EMBRAPA, 2008).

Apesar da importância desta atividade agropecuária para o país, o perfil das fazendas leiteiras ainda detém pouca tecnificação, com condições higiênicas insatisfatórias e controle sanitário ineficiente (NERO et al., 2009). Em consequência, o leite produzido apresenta baixa qualidade microbiológica, verificada por altas contagens de microrganismos indicadores de higiene, como aeróbios mesófilos e coliformes (NERO et al., 2009; NERO et al, 2004; FEITOSA et al, 2003).

Os parâmetros de qualidade são cada vez mais utilizados para detecção de falhas nas práticas de manejo, servindo como referência na valorização da matéria-prima. É importante que estes parâmetros estejam associados à qualidade microbiológica do leite, uma vez observado que a maioria dos países reconhecidos pela organização em seu setor lácteo, apresentam os teores de gordura, proteína e demais componentes bem como de contagem de células somáticas e contagem bacteriana total dentro dos padrões da legislação e para efeito do pagamento do leite (FONSECA; SANTOS 2001).

Para determinar a qualidade do leite, é necessário conhecer sua composição, pois esta define diversas propriedades sensoriais e industriais. O leite apresenta-se como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente por micelas de caseína e de glóbulos de gordura. Do ponto de vista comercial, o leite bovino é o tipo de leite mais importante, o qual é composto por água (87,3%), e sólidos totais (12,7%), assim distribuídos: proteínas totais (3,3 a 3,5%), gordura (3,5 a 3,8%), lactose (4,9%), além de minerais (0,7%) e vitaminas (SGARBIERI, 2005). Os constituintes do leite sofrem alterações pela dieta fornecida aos animais, como também se modificam de acordo com os fatores climáticos do meio que estes vivem. (DÜRR, 2004).

Por ser considerado um dos alimentos *in natura* mais completos e devido à grande importância que representa na alimentação humana, o leite e seus derivados estão entre os alimentos mais avaliados e testados em relação à qualidade (SANTOS; RODRIGUES, 2003). Paralelamente à sua importância como fonte nutricional, estes alimentos também são excelentes meios para o desenvolvimento de micro-organismos desejáveis e outros patogênicos e deteriorantes, havendo a necessidade de cuidados desde a sua produção, ordenha, beneficiamento e estocagem (TEUBER, 1992).

Além do leite cru, seus derivados são amplamente consumidos pela população, como queijos artesanais, sendo produzidos nas mesmas condições insatisfatórias de higiene e frequentemente não apresentam os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Ministério da Saúde (MORAES et al., 2009; FEITOSA et al., 2003).

Em função da abundância e disponibilidade de nutrientes, o leite é facilmente contaminado por diferentes grupos de micro-organismos, sendo que a presença de bactérias patogênicas no leite cru é uma preocupação de saúde pública, pelo risco potencial para quem o consome e até para quem o manuseia. E pode servir como fonte de contaminação cruzada para os produtos lácteos processados, pela contaminação do ambiente na indústria (ARCURI et al., 2006).

A contaminação microbiana do leite ocorre a partir de três principais fontes: de dentro da glândula mamária, da superfície exterior do úbere e tetos, e da superfície do equipamento e utensílios de ordenha e tanque. Além disso, o controle da temperatura e do período de tempo de armazenamento do leite é fundamental, uma vez que estes dois fatores estão diretamente ligados com a multiplicação dos micro-organismos presentes no leite (SANTOS; FONSECA, 2001).

A microbiota autóctone do leite contém micro-organismos endógenos e contaminantes, constituindo uma população diversificada. Além dos micro-organismos indesejáveis, essa microbiota é composta também por bactérias ácido-láticas (BAL), que desempenham um papel primordial no processo de fermentação do leite e maturação de queijos, conferindo características sensoriais essenciais (NESPOLO, 2009).

3.2 Queijo

O queijo é um produto lácteo elaborado a partir da coalhada de leite de vaca ou de outros animais mamíferos, que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem agregação de substâncias alimentícias. Sua produção envolve a combinação de quatro ingredientes: leite, coalho, micro-organismos e sal. É rico em nutrientes e apresenta diversidade de sabores, texturas e formas, em função da variabilidade do leite e das técnicas de produção (BERESFORD et. al., 2001).

As variedades de queijos existentes resultam de vários métodos de produção, processamento e manipulação. A indústria queijeira no Brasil representa um importante segmento do setor lácteo, onde os queijos se destacam, detendo cerca de 33% do volume total de leite industrializado (EMBRAPA, 2011). Entende-se por queijo de coalho, o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação. É um queijo de média a alta umidade, apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variando entre 35,0% e 60,0% (BRASIL, 2001).

Quanto aos aspectos sensoriais o queijo de Coalho, apresenta consistência semidura e elástica com textura compacta e macia podendo apresentar algumas olhaduras. Apresenta cor branca amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, com aroma, também ligeiramente ácido, que lembra massa de queijo coagulada (BRASIL, 2001).

O queijo tipo Coalho é fabricado com massa crua, semicozida e tradicionalmente consumido fresco. Sua produção data de mais de 150 anos, em vários Estados da região Nordeste do Brasil a partir de leite bovino cru e/ou leite pasteurizado (GRAPPIN; BEUVIER, 1997). A maior parte da produção nessa região é obtida em pequenas e médias queijarias, as quais movimentam, mensalmente, algo em torno de 10 milhões de reais, o que sinaliza essa atividade como importante para o âmbito social e econômico da região (PERRY, 2004).

Apesar de sua importância econômica e grande popularidade, a fabricação de queijo de coalho não conta com tecnologia apropriada para a melhoria de sua qualidade.

Segundo Escobar e Leuthier (2001), o queijo de coalho não possui padronização do seu processo de elaboração, sendo comum a utilização de leite cru apresentando grande quantidade de micro-organismos. Isto resulta em deterioração e redução da vida útil do produto, e não padronização das características organolépticas. O preparo, o transporte e a comercialização, muitas vezes, são realizados em condições deficientes, as quais permitem contaminação e proliferação microbiana (CARVALHO, 2007).

Sendo o leite a matéria-prima para produção de queijo, suas características e qualidade higiênica influenciam na microbiota do produto, quando produzido em condições inadequadas de higiene e sanidade, consequentemente gera produtos de baixa qualidade, afetando diretamente aspectos de qualidade microbiológica (NERO, 2005). A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA et al., 2003). As contaminações, aliadas às alterações decorrentes podem, em poucos dias, tornar o queijo inaceitável ou até mesmo impróprio para o consumo (ROCHA; BURITI, 2006).

