

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**POTENCIAL BACTERIOCINOGÊNICO E
PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS
ISOLADAS DE LEITE E QUEIJOS ARTESANAIS**

TESE DE DOUTORADO

Gislaine Hermanns

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**POTENCIAL BACTERIOCINOGENICO E PROBIÓTICO DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE
LEITE E QUEIJOS ARTESANAIS**

Gislaine Hermanns

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito para obtenção do título de doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards

Santa Maria, RS, Brasil
2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Hermanns, Gislaine

Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e queijos artesanais / Gislaine Hermanns.-2013.

100 p.; 30cm

Orientadora: Neila Silvia Pereira dos Santos Richards
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2013

1. Leite 2. Queijo 3. Bactérias ácido lácticas 4. Bacteriocinas 5. Probióticos I. Richards, Neila Silvia Pereira dos Santos II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos
Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de
Doutorado

**POTENCIAL BACTERIOCINOGÊNICO E PROBIÓTICO DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE E QUEIJOS
ARTESANAIS**

elaborada por
Gislaine Hermanns

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profª Drª Neila S.P.S. Richards
(Presidente/Orientadora)

Prof. Dr. Adriano Brandelli

Profª. Drª. Martha Bohrer Adaime

Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Profª. Drª. Luisa Helena Rychecki Hecktheuer

Santa Maria, 17 de junho de 2013.

*... Dedico,
Ao meu filho, Matheus,
amor da minha vida!!!*

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por iluminar os meus caminhos e me proporcionar grandes alegrias no momento certo de minha vida.

A minha família, alicerce de tudo. Sem esse suporte nada disso teria sido possível.

A minha querida mãe, Selia, uma pessoa maravilhosa, que em momento algum mediu esforços para me ajudar, cuidando do meu filho, com todo carinho.

Ao meu pai, Alcido, que se tornou o cozinheiro oficial lá de casa, me permitindo ter um tempinho a mais.

Ao meu irmão, Luciano, por torcer por mim e por auxiliar com as traduções.

Ao meu esposo, Marcos, que sempre me incentivou e me acompanhou.

Ao meu filho, Matheus, que mesmo ainda muito pequeno, conseguiu me transmitir serenidade e força para continuar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, por me oportunizar a realização deste trabalho, em especial a minha orientadora, professora Dra Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, exemplo de profissional e pessoa que é.

À Secretaria de Ciência, Inovação e Desenvolvimento Tecnológico do RS pelo financiamento para realização deste trabalho.

A Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ, por permitir-me realizar os experimentos junto a seus laboratórios, em especial ao professor Raul Vicenzi, que sempre me apoiou e colaborou em tudo que pode.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, pela permissão e ajuda para realização dos experimentos relacionados à identificação molecular das bactérias, em especial ao professor Adriano Brandelli.

À equipe do Laboratório de Bioquímica do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA, especialmente à Jamile Queiroz, pela ajuda na identificação molecular das bactérias.

A minha grande amiga Stela, por tudo que fez por mim, pelas inúmeras sugestões e pela prontidão em sempre me auxiliar no esclarecimento de dúvidas.

A minha bolsista de iniciação científica, Jéssica, pela ajuda e companheirismo.

Às minhas estimadas e inesquecíveis amigas do coração, Graciele e Leidi, simplesmente por TUDO.

Ao professor Eduardo César Tondo e à professora Ângela Maria Fiorentini, pelas sugestões, na parte microbiológica deste trabalho.

Aos colegas do Instituto Federal Farroupilha – campus Santo Augusto bem me receberam e por mim torceram.

RESUMO

HERMANN, Gislaine. Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e queijos artesanais. 2013. 100p. – Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS.

Dentre a variada gama de produtos fermentados naturalmente por bactérias ácido lácticas (BAL) encontram-se os queijos artesanais. Estas bactérias são inerentes da matéria-prima leite e durante o processo fermentativo produzem compostos responsáveis pelo *flavor* e textura dos produtos. Sua utilização constitui-se em uma das técnicas mais antigas de conservação de alimentos, já que são capazes de produzir substâncias com caráter antagônico frente a micro-organismos deteriorantes e patogênicos, com destaque a *Listeria monocytogenes*, comumente encontrada em produtos lácteos refrigerados. Além disso, muitas bactérias ácido lácticas possuem potencial probiótico, constituindo-se em um atrativo a mais para sua utilização. Na região Fronteira Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul é produzido um queijo típico, popularmente denominado queijo colonial, cujo conhecimento das técnicas de fabricação tem sido transferido verbalmente ao longo das gerações. Por ser fabricado, na grande maioria dos casos, com leite cru, sem a adição de culturas iniciadoras e sob condições deficientes de higiene, possui uma diversificada população microbiana indesejada. Este aspecto se caracteriza como um perigo aos consumidores, já que além de micro-organismos deteriorantes pode também servir como veículo de micro-organismos patogênicos. Assim, o objetivo do presente estudo foi isolar e identificar bactérias ácido lácticas com características bacteriocinogênicas e probióticas, de leite e queijos artesanais desta região. Para isso, inicialmente, as BAL foram isoladas e testadas quanto a sua capacidade antagonista frente a micro-organismos patogênicos e então verificada a capacidade de produção de substâncias antimicrobianas de natureza protéica (bacteriocinas). A resistência a barreiras biológicas, como um dos critérios para seleção de isolados com potencial probiótico também foi avaliado. A identificação molecular dos isolados potencialmente bacteriocinogênicos e probióticos foi realizada por meio da obtenção e sequenciamento do rDNA 16S ou da região ITS. Posteriormente, os isolados foram avaliados quanto à resistência a antimicrobianos de uso clínico e à produção da enzima β -hemolisina, como fatores de virulência. Os isolados selecionados foram utilizados como inóculo em queijos produzidos a nível piloto, com monitoramento de parâmetros físico-químicos e microbiológicos, ao longo de vinte e oito dias de maturação, sob refrigeração. Do total de bactérias lácticas isoladas, vinte e uma (34,43%) demonstraram potencial antagonista frente a micro-organismos patogênicos de referência. Destas, sete (33,33%) mostraram-se capazes de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica, sendo classificadas como, possivelmente, bacteriocinogênicas e cinco (23,81%) dos isolados demonstraram possuir potencial probiótico. A identificação molecular destes revelou se tratarem de *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus plantarum*. Os isolados

F9 e U5 foram selecionados e adicionados como cultura bacteriocinogênica e probiótica, respectivamente, em queijos a nível piloto, artificialmente contaminados com *Listeria monocytogenes*. Nenhum dos isolados foi capaz de eliminar este micro-organismo patogênico nos queijos, porém o cultivo bacteriocinogênico se mostrou capaz de manter as contagens de células viáveis deste micro-organismo estáveis durante o período de maturação. A cultura probiótica se revelou capaz de resistir durante a maturação do queijo, mantendo um número de células viáveis na ordem de $10^7 - 10^8 \text{UFC.g}^{-1}$ de queijo, o que permite sua utilização com propósito probiótico.

PALAVRAS-CHAVE: leite, queijo, bactérias ácido lácticas, bacteriocinas, probióticos.

ABSTRACT

HERMANNNS, Gislaine. Bacteriocinogenic potential and isolated probiotic lactic acid bacteria from milk and homemade cheeses. In 2013. 100p. - Thesis (Ph.D.) - Graduate Program in Science and Food Technology. Universidade Federal de Santa Maria – RS.