Queijos de coalho produzidos a partir de leite cru apresentam sabores mais intensos que os produzidos com leite pasteurizado, devido à presença de micro-organismos próprios do leite com características autóctones da região onde ele é produzido, denominadas bactérias ácido lácticas endógenas do leite. Por outro lado, pode também conter bactérias patogênicas, como coliformes, salmonela, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, entre outras, perigosas para a saúde humana. Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais por serem, na maioria das vezes, elaborados a partir de leite cru e não sofrerem processo de maturação (FRANCIOSI et al., 2009; HOORDE et al., 2010).

O comércio informal de queijo é uma realidade em diversas regiões do nordeste brasileiro, no qual o Rio Grande do Norte participa ativamente. Precárias condições de higiene podem representar um risco microbiológico aos consumidores e possibilitar a veiculação de patógenos no alimento. Outro fator agravante é o fato do queijo de coalho ser, na maioria das vezes, consumido cru, ou seja, sem nenhum tratamento químico ou térmico (DUARTE et al., 2005).

As características intrínsecas do produto podem interferir na contaminação, sobrevivência e multiplicação de microrganismos, reduzindo a carga microbiana. Dentre esses fatores, a microbiota autóctone do leite e seus derivados são considerados como o principal interferente. As bactérias ácido lácticas, que fazem parte dessa microbiota de forma significativa, são apontadas como as principais responsáveis pela inibição e destruição de outros micro-organismos, incluindo os patogênicos (ORTOLANI, 2009). Queijos produzidos com leite cru apresentam aroma e sabor mais intensos do que os produzidos com leite pasteurizado devido à biodiversidade das BAL endógenas do leite (FRANCIOSI et al., 2009).

3.3 Importância da avaliação microbiológica de leite e queijo

Os micro-organismos estão intimamente associados com a disponibilidade, a abundância e a qualidade do alimento para consumo humano. Alimentos são facilmente contaminados com micro-organismos da natureza, na manipulação e no processamento. Após ter sido contaminado, o alimento serve como meio para o crescimento de micro-organismos, podendo ocorrer mudanças em suas características físicas, químicas e organolépticas, levando até mesmo a deterioração (CHAN et al., 1996). Esse fato representa um perigo aos consumidores, já que além de micro-organismos deteriorantes, o produto pode também servir como veículo para micro-organismos patogênicos (CAVALCANTE et al, 2007).

A legislação brasileira estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou a tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996), contudo somente as unidades produtoras inspecionadas é que promovem este tipo de tratamento. Em muitos casos, o leite utilizado na elaboração do queijo de coalho não é pasteurizado o que representa um risco em potencial para o consumidor devido à possibilidade de veiculação de micro-organismos patogênicos, como *Salmonella* spp. e *Staphylococcus*, e micro-organismos do grupo coliforme. Outro fator agravante é o fato do queijo de coalho ser, na maioria das vezes, consumido cru, sem nenhum tipo de tratamento (NASSU et al., 2001 ; DUARTE et al., 2005).

Várias pesquisas evidenciam a contaminação de leite e derivados por micro-organismo patogênicos e deteriorantes. Pesquisas publicadas no Brasil têm revelado a baixa qualidade microbiológica do leite e queijos comercializados, caracterizados pela frequente contaminação por coliformes totais, termotolerantes, *Eschechia coli*,

Staphylococcus aureus, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. (SOUSA et al., 2014; Duarte et al., 2005; SALOTTI et al., 2006).

A quantidade e os tipos de micro-organismos presentes nos alimentos podem ser utilizados para avaliar com segurança a qualidade microbiológica dos mesmos. A segurança é determinada pela ausência ou presença de micro-organismos patogênicos ou suas toxinas, a quantidade do inóculo, e o tempo de controle ou destruição desses agentes. Testes para organismos indicadores podem ser usados também para avaliar a qualidade microbiológica ou segurança quando há uma relação entre a ocorrência de um organismo indicador e a provável presença de um patógeno ou toxina por ele produzida (DOYLE et al., 1997; NERO et al, 2008;).

Micro-organismos indicadores da qualidade nos alimentos são organismos marcadores, cuja presença indica a possível presença de um patógeno ecologicamente similar. São grupos ou espécies que podem fornecer informações sobre ocorrência de contaminação de origem fecal, provável presença de patógenos ou a deterioração potencial do alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento (FORSYTHE, 2002).

A contagem em placas de bactérias mesófilas é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos. Assim, mesmo que os patógenos estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações organolépticas no alimento, quando estão presentes em números elevados no alimento, poderão causar a deterioração e a redução da vida de prateleira. No caso do leite, contagens elevadas desse grupo de bactérias pode indicar abuso durante o armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura. Além disso, todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas. Portanto, uma alta contagem indica que houve condições para que esses patógenos pudessem se multiplicar (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Com relação aos coliformes, utiliza-se este grupo para avaliar as condições de higiene, limpeza e sanitização. A presença de um número considerável de coliformes termotolerante em alimentos processados pode indicar processamento inadequado ou recontaminação pós-processamento, devido a equipamentos sujos ou manipulação sem cuidados de higiene (SIQUEIRA, 1995; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Staphylococcus aureus são habitantes naturais das cavidades nasais e da pele de animais de sangue quente, o que possibilita sua larga distribuição na natureza. Desta

forma, podem ser transmitidos aos alimentos através da matéria-prima (ex. leite de animal com mastite), do ambiente de processamento (ex. biofilmes em superfícies) ou por manipulação humana durante o preparo (KLUYTMANS; WERTHEIM, 2005). Essa bactéria não é resistente ao calor, sendo destruída na pasteurização ou na cocção de alimentos. Entretanto, suas toxinas, são termorresistentes, suportando até mesmo a esterilização de alimentos de baixa acidez. A contaminação de queijos pode causar vários surtos de origem alimentar, tanto quando se utiliza leite cru como depois da pasteurização e, nesse caso, pode ocorrer contaminação pós-processamento ou utilização de coalho contaminado por *S. aureus* (SILVA et al., 2010). Essa bactéria tem sido apontada como causadora dos principais problemas de saúde pública relacionados ao consumo de queijo (MACHADO et al., 2011).

3.4 Bactérias ácido-láticas

As bactérias ácido-láticas estão amplamente distribuídas na natureza e predominam na microbiota de alimentos ricos em carboidratos, proteínas e vitaminas, como leite, queijo, carne, frutas e vegetais, podendo ainda ser isolados de solos, água, plantas, silagens, esterco, esgoto, sendo também encontradas nos tratos intestinal, respiratório superior e urogenital inferior de animais, assim como na pele e mucosa de animais e humanos (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000; SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

Muitas espécies possuem papel essencial na fermentação de laticínios e são frequentemente usadas como culturas iniciadoras na produção de queijos (FOX et al., 2000). Seu grupo inclui bastonetes e cocos, Gram positivos, aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos, inativadas a temperaturas superiores a 70 °C, compreendendo 12 gêneros de bactérias: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Bifidubacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus*; com mais de 530 espécies e subespécies na qual, os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* formam a essência do grupo (EUZÉBY, 2010; MOGENSEN, 2003).

Nos alimentos, uma das funções das bactérias lácticas é a acidificação dos produtos alimentares em um pH próximo de 4, impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis pela produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico. Essas bactérias contribuem positivamente na qualidade organoléptica dos produtos

lácteos, sendo encontradas naturalmente no leite cru. No queijo, comumente encontra-se BAL do gênero *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Essas bactérias são utilizadas como culturas iniciadoras em alimentos fermentados, possuem ação probiótica e são conhecidas pela produção de várias substâncias antimicrobianas (HOLZAPFEL et al., 2006; ORTOLANI, 2009). O conhecimento sobre a população microbiana láctea endógena presente nos produtos lácteos, ajuda na prevenção da perda da biodiversidade presente nos queijos produzidos por diferentes métodos típicos das tradições locais e regionais.

As BAL são as únicas bactérias desprovidas de catalase que conseguem crescer em condições aeróbias. A catalase é uma enzima que degrada o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A incapacidade deste micro-organismo em degradar este composto, deve-se ao fato de não sintetizarem grupos porfirínico, como exemplo o heme. Apesar de serem incapazes de sintetizar ATP por meios respiratórios, as BAL não têm seu crescimento afetado pela presença ou ausência de ar (AXELSSON et al., 2004).

As BAL são estritamente fermentadoras e desprovidas de citocromos, obtendo energia através da fermentação, mas precisamente por fosforilação ao nível de substrato. Através da fermentação de hidratos de carbono, produzem ácido lático como principal ou único produto do seu metabolismo fermentativo da glicose (MAYO et al., 2010; AXELSSON, 2004).

Devido à biodiversidade das bactérias ácido lácticas (BAL) endógenas do leite, queijos produzidos com leite cru apresentam aroma e sabor mais intensos do que os produzidos com leite pasteurizado (FRANCIOSI et al., 2009). Desta forma, a biodiversidade de BAL autóctones ou não iniciadoras é considerada fator principal dessa grande diferença sensorial (GARABAL et al., 2008).

A microbiota autóctone também é considerada o principal fator capaz de reduzir a contaminação microbiana em leite e derivados, a qual é composta de forma significativa por bactérias lácticas, relatadas como responsáveis pela inibição de outros micro-organismos (ORTOLANI, 2009). Devido a sua vasta utilização em produtos fermentados tradicionais, as BAL possuem o estatuto GRAS (*Generally Recognized As Safe*) concedido pela *American Food and Drug Agency* (FDA) (AMMOR et al., 2007).

Vários trabalhos verificam a contaminação de leites e derivados por micro-organismo indicadores de higiene, mas não evidenciam contagens de micro-organismos

patogênicos, como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. (NERO et al, 2008; DHANASHREE et al, 2003; JAY, 1995). Outros pesquisadores afirmam que quando a qualidade microbiológica melhora os patógenos serão facilmente detectados. Isto sugere que a microbiota natural interfere no desenvolvimento de patógenos, pois estes são maus competidores e sensíveis às variações do meio, possivelmente provocada pela acidificação deste pela ação das BAL nativas presentes e ainda, de outros interferentes, como compostos antimicrobianos produzidos por estas (ORTOLANI, 2009; OLIVER et al., 2005).

A identificação da capacidade de produção de substâncias antimicrobianas por bactérias lácticas pode ser considerada uma etapa importante em estudos sobre potencial probiótico e na bioconservação. Em complementação, vários outros fatores e características devem ser detalhadamente estudados a fim de viabilizar a sua utilização pela indústria de alimentos, como a sobrevivência no alimento alvo e a capacidade de competir com a microbiota natural do alimento (DEEGAN et al., 2006; CHEN; HOOVER, 2003). A princípio, o próprio alimento a partir do qual a cepa de bactéria láctica foi isolada seria a melhor escolha para sua aplicação, devido à maior facilidade de adaptação e de produção de bacteriocinas, capacidade de competição com a microbiota do alimento sem aumentar sua taxa de deterioração, bem como sensibilidade aos diferentes tipos de processamento utilizados pela indústria (RODRÍGUEZ et al., 2000; SMACCHI; GOBBETTI, 2000).

As BAL têm elevado sua importância na indústria de alimentos e na saúde pública nos últimos anos, devido ao seu potencial antagonista contra micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Para esses fins, as BAL naturalmente presentes no leite, são os micro-organismos mais utilizados como transformadores e bioprotetores. A identificação e caracterização de culturas de BAL, com esse potencial, viabilizam sua utilização como ferramentas de segurança alimentar e bioconservação, uma vez que dependendo das espécies identificadas e substâncias antimicrobianas produzidas, podem apresentar um efeito inibitório amplo contra micro-organismos patógenos e deteriorantes. Além disso, sua capacidade de adaptação e desenvolvimento nos produtos beneficiados é facilitada, o que permite a expressão de seu potencial antimicrobiano. Dessa forma, BAL específicas isoladas de leite e derivados podem ser ferramentas úteis de segurança alimentar (ASTERI et al., 2010; ORTOLANI, 2009).

Lactococcus

Os *Lactococcus* são os micro-organismos mesófilos mais usados para a produção de ácido nas fermentações lácteas, em razão da capacidade de converter rapidamente a lactose em ácido láctico. São capazes de crescer a 10 °C, mas não a 45 °C e em pH ótimo de 6,0–6,5, que são características importantes usadas na sua identificação. Na temperatura entre 20 °C e 30 °C, os lactococos levam de 10 horas a 20 horas para fermentar o leite cru. O número aproximado de células viáveis necessárias para realizar a coagulação ácida do leite é de 10^8 /mL (TEUBER, 1995).

Esses micro-organismos são predominantes em queijos frescos que não sofrem cozimento da massa, sua presença é reduzida durante o processo de cura, podendo até desaparecer após seis a oito semanas (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000).

Leuconostoc

As bactérias deste gênero apresentam crescimento lento, propriedade acidificante fraca e temperatura ótima de crescimento na faixa de 20-30°C, sendo facilmente distinguidas de outras BAL devido ao seu metabolismo heterofermentativo (FOX et al., 2000).

Apesar de sua pequena habilidade acidificante e proteolítica, o *Leuconostoc* spp. é usado nos produtos lácteos, junto aos lactococos, como microrganismo aromatizante. A produção de diacetil, CO₂ e acetoína a partir do citrato é responsável pela qualidade organoléptica, consistência, textura e formação de olhaduras em queijos (HASSAN; FRANK, 2001).

Lactobacillus

As bactérias deste gênero são as mais tolerantes ao meio ácido. No leite, iniciam o crescimento, preferencialmente, em pH próximo de 5,5–6,2, reduzindo-o para valores abaixo de 4,0 (HASSAN; FRANK, 2001). É o gênero de BAL de maior diversidade e com uma filogenia complexa.