Among the wide range of products naturally fermented by lactic acid bacteria (LAB), there are the homemade cheeses. These bacteria are inherent to the raw milk and the fermentation process for producing compounds responsible for the flavor and texture of the products. Its use is one of the oldest food preservation techniques, since they are able to produce substances with antagonistic action against spoilage and pathogenic microorganisms, particularly *Listeria monocytogenes*, commonly found in refrigerated dairy products. In addition, many lactic acid bacteria have probiotic potential, thus becoming the most attractive one for its use. In North West Frontier region of Rio Grande do Sul a typical cheese is produced, popularly called colonial cheese, which its knowledge of fabrication techniques have been transferred verbally through generations. For being manufactured, in most cases, with raw milk without the addition of starter cultures and under poor conditions of hygiene, it has a diverse unwanted microbial population. This aspect is characterized as a danger to consumers, as well as spoilage organisms that can also serve as a carrier of pathogenic microorganisms. The objective of this study is to isolate and identify lactic acid bacteria with probiotic characteristics and bacteriocinogenic from milk and artisan cheeses produced in this region. Thus initially the BAL were isolated and tested for antagonist ability against pathogens, and then checked the ability to produce antimicrobial substances of proteinaceous nature (bacteriocins), as well as resistance to biological barriers, as a criteria for the selection of isolated with probiotic potential. Molecular identification was performed by obtaining and sequencing of 16S rDNA or the ITS region. Subsequently, the isolated were evaluated for antimicrobial resistance of clinical use and the production of the enzyme β -hemolysin as virulence factors. The selected isolated were used as inoculum in cheese produced at a pilot level, with monitoring of physical-chemical and microbiological, over twenty-eight days of maturation under refrigeration. Of total lactic acid bacteria isolated twenty-one (34.43%) showed antagonistic potential against pathogenic microorganisms reference. Of these, seven (33.33%) were able to produce antimicrobial substances of nature protein, being classified as possibly bacteriocinogenic and five (23.81%) isolated were shown to possess probiotic potential. The molecular identification of these proved to treat *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus plantarum*. The isolated F9 and U5 were selected and added as bacteriocin and probiotic culture, respectively, as a pilot project in cheese artificially contaminated with *Listeria monocytogenes*. No isolated was able to remove this pathogenic organism in the cheese, and the cultivation of bacteriocinogenic shown to be capable of maintaining viable cells of the microorganism stable during the maturation period. The probiotic proved to be able to withstand during the ripening of the cheese, while

maintaining a viable cell number in the order of $10^7 - 10^8$ UFC.g⁻¹ cheese, which allows its use with probiotic purpose.