Do ponto de vista metabólico, os *Lactobacillus* podem ser divididos em três subgrupos denominados *Thermobacterium*, *Streptobacterium* e *Betabacterium* (JAY,

1994; VANDAME et al.,1996). No primeiro grupo estão os lactobacilos termofílicos homofermentativos obrigatórios, no segundo estão os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos facultativos e no terceiro grupo estão os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos obrigatórios.

Os *Lactobacillus* fazem parte da microbiota de vários alimentos fermentados, como queijo, iogurte, kefir, salame, polvilho, azeitonas, pickles, molhos ácidos e vinhos. Devido a sua capacidade acidificante, melhoria de sabor e textura, e por garantirem a qualidade nutritiva é reconhecido como micro-organismos seguro para serem utilizados em alimentos (BARBÉS, 2008).

Enterococcus

O gênero *Enterococcus* inclui mais de 20 espécies, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as duas mais frequentes em alimentos. Esses microrganismos sobrevivem a condições adversas, como pH, temperaturas e salinidade extremas (CARIDI et al., 2003).

Nos queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, os enterococos advêm da matéria-prima ou do ambiente, variando conforme as condições de higiene do processo e da época do ano. A presença desses microrganismos em queijos produzidos com leite pasteurizado ocorre por causa da sua capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura (10 °C–45 °C) e à sua resistência a altas temperaturas.

Streptococcus

Streptococcus thermophilus é a única espécie do gênero utilizada nas fermentações lácteas sendo amplamente utilizada como cultura iniciadora para a produção de iogurtes, queijos e leites fermentados (HASSAN; FRANK, 2001).

Essa bactéria fermenta a lactose em ácido lático, causando uma rápida diminuição do pH, e a produção de metabólitos com propriedades tecnológicas importantes, como exopolissacarídeos e bacteriocinas (DELORME, 2008). Esta espécie pode ser diferenciada das demais pela resistência ao aquecimento, pois cresce bem a 45°C e também a 52°C, conseguindo sobreviver ao aquecimento de 60°C por 30

minutos (HARDIE; WHILEY, 1995). A maior parte dos produtos lácteos submetidos a temperaturas elevadas durante a fermentação é acidificada pelo crescimento combinado de *S. thermophilus* e *Lactobacillus spp* (CARVALHO, 2007).

3.4. 1. Propriedades antimicrobianas das bactérias lácticas

As bactérias lácticas são capazes de produzir substâncias que possuem efeito inibitório no crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Este efeito deve-se principalmente, à produção de ácidos orgânicos e ácido lático, que ocasionam a redução de pH do ambiente. Essas bactérias produzem ainda acetoaldeído, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, polissacarídeos e bacteriocinas, que podem agir como antimicrobianos (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; RODRÍGUEZ et al., 2003; HERREROS et al., 2005).

A atividade antagonista de BAL sobre outros micro-organismos ocorre por diversos mecanismos, como sensibilidade às interações microbianas, competição por nutrientes e sítios de adesão e produção de substâncias inibitórias potencialmente letais (ORTOLANI, 2009). Estas bactérias podem sintetizar no ribossomo, peptídeos antimicrobianos, denominados bacteriocinas, que possuem ação antimicrobiana e eficiência em baixa concentração (10 mg/Kg). Além disso, estas substâncias não alteram a qualidade sensorial do produto. A utilização de culturas lácticas produtoras destes compostos, surge como uma alternativa para aumentar a segurança de produtos fermentados (TAMANINI, 2008).

Esses peptídeos são de grande interesse na indústria de alimentos como conservadores naturais e possíveis substitutos de conservantes químicos. A capacidade das bactérias lácticas produzirem esses compostos faz com que estas bactérias tenham um importante papel biológico. No entanto, a natureza precisa de como este papel é exercido tem sido tema de intensas pesquisas (DEEGAN et al., 2006). De maneira geral, as bacteriocinas apresentam efeito bactericida decorrente da lise celular, podendo também apresentar um efeito bacteriostático (DALIÉ et al., 2010).

É crescente o número de estudos conduzidos sobre bacteriocinas, indicando que sua aplicação em alimentos pode trazer uma série de benefícios, tais como extensão da vida de prateleira, proteção extra durante condições adversas de temperatura, diminuição do risco de transmissão de microrganismos patogênicos na cadeia de

alimentos, redução da necessidade de aplicação de conservantes químicos e possibilidade de uso de tratamentos térmicos mais brandos. A eficiência protetora de culturas bacteriogênicas vem sendo estudada principalmente em carnes e em produtos lácteos (DEVLIGHERE et al., 2004; GÁLVEZ et al. 2007).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMOR, M.S., FLÓREZ, A.B., MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 24, p. 559–570, 2007.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- AXELSSON, L.T. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. New York, Marcel Dekker, 2004. p. 1-72.
- BARBÉS, C. 2008. Lactobacilli. In: VERSALOVIC, J., WILSON, M. **Probiotics and Related Strategies**. Washington, ASM Press, 2008. p. 19-33.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **Internacional Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30 de 26/06/ 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga de terra ou manteiga de garrafa, queijo de Coalho e queijo de manteiga **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p.13-15, 16 jul. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, coleta e Transporte de Leite. Brasília; 2002. 48p.
- BRASIL. Portaria no 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.
- BRUNO, L. M; CARVALHO, J. D. G. **Microbiota láctica de queijos artesanais** – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009.
- CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 2, p. 201-209, 2003.
- CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 2007.

- CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J. ; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L. O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura lática endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 205-214, 2007.
- CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology Handbook: The microbiology of milk and milk products**. 3. ed. New York: John Wiley and Sons, 2002. p.39-90.
- CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; PELCZAR, M. J. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, segunda edição - São Paulo: Makron books, 1996.
- CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews, Food Science and Technology*, v. 2, p. 82-100, 2003.
- DEEGAN, L. C.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058-1071, 2006.
- DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p. 274-277, 2008.
- DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 2º edição - Washington: Editora , 1997.
- DUARTE, D.A.M.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SILVA, J.V.D.; DA MOTA, R.A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênicosanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.72, p.297-302, 2005.
- DÜRR, J.W. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite: uma oportunidade única. In: DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. (Ed.). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, 2004. p. 38-55.
- EMBRAPA – Gado de leite. Disponível em:<www.cnp.gl.embrapa.br>. Acesso em: 14 ago. 2011.
- EMBRAPA, (2008) Empresa Brasileira de Agropecuária. Estatísticas do leite. Disponível em <http://www.embrapa.gov.br/produção> [nov 2008]
- ESCOBAR, C. A. M; LEUTHIER, S. F. Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de coalho em Pernambuco. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 248-256, 2001.
- EUZÉBY, J.P. 2010. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/index.html>>. Acesso em 10 de julho de 2013.
- FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e micro-organismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 162-165, 2003.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: 2001. 175 p.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