KEYWORDS: milk, cheese, lactic acid bacteria, bacteriocins, probiotics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Árvore decisória para o desenvolvimento de novos probióticos. ----- 31
- Figura 2 – Mapa geográfico demonstrando a localização e os municípios da Região Fronteira Noroeste do Estado do RS. ----- 35
- Figura 3- Etapas da produção de queijos a nível piloto, com adição de culturas de BAL e inoculo de *Listeria monocytogenes*. ----- 44
- Figura 4 – Variação dos percentuais de sobrevivência de BAL com base na susceptibilidade a condições ácidas e ao fenol. ----- 60
- Figura 5 – Avaliação da sobrevivência do isolado U5 frente a suco gástrico artificial e suco gástrico artificial acrescido de leite, com base na contagem de células viáveis. ----- 77
- Figura 6 - Atividade da enzima β -gal dos isolados de bactérias ácido lácticas (BAL), identificados como *Enterococcus*. ----- 80
- Figura 7 – Enumeração (\log_{10} UFC.g⁻¹) de *Listeria monocytogenes* nos queijos com adição de cultura probiótica, supostamente bacteriocinogênica e associação destas. ----- 90
- Figura 8 – Teores (%) médios de umidade dos queijos, nos diferentes tratamentos, ao longo do período de maturação. ----- 80
- Figura 9 - pH dos queijos, sem *Listeria monocytogenes* durante a maturação. ----- 83
- Figura 10 - pH dos queijos, com *Listeria monocytogenes* durante a maturação. ----- 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tamanho dos halos de inibição (mm) para classificação dos isolados como Resistente (R), Intermediário (I) e Sensível (S) frente a antimicrobianos.-----	42
Tabela 2 - Características fenotípicas (coloração de GRAM, teste de catalase e morfologia celular) de bactérias isoladas de leite e queijos artesanais produzidos na região Fronteira Noroeste do RS. -----	47
Tabela 3 – Atividade antagonista de BAL nativas de leite e queijos artesanais da região Fronteira Noroeste do RS, frente a patógenos de referência, com base na medida dos halos de inibição. -----	49
Tabela 4 – Avaliação do caráter proteico das substâncias antimicrobianas produzidas por BAL, com base na susceptibilidade a enzimas proteolíticas. -----	52
Tabela 5 – Sensibilidade dos isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) frente a enzimas proteolíticas, após incubação a 7 – 10 ⁰ C por sete dias. -----	54
Tabela 6 – Sobrevivência (%S) das BAL, isoladas de leite e queijos artesanais, a diferentes condições ácidas, após quatro horas de incubação, com base na contagem de células viáveis. -----	56
Tabela 7 – Avaliação da sobrevivência (%S) de BAL frente a diferentes concentrações de bile, com base na contagem de células viáveis, após quatro horas de incubação. -----	58
Tabela 8 – Avaliação de sobrevivência (%S) de BAL frente ao fenol 0,4%, após quatro horas de incubação, com base na contagem de células viáveis.-----	59
Tabela 9 - Redução logarítmica no número de células viáveis de BAL após exposição à bile. -----	61
Tabela 10 - Sobrevivência (%S) do isolado U5, em distintos intervalos de exposição ao suco gástrico artificial, com e sem alimento, e suco intestinal artificial, com e sem bile. -----	63
Tabela 11 - Propriedades de adesão (autoagregação e hidrofobicidade) de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de leite e queijos artesanais.-----	78
Tabela 12 - Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e atividade da β-hemolisina de bactérias ácido lácticas (BAL), com características bacteriocinogênicas e probióticas.-----	82
Tabela 13 - Identificação por 16S rDNA dos isolados de BAL e através da região ITS para o isolado Y5, com características bacteriocinogênicas e probióticas. -----	84
Tabela 14 – Condições físico-químicas do leite cru fornecido pela plataforma de recebimento, para elaboração dos queijos a nível piloto. -----	85

Tabela 15 – Condições microbiológicas do leite pasteurizado utilizado para fabricação dos queijos-----	86
Tabela 16 - Desenvolvimento das BAL ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$), com características probióticas e supostamente bacteriocinogênicas, nos queijos submetidos a diferentes tratamentos, ao longo do período de maturação de 28 dias. -----	88
Tabela 17- Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> ($\log_{10}\text{ UFC.g}^{-1}$) nos queijos submetidos a diferentes tratamentos, ao longo do período de maturação de 28 dias. -----	89
Tabela 18 - Valores médios de atividade de água, nos queijos submetidos aos diferentes tratamentos, durante a maturação. -----	79
Tabela 19- Valores médios de umidade (%), nos queijos submetidos aos diferentes tratamentos, durante a maturação.-----	81
Tabela 20 - Valores médios de pH, ao longo do período de maturação, nos queijos submetidos aos diferentes tratamentos. -----	82