- FORTINA, M. G.; RICCI, G.; ACQUATI, A. et al. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. **Food Microbiology**, v.20, p.397-404, 2003.
- FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000.
- FRANCIOSI, E.; SETTANI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. (2009) Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's Milk. **Internacional Dairy Journal**, v. 19, p. 3 – 11, 2009.
- FRANCO, B.D.G.M.F; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.
- GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food microbiology** v.120, p.51- 70, 2007.
- GARABAL, J. I.; ALONSO, P. R.; CENTEN, J. A.; Characterization of acid lactic bacteria isolated from raw cow's milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). **LTW – Food Science and technology**, v. 41, n.8, p. 1452-1458, 2008.
- GERMANO P.M.L.; GERMANO M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 3. ed. 2008. 986 p.
- GONZÁLEZ, L.; SANDOVAL, H.; SACRISTÁN, N.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Control**, v. 18, n. 6, p. 716 – 722, 2006.
- GRAAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p. 751-871, 1997.
- HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. The genus *Streptococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Ed.). **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2.
- HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. (Ed.). **Applied Dairy Microbiology**. 2. ed. New York: Marcel Decker, 2001.
- HOORDE, K. V.; LEUVENC, I. V.; DIRINCK, P.; HEYNDRICKX, M.; COUDIJZER, K.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. **International Journal of Food Microbiology**. v. 144, p. 226–235, 2010.
- JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**, Ed. Artmed – Porto Alegre, 2009.
- KLUYTMANS, J. A. J. W.; WERTHEIM, H. F. L. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. **Infection**, v. 33, n. 01 p. 3-8, 2005.
- LIMA, C.; LIMA, L., CERQUEIRA, M.; FERREIRA, E.; & ROSA, C. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n. 1, p. 266-272; 2009.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.

MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANSEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 213-222, 2003.

MADRAU, M. A.; MANGIA, M. A.; MURGIA, N. P.; SANNA, M. A.; GARAU, M. G.; LECCIS, G.; CAREDDA, M.; DEIANA, P. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 876 – 885, 2006.

MAYO, B.; ALEKSANDRZAK – PIEKARCZYK, T., FERNANDÉZ, M., KOWALCZYK, M., ÁLVAREZ - MARTÍN, P., BARDOWSKI, J. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: MOZZI, F., RAYA, R.R., VIGNOLO, G.M. (Eds.), **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. Blackwell Publishing, USA, 2010. p. 3-33.

MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J. Food microorganisms - health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.377, p.4-9, 2003.

MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N.; YAMAZI, A. K. ; ORTOLANI, M. B. T.; NERO, L. A. (2009) Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 2, p. 245-249, 2009.

NASCIMENTO, M. DA S. **Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo minas frescal**. 2007. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, SP.

NASSU, R.T.; LIMA, J.R.; BASTOS, M.S.R.; MACEDO, B.A.; LIMA, M.H.P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará. **Higiene alimentar**, v.15, n.89, p.28-36, 2001.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R. DE; BARROS, M.A. F.; ORTOLANI , M. B. T.; BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses Public Health**, v. 55, p. 299–305, 2008.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 211-215, 2004.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.

NERO, L.A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção.**

2005. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

NESPOLO, C. R. **Características microbiológicas e físico-químicas durante o processamento de queijo de ovelha**. 2009. 200f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido-láticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: isolamento de culturas bactericínogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2009.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, nº 2, p. 293-300, 2004.

ROCHA, J. S.; BURITI, S. M. I. Condições de procedimento e comercialização de queijo Minas Frescal. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

RODRÍGUEZ, E.; GONZÁLEZ, B.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 7-15, 2000.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.2, p.171-175, 2006.

SANTOS, A. F. R.; RODRIGUES, M. A. M. Resíduos inibidores em leite UHT. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104, p. 174-175, 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n.1, p. 43-56, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. ; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 4ª ed. São Paulo: Varela. 2010.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos – CTAA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, 1995.

SOUSA, A. Z. B.; ABRANTES, M. R.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; LIMA, P. O.; LIMA, R. N.; ROCHA, M. O. C.; PASSOS, Y. D. B. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.1, p. 30-35, 2014.

TEUBER, M. Microbiological problems facing the dairy industry. **International Dairy Federation**, p.6-9, 1992.

TEUBER, M. The genus *Lactococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Ed.). **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995. v. 2.

VANDAME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.
Polyphasic taxonomic, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v.60, n.2, p. 407-438, 1996.

5. CAPÍTULO II – ARTIGO submetido a revista Semina: Ciências Agrárias.

Atividade antagonista contra *Eschechia coli* e *Staphylococcus aureus* de bactérias láticas isoladas de leite e queijo coalho do semiárido brasileiro

Antagonist activity against *Eschechia coli* and *Staphylococcus aureus* of lactic acid bacteria isolated from milk and cheese curd of the Brazilian semiarid

RESUMO

Bactérias ácido-láticas (BAL) fazem parte da microbiota endógena de leite e derivados. Além da acidificação do meio, melhoria em suas qualidades organolépticas e sensoriais, são atribuídas a essas bactérias as características de inibir micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Conhecer a população microbiana dos alimentos contribui na sua qualidade e na melhoria dos processos de produção. Com o objetivo de avaliar a microbiota autóctone de leite e queijo coalho produzidos no semiárido do Brasil, avaliar as bactérias láticas presentes e o efeito antimicrobiano destas estirpes, foram analisadas 23 amostras, sendo 12 de leite bovino cru e 11 de queijo coalho, submetidas a análises microbiológicas, isolamento e caracterização de bactérias láticas e teste de antagonismo frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Eschechia coli* ATCC 25922. Foram obtidas 56 cepas de BAL, das quais 29 (51,78%) foram oriundas das amostras de leite e 27 (48,22%) das amostras de queijo coalho. Do total, 36 (64,3%) isolados de BAL demonstraram atividade antagonista contra os micro-organismos indicadores. Os maiores halos de inibição observados foram obtidos pelo isolados das amostras de leite frente a *E. coli*. As cepas de BAL demonstraram efeito inibitório positivo frente aos micro-organismos testados, evidenciando seu potencial tecnológico e sua possível utilização como bioconservantes em alimentos, reduzindo a microbiota indesejada.