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1 OBJETIVOS	17
1.1 Objetivo geral	17
1.2 Objetivos específicos	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Produção de leite e queijos no Estado do RS	19
2.2 Produção artesanal de queijos	20
2.3 Bactérias ácido lácticas	21
2.3.1 Bactérias ácido lácticas em leite e queijos	22
2.3.2. <i>Enterococcus</i> spp. e sua importância em queijos	23
2.4 Produção de substâncias antagônicas	25
2.5 Probióticos	27
2.6 Susceptibilidade a antimicrobianos e fatores de virulência dos <i>Enterococcus</i>	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Materiais	34
3.2 Métodos	35
3.2.1 Isolamento, purificação e armazenamento das BAL	35
3.2.2 Determinação da atividade antagonista das BAL frente a micro-organismos patogênicos	36
3.2.3 Perfil fermentativo dos isolados de BAL	37
3.2.4 Caracterização da natureza proteica das substâncias antimicrobianas produzidas pelas BAL	37
3.2.5 Verificação da capacidade de produção de substâncias antimicrobianas de natureza protéica das BAL, em temperatura de refrigeração	38
3.2.6 Caracterização de BAL com potencial probiótico	38
3.2.7 Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico e atividade da enzima β -hemolisina	41
3.2.8 Identificação molecular das BAL	42
3.2.9 Produção de queijos a nível piloto	43

3.2.10 Preparo dos inoculos -----	45
3.2.11 Análise estatística -----	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	47
4.1 Isolamento de BAL -----	47
4.2 Detecção da atividade antagonista dos isolados de BAL -----	48
4.3 Perfil fermentativo dos isolados de BAL-----	50
4.4 Caracterização da natureza proteica das substâncias antimicrobianas produzidas pelas BAL -----	51
4.5 Verificação da capacidade de produção de bacteriocinas sob refrigeração-----	53
4.6 Identificação de isolados de BAL com potencial probiótico-----	55
4.6.1 Tolerância ao pH ácido-----	55
4.6.2 Tolerância a sais biliares-----	57
4.6.3 Tolerância ao fenol -----	58
4.6.4 Identificação dos isolados mais resistentes às barreiras biológicas <i>in vitro</i> -----	59
4.6.5 Tolerância ao trânsito gastrointestinal superior, de forma simulada -----	61
4.6.6 Capacidade de adesão -----	77
4.6.7 Atividade da enzima β -galactosidase-----	79
4.6.8 Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos e da atividade da β -hemolisina -----	80
4.6.9 Identificação molecular das BAL-----	83
5 ELABORAÇÃO DOS QUEIJOS A NÍVEL PILOTO-----	85
5.1 Qualidade do leite -----	85
5.2 Elaboração dos queijos -----	86
5.2.1 Contagens de bactérias láticas-----	86
5.2.2 Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> -----	88
5.2.3 Valores de atividade de água (Aw) e umidade-----	90
5.2.4 Valores de pH-----	81
CONCLUSÃO -----	85
PERSPECTIVAS FUTURAS-----	87
REFERÊNCIAS -----	88

INTRODUÇÃO

A produção de leite no Estado do RS vem crescendo nos últimos anos. As regiões com maior produção são Noroeste Colonial com 11,3%, Produção com 11%, Fronteira Noroeste com 9,4% e Serra com 8,1% do leite produzido no Estado (IBGE, 2010).

Como método de agregação de valor, os produtores têm se utilizado da tecnologia de fabricação de queijos, por ser este um alimento de grande aceitação, altamente nutritivo e de vida útil muito maior que a do leite “in natura”.

Na região Fronteira Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul é produzido um queijo artesanal, popularmente denominado queijo colonial, cujo conhecimento das técnicas de fabricação tem sido transferido verbalmente ao longo das gerações. Por ser fabricado, na grande maioria dos casos, com leite cru e sem a adição de um inoculo inicial, possui uma diversificada população microbiana indesejada, proveniente do próprio leite e também das condições higiênico-sanitárias às quais é submetido. Este aspecto se caracteriza como um perigo aos consumidores, já que além de micro-organismos deteriorantes pode também servir como veículo de micro-organismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase positiva*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*.

Além dos micro-organismos indesejáveis, estão presentes as bactérias ácido lácticas (BAL), inerentes da matéria-prima leite, que desempenham um papel primordial no processo de fermentação do mesmo, sendo sua utilização um dos métodos mais antigos de preservação. A redução do pH devido à produção de ácidos orgânicos, especialmente ácido lático, a partir da fermentação de carboidratos disponíveis nos alimentos é responsável pelo principal efeito antagonista contra diferentes micro-organismos. Contudo, a competição por nutrientes e a produção de outras substâncias com efeito inibitório (peróxido de hidrogênio, diacetileno e bacteriocinas) são também importantes mecanismos antimicrobianos exercidos pelas bactérias lácticas (NASCIMENTO, 2007; CORBO et al., 2009).

Além disso, as BAL podem apresentar potencial probiótico, o que torna sua utilização em alimentos um atrativo a mais, já que passam a auxiliar na manutenção da saúde dos consumidores (DEL PIANO et al., 2006). O isolamento e a caracterização de novas linhagens probióticas de nichos não investigados podem ser vantajosos para obtenção de linhagens com particularidades funcionais interessantes (ORTU et al., 2007).

Nos últimos anos, é crescente o interesse nos estudos genotípicos e fenotípicos sobre os isolados obtidos de queijos artesanais produzidos principalmente sem a adição de culturas iniciadoras. A identificação de isolados microbianos, com características funcionais e tecnológicas de interesse, provenientes de leite “in natura” e queijos artesanais pode ajudar a prevenir a perda da biodiversidade microbiana em alimentos típicos e, conseqüentemente, manter a grande variedade de queijos produzidos por diferentes métodos (FORTINA et al., 2003; MARTUSCELLI et al., 2005; MADRAU et al., 2006).

Diante dos aspectos mencionados é que se justifica o objetivo geral deste estudo em isolar e identificar bactérias ácido lácticas com características bacteriocinogênicas e probióticas, de leite e queijos artesanais da região Fronteira Noroeste do Estado do RS.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Isolar e identificar bactérias ácido lácticas com características bacteriocinogênicas e probióticas, de leite e queijos artesanais da região Fronteira Noroeste do Estado do RS.

1.2 Objetivos específicos

* Isolar BAL de leite e queijo artesanal em diferentes tempos de maturação (Tempo um dia – T1 e Tempo sete dias – T7 de maturação), produzidos em pequenas propriedades rurais da região Fronteira Noroeste do Estado do RS;

* Verificar a atividade antagonista das BAL isoladas frente a micro-organismos patogênicos de referência: *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*;

* Classificar as BAL, com atividade antagonista, em homo ou heterofermentativas, de acordo com seu perfil fermentativo frente à glicose;

* Testar a capacidade das BAL, com atividade antagonista, de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica, frente a enzimas proteolíticas, caracterizando-as como supostamente produtoras de bacteriocinas;

* Verificar a capacidade de produção de substâncias antimicrobianas de natureza proteica, em temperatura de refrigeração, das BAL anteriormente caracterizadas como supostamente bacteriocinogênicas;

* Caracterizar as BAL, com atividade antagonista, quanto ao potencial probiótico;

* Avaliar a sensibilidade a antimicrobianos de uso clínico e a atividade da enzima β -hemolisina, das BAL supostamente bacteriocinogênicas e probióticas;

* Identificar as BAL com características supostamente bacteriocinogênicas e probióticas por meio da obtenção e sequenciamento do rDNA 16S;

* Sugerir um dos isolados de BAL, com base nas análises realizadas, como cultura supostamente bacteriocinogênica;

* Sugerir um dos isolados de BAL, com base nas análises realizadas, como cultura potencialmente probiótica;

* Produzir queijos a nível piloto com adição dos isolados sugeridos como supostamente bacteriocinogênico e potencialmente probiótico e verificar seus comportamentos frente à *Listeria monocytogenes* ao longo de um período de maturação de 28 dias;

* Analisar características microbiológicas e físico-químicas dos queijos produzidos com adição das culturas, ao longo de 28 dias de maturação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de leite e queijos no Estado do RS

O Estado do RS é atualmente o segundo maior produtor de leite do Brasil, com uma produção anual superior a 3,6 bilhões de litros, o que representa 12% da produção nacional (EMBRAPA, 2011). A produção de leite vem crescendo em escala e produtividade nos últimos anos, principalmente nas bacias leiteiras ligadas às cooperativas, responsáveis pela maioria da captação. As regiões¹ com maior produção são: Noroeste Colonial com 11,3%, Produção com 11%, Fronteira Noroeste com 9,4% e Serra com 8,1% do leite produzido no Estado (IBGE, 2010).