Palavras-chave: alimento; microbiota natural; antagonismo lático.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are part of the endogenous microbiota of milk and dairy products. Besides the acidification of the environment, improvement in their organoleptic and sensorial qualities are allocated to the features of these bacteria inhibit spoilage and pathogenic microorganisms. Knowing the microbial population of food contributes to their quality and improving production processes. In order to assess the indigenous microbiota of milk and curd cheese produced in the semiarid region of Brazil, to evaluate the lactic acid bacteria and the antimicrobial effect of these strains, 23 samples were analyzed, 12 of raw cow's milk and 11 of cheese curd, submitted will

microbiological analysis, isolation and characterization of lactic acid bacteria and antagonism test front *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Eschechia coli* ATCC 25922. Were obtained 56 strains of LAB, of which 29 (51.78%) were derived from milk samples and 27 (48.22%) of cheese curd samples. Of the total, 36 (64.3%) isolated from LAB showed antagonistic activity against microorganisms indicators. The larger zones of inhibition observed were isolated from samples of milk against *E. coli*. The strains of LAB showed positive inhibitory effect against the tested microorganisms, highlighting their technological potential and their possible use as biopreservatives of food, reducing unwanted microbiota.

Keywords: food; natural microbiota; lactic antagonism.

INTRODUÇÃO

Dentre os fatores capazes de reduzir a contaminação microbiana em leite e derivados, a microbiota autóctone é considerada o principal fator, a qual é composta de forma significativa por bactérias lácticas (ORTOLANI, 2010). Estas contribuem positivamente na qualidade organoléptica dos produtos lácteos, sendo encontradas naturalmente no leite cru e como constituintes predominantes da microbiota de queijos.

O conhecimento sobre a população microbiana láctica endógena dos produtos lácticos, ajuda na prevenção da perda da biodiversidade presente nos queijos produzidos por diferentes métodos típicos das tradições locais e regionais. Essa microbiota pode variar muito de uma região para outra, em decorrência das condições geográficas e climáticas da região na qual o produto é produzido (HOLZAPFEL et al., 2006; ORTOLANI, 2010).

A fermentação de alimentos por bactérias produtoras de ácido láctico é uma das mais antigas formas de biopreservação praticada pelo homem. Na produção queijeira, estas bactérias estão relacionadas com a produção do ácido láctico que, acelera a coagulação do leite, auxiliando na sinérese do soro, contribuindo ainda para o sabor, corpo e textura do produto final (AWAD et al., 2007). Durante o fabrico e maturação do queijo, a composição da microbiota láctica sofre várias alterações, de acordo com as modificações das condições ambientais, que frequentemente fornecem estresse celular, como choque térmico, pH adversos, redução do potencial de oxido-redução, diminuição da atividade da água e exaustão dos nutrientes (DI CAGNO et al., 2006).

Comparando produtos fabricados a partir de leite cru e os que utilizam leite pasteurizado e o uso de fermento láctico comercial para produção de queijos, é notório que o processamento ocasiona perdas nas características típicas dos diversos queijos. A

fim de reduzir esse problema, tem-se buscado selecionar cepas autóctones do leite cru e de queijos artesanais, de modo a obter fermentos lácticos especificamente preparados para adição ao leite termicamente tratado e destinado a produção de queijo (MACEDO et al., 2004; MARINO et al., 2003).

Estudos demonstram a importância do uso destes micro-organismos lácticos, isolados de leite e queijos, também na preservação de alimentos e no controle de patógenos como *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e bactérias do grupo coliforme (ALEXANDRE et al., 2002; CARIDI, 2003; HERNANDEZ et al., 2005). Reis e colaboradores (2012) demonstraram que o uso de BAL em produtos lácteos e cárneos para a conservação de alimentos pode melhorar a otimização e a garantia da qualidade dos produtos alimentícios.

O antagonismo bacteriano tem sido reconhecido há mais de um século, mas nos últimos anos têm recebido mais atenção científica, nomeadamente pela utilização de várias culturas de bactérias ácido lácticas, ou dos seus produtos, para controlar bactérias patogênicas ou deteriorantes. Apesar da expressiva produção de leite e derivados, estudos desta natureza são escassos na região semi-árida. Sendo assim objetivou-se avaliar a microbiota autóctone de leite e queijo coalho produzidos no semiárido do Brasil, a caracterização das bactérias lácticas e o efeito antimicrobiano destas estirpes isoladas.

Material e Métodos

Amostragem

Foram analisadas 23 amostras, sendo 12 de leite bovino cru e 11 de queijo coalho, oriundas da região semiárida do nordeste brasileiro. As amostras foram adquiridas de produtores rurais e de usina de beneficiamento, estas foram coletadas em recipiente estéril, acondicionadas em caixas isotérmicas até a realização das análises microbiológicas. O tempo decorrido entre a coleta e o início das análises foi inferior a 1 hora.

Análises microbiológicas

Nas análises microbiológicas do leite, foram utilizados 25 mL de cada amostra, já para o queijo foram pesadas assepticamente 25 g de cada amostra, as quais foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada 0,1%, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} ,

a partir da qual foram obtidas as demais diluições decimais até 10^{-4} . Em seguida, as amostras foram submetidas às técnicas recomendadas para contagem de bactérias mesófilas, contagem de *Staphylococcus* spp., Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes de acordo com as recomendações da Instrução Normativa Nº 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003) e isolamento e caracterização de bactérias lácticas.

Para o isolamento das bactérias lácticas das amostras de leite e queijo coalho, foi utilizada a técnica de semeadura em superfície, em meio de cultura Agar Man, Rogosa e Sharpe (Himedia®), para tanto foi subcultivado 0,1 mL das diluições seriadas, em duplicata. As placas foram incubadas por 48 horas a $30 \pm 2^\circ \text{C}$. As colônias crescidas foram isoladas por método de esgotamento em novas placas de petri, com meio de cultura Agar MRS. Em seguida, os isolados obtidos foram submetidos à coloração de Gram, prova da catalase e teste de antagonismo, como demonstrado no fluxograma abaixo (figura 1).