A produção de leite tem se tornando uma das principais fontes de renda de pequenas famílias rurais nestas regiões, que o comercializam, geralmente de maneira informal na forma “in natura”. Porém para aumentar a vida útil deste produto e agregar valor à matéria-prima, diversos métodos de conservação são empregados, tanto em pequenas como em grandes agroindústrias. Os produtores tem se utilizado da tecnologia de fabricação de queijos, por ser um alimento de grande aceitação, altamente nutritivo e de vida útil muito maior que do leite “in natura” (CAVALCANTE et al., 2007).

O queijo artesanal é um produto típico de algumas regiões do país, como no Rio Grande do Sul e também em Minas Gerais e no Nordeste. Este produto assegura renda e emprego aos moradores do campo. O processo de produção em pequena escala é, em geral, realizado em propriedades familiares que têm o derivado como a principal fonte do orçamento mensal. Muitas delas seculares, a receita é passada de geração em geração, com o objetivo de manter as características “terroir” do produto, que estão relacionadas ao clima, à pastagem e ao tipo de bactérias de cada região (ROMANOTTO, 2012).

¹Classificação dos Conselhos Regionais de Desenvolvimento – COREDES – RS.

2.2 Produção artesanal de queijos

Na região Fronteira Noroeste do RS é produzido um queijo artesanal, popularmente denominado queijo colonial, cujo conhecimento das suas técnicas de fabricação tem sido transferido verbalmente ao longo das gerações. Este é bastante apreciado e consumido pela população local, motivado por hábitos alimentares bastante sedimentados, que acredita que estes produtos são saudáveis, possuem alto valor nutricional e preços mais acessíveis. Estes queijos são produzidos de forma artesanal, muitas vezes, sem as condições adequadas de higiene, que são imprescindíveis para obtenção de produtos de qualidade e sem risco à saúde do consumidor (CAVALCANTE et al., 2007).

O emprego do leite cru e sem a adição de fermentos lácteos, na grande maioria dos processos de produção artesanal de queijos, em diferentes regiões do país, fornece a este produto uma diversificada população microbiana indesejada, proveniente do próprio leite e também das condições higiênico-sanitárias às quais é submetido. Este aspecto se caracteriza como um perigo aos consumidores, já que além de micro-organismos deteriorantes pode também servir como veículo de micro-organismos patogênicos, como coliformes termotolerantes, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. (FEITOSA et al., 2003; ZAFFARI, et al., 2007; MENEZES, et al., 2009).

Além dos micro-organismos indesejáveis, a microbiota é composta também de bactérias ácido lácticas (BAL). Essas são inerentes da matéria-prima leite, e desempenham um papel primordial no processo de fermentação do mesmo, sendo sua utilização um dos métodos mais antigos de preservação (GARABAL, 2007).

Até novembro de 2011, de acordo com a legislação em vigor na época, Portaria 146 de 1996, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, os queijos em geral deveriam ser obtidos a partir do leite pasteurizado, integral ou padronizado, sendo permitido o uso de leite cru para processamento de queijos somente se este fosse maturado a uma temperatura superior a 5°C e por mais de 60 dias (BRASIL, 1996). No entanto, é frequente a comercialização de queijos artesanais feitos com leite cru com tempo de maturação inferior a quinze dias.