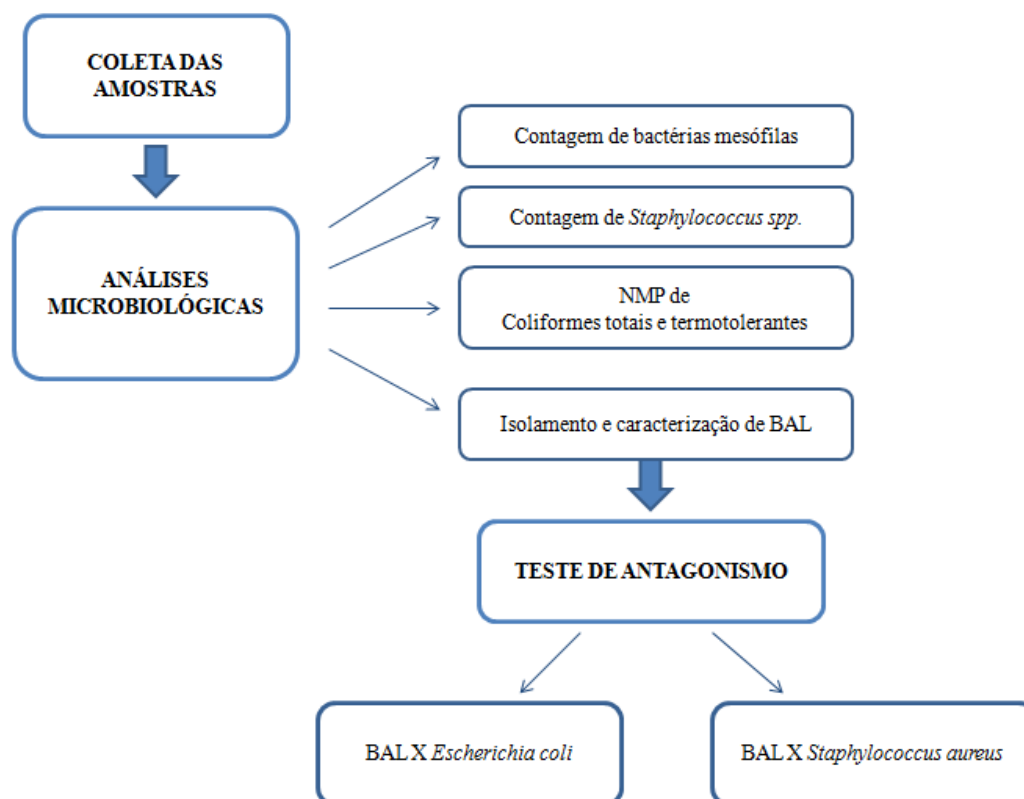


Figura 1. Fluxograma das análises realizadas no estudo.

Atividade Antagonista

Os isolados purificados, que foram identificados como Gram-positivos e catalase negativa, foram transferidos para caldo MRS e cultivados a 35° C por 18-24 h, para então ser realizada a determinação da atividade antagonista. O teste da gota (*spot-on-the-lawn*) proposto por Jacobsen et al. (1999) foi utilizado para determinar o potencial inibitório deste isolados, frente a linhagens de referência de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Uma alíquota de 5µL de cada cultivo, em caldo MRS, foi inoculada, em forma de gotas, em placas contendo ágar MRS. Após absorção das gotas, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Decorrido este período, cada placa recebeu uma sobre camada de 10 mL de ágar BHI contendo aproximadamente 10^6 UFC.mL⁻¹ da cultura de referência, citada anteriormente, previamente cultivada em caldo BHI por 24 h. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas, a 35 °C por 24 h. O resultado positivo para atividade antagonista em relação à cultura de referência foi determinado pela formação de halo de inibição. O diâmetro dos halos foi medido em milímetros utilizando um paquímetro.

Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva e não paramétrica. A comparação entre as médias foi feita pelo teste Kruskal-Wallis (P=0,05).

Resultados e Discussão

As contagens microbianas médias, para bactérias mesófilas (BM), *Staphylococcus* spp. (SS), coliformes totais (CT) e coliformes termotolerantes (CTM) das amostras de leite e queijo estão sumarizadas na Tabela 1. Nas amostras de leite as contagens bacterianas variaram de 5,13 a 7,63 log UFC/ml para BM, de 1,29 a 6,24 log UFC/ml para SS, 2,97 a 5,1 log UFC/ml para CT e de 2,97 a 5,1 log UFC/ml para CTM. Apenas 8% (1/12), uma amostra de leite bovino cru, apresentou contagem bacteriana reduzida, em relação a todos os micro-organismos analisados. Já nas amostras de queijo, as contagens bacterianas variaram de 4,92 a 7,26 log UFC/g para BM, de 3,23 a 7,30 log UFC/g para SS, de 3,10 a 5,10 log UFC/g para CT e 2,87 a 4,46 log UFC/g para CTM.

Tabela 1. Contagem microbiana logarítima (log UFC/g ou ml) de bactérias mesófilas, *Staphylococcus* spp., coliformes totais e termotolerantes em amostras de leite cru e queijo coalho, utilizadas para isolamento das BAL.

BACTÉRIAS	LEITE	QUEIJO COALHO
Mesófilas	6,40 ± 0,53	5,72 ± 0,94
<i>Staphylococcus</i> spp.	5,24 ± 1,38	5,37 ± 1,60
Coliformes totais	4,32 ± 1,43	4,67 ± 0,63
Coliformes termotolerantes	4,15 ± 1,41	3,61 ± 0,67

Na produção de derivados lácteos, a microbiota reflete as características da matéria-prima, bem como as condições de higiene do processo. Segundo Cavalcante et al. (2007) a diversidade microbiana indesejada encontrada em queijos é proveniente do próprio leite e também das condições higiênico-sanitárias às quais é submetido. O resultado das contagens de BM, SS, CT e CTM obtidas foram elevadas, o que sugere possível negligência durante a obtenção da matéria-prima e produção do queijo, que envolvem desde a saúde do animal, a qualidade da matéria-prima, processamento, manipulação, distribuição e armazenamento do produto.

Foram isoladas 56 cepas de BAL, das quais 29 (51,78%) oriundas das amostras de leite e 27 (48,22%) das amostras de queijo coalho. Do total, 36 (64,3%) isolados de BAL demonstraram atividade antagonista contra os micro-organismos indicadores *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Eschechia coli* ATCC 25922. Dos isolados de leite 38% (11/29) foram capazes de inibir *S. aureus* e 44,9% (13/29) inibiram *E. coli*. Já para os isolados de queijo foi observado um maior efeito inibitório, onde 70,4% (19/27) foram capazes de inibir *S. aureus* e 63% (17/27) inibiram *E. coli*, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Potencial inibitório dos isolados de BAL de leite bovino e queijo coalho frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Eschechia coli* ATCC 25922.

56 isolados	<i>S. aureus</i>		<i>E. Coli</i>	
	Sensível	Inibitório	Sensível	Inibitório
BAL leite 29 (51,78%)	18 (62%)	11 (38%)	16 (55,1%)	13 (44,9%)
BAL queijo 27 (48,22%)	8 (29,6%)	19 (70,4%)	10 (37%)	17 (63%)

Segundo Machado et al. (2011) o queijo é um alimento no qual as BAL constituem a microbiota predominante e onde o *S. aureus* é propenso a desencadear problemas de saúde pública. Resultados similares foram encontrados por Guedes Neto et al. (2005) ao avaliar a atividade antagonistas “in vitro” de BAL isoladas de queijo de coalho artesanal e industrial frente a diversos micro-organismos, constatando que todos os *Lactobacillus* spp. testados eram capazes de inibir as cepas de *Staphylococcus* spp. e *E. coli*.

O maior halo de inibição para *S. aureus* foi 21,5 mm, enquanto que para *E. coli* foi de 26,5 mm, ambas isoladas de amostras de leite cru. A amostra da qual foi obtido o isolado que apresentou maior halo de inibição, foi a única que apresentou contagem reduzida para SS, e não foram detectados CT e CTM. Os resultados das inibições de patógenos de referência pelos microrganismos isolados (Tabela 3) demonstraram variação com relação aos diâmetros dos halos de inibição.

Tabela 3. Atividade inibitória (média dos halos de inibição em mm) obtidos com os isolados de BAL de leite bovino e queijo coalho frente a patógenos de referência

Micro-organismo	BAL leite	BAL queijo
<i>S. aureus</i>	14,64 ± 4,55 ^a	14,21 ± 7,22 ^a
<i>E. Coli</i>	15,96 ± 6,37 ^a	12,22 ± 3,77 ^b

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças entre si (P<0,05).

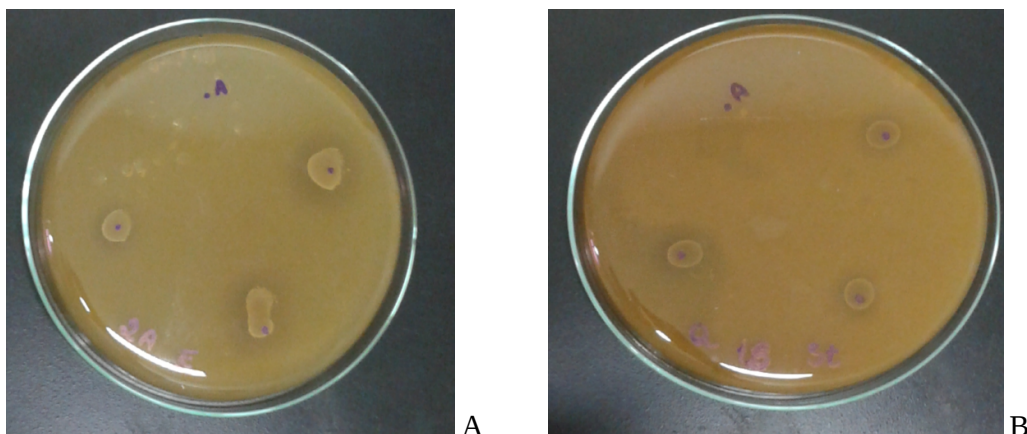


Figura 2. Inibição de *E.coli* (A) e inibição de *Staphylococcus aureus* (B) observadas no experimento.

Verificou-se maiores halos de inibição contra *E. coli* nas BAL isoladas de leite, não sendo observada diferença significativa para a ação antagonista frente ao *S. aureus*. Apesar de não ter identificado a natureza das substâncias antagonistas produzidas pelas culturas das BAL estudadas, as atividades inibitórias verificadas justificam-se pela produção de substâncias inibidoras, entre elas ácidos orgânicos (como ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas que teriam se difundido pelo ágar, impossibilitando o crescimento dos micro-organismos indicadores. A mesma evidência foi constatada por Guedes Neto et al. (2005).

As BAL isoladas apresentaram potencial para uso no controle de patógenos, principalmente em queijo artesanal, já que poderiam atuar como barreiras na proliferação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Outros estudos relatam a atividade antagonista de BAL, Tamanini et al. (2012) frente à *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, Alexandre et al. (2002) contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. inócu*a e *S. enterica* sorovar *typhimurium*, Hermanns et al. (2013) antagonismo a *E. coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 7466, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901 e *Salmonella typhimurium* ATCC 13076. Resultados que corroboram para o potencial uso da microbiota lática endógena de leite e queijo como potenciais cultivos iniciadores antimicrobianos. Apesar dos estudos identificarem este efeito, ainda é necessário estudar formas de viabilizar e potencializar este efeito durante a vida útil do alimento.

Conclusão

A microbiota autóctone de leite cru e queijo coalho da região semiárida do Brasil apresenta BAL com potencial tecnológico. As cepas de BAL isoladas são capazes de

inibir o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis em alimentos, as quais 70% produziram efeito inibitório contra *S. aureus*. Demonstrando a relevância da microbiota autóctone e sua possível aplicação como culturas iniciadoras em derivados lácteos.

Agradecimentos

A Capes pelo suporte financeiro e aos produtores rurais que contribuíram para essa pesquisa.

Referências

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p.424-428, 2002.

AWAD, S.; AHME, N.; SODA, M. Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras cheese ripening and flavour development. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1192–1199, 2007.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

CARIDI, A. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes'cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, v.13, n.02/03, p. 191-200, 2003.

CAVALCANTE, J. F. M. ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L. O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 205-214, 2007.

DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M., LIMITONE, A.; FOX, P.F.; GOBBETTI, M. Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 4503–4514, 2006.

GUEDES NETO L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p. 245-250, 2005.

HERMANN, G.; FUNCK, G. D.; SCHMIDT, J. T.; RICHARDS, N. S. P. S. Isolamento e identificação de bactérias lácticas supostamente bacteriocinogênicas em leite e queijo. **Revista Acadêmica**, Ciênc. Agrár. Ambient., v. 11, n. 2, p. 191-196, 2013.

HERNANDEZ, D.; CARDELL, E.; ZARATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a

bacteriocin- like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 77-84, 2005.

HOLZAPFEL, H. W.; CHARLES, M. A. P.; FRANZ, W. L.; BACK, W.; DICKS, L. M.T. **The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus***. The Prokaryotes, p. 229-266, 2006.

JACOBSEN, C. N.; NIELSEN, V. R.; HAYFORD, A. E.; MØLLER, P. L.; MICHAELSEN, K. F.; PÆRREGAARD, A.; SANDSTRÖM, B.; TVEDE, M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, 1999.

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

MACEDO, A. C.; TAVARES, T.G.; MALCATA, F.X. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da estrela cheese. **Food Microbiology**, v. 21, p. 233-240, 2004.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. F.; PORTO, B. C.; SOUSA, C. T.; OLIVEIRA, F. E. M. Interferência da microbiota autóctone do queijo coalho sobre *Staphylococcus coagulase positiva*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 337-341, 2011.

MARINO, M; MAIFRENI, M.; RONDONINI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, p. 133-140, 2003.

ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N.; NERO, A. L. Microbiological Quality and Safety of Raw Milk and Soft Cheese and Detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with Antagonistic Activity Against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n. 2, p. 175-180, 2010.

REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food Engineering Reviews**, New York, v. 4, n. 2, p. 124–140, 2012.

TAMANINI, R.; BELOTI, V.; SILVA, L. C. C.; ANGELA, H. L.; YAMADA, A. K.; BATTAGLINI, A. P. P.; FAGANI, R.; MONTEIRO, A.A. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Eschechia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n.5, p. 1877-1886, set./out. 2012.