A partir de dezembro de 2011, a Instrução Normativa 57 do MAPA, prevê a possibilidade de maturação de queijos por período inferior a 60 dias e define

requisitos para sua produção, garantindo a qualidade do produto e atendendo aos aspectos de sanidade e saúde pública. A nova regra, ainda define que a produção de queijos artesanais com maturação inferior a 60 dias fica restrita a queijarias situadas em regiões certificadas ou tradicionalmente reconhecidas e em propriedade produtora de leite cru com status livre de tuberculose, brucelose e controle de mastite. Quando o período de maturação for inferior a 60 dias, o mesmo será definido por pesquisas e estudos específicos, que devem ser realizados por comitês técnico-científicos designados pelo ministério (BRASIL, 2011).

2.3 Bactérias ácido lácticas

As BAL estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser encontradas no solo, água, esterco, esgoto e silagem, bem como nos tratos digestivo, respiratório superior e urogenital inferior dos animais (NETO et al., 2005).

As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo composto por 13 gêneros de bactérias Gram-positivas: *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Paralactobacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactoshaepa*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus* e *Weissela* (JAY et al., 2005). Apresentam a forma de cocos, coco-bacilos ou bastonetes com as seguintes características: baixo conteúdo de Guanina + Citosina: G + C (<55 mol%); ácido tolerantes; não esporuladas; nutricionalmente fastidiosas; aerotolerantes mas não aeróbias; mesófilas ou termófilas, com temperaturas ótimas de crescimento entre 30 e 37°C e 45 a 50°C, respectivamente; incapazes de sintetizar porfirinas; catalase negativas e motilidade negativa. Estão funcionalmente relacionadas devido a sua capacidade comum de produzir primariamente ácido láctico a partir de hexoses (BROADBENT, 2001; LIN et al., 2006; MAKAROVA; KOONIN, 2007).

Particularmente, em função do metabolismo da glicose, são classificadas como homofermentativas, pela produção de ácido láctico como o principal ou único produto; e heterofermentativas, produtoras de igual quantidade de ácido láctico, dióxido de carbono e etanol, além da produção de compostos de *flavor* e aroma, como acetaldeído e diacetileno. Representantes das primeiras incluem *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*, enquanto as últimas apresentam como membros importantes *Leuconostoc*, *Weissela* e também alguns *Lactobacillus* (JAY et al., 2005).

Essas bactérias têm relevância, tanto na indústria de alimentos quanto em saúde pública, por apresentarem características transformadoras, probióticas e bioconservadoras. São utilizadas como culturas iniciadoras (culturas *starter*), provocando transformações nas matérias-primas, produzindo ácidos e outras substâncias que conferem sabores e aromas específicos em produtos fermentados (LEROY; DE VUYST, 2004). No entanto, a produção de ácidos e substâncias proteolíticas pelas BAL, pode determinar a deterioração precoce dos alimentos. Porém, algumas BAL apresentam características probióticas, sendo capazes de colonizar o trato gastrointestinal, e promovendo o balanço da microbiota autóctone nesse ambiente. Outra característica importante, é que várias BAL apresentam atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes importantes em alimentos. Esta atividade antagonista que as algumas BAL possuem ocorre por diversos mecanismos, principalmente pela produção de substâncias inibitórias potencialmente letais aos micro-organismos (POPPI, 2008; BELLO et al., 2010). As principais substâncias com potencial antimicrobiano são: ácidos orgânicos, dióxido de carbono, alcoóis, aldeídos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (HUGAS, 1998; OLIVEIRA; OLIVEIRA; GLÓRIA, 2008). Muitas BAL são capazes de produzir bacteriocinas com atividade antagonista específica contra determinado grupo de bactérias ou a diferentes espécies (NES; JOHNSBORG, 2004). Dentre os micro-organismos patogênicos destaca-se o potencial das BAL para controlar ou inibir o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*, um importante patógeno de origem alimentar.

2.3.1 Bactérias ácido lácticas em leite e queijos

As bactérias ácido lácticas são os micro-organismos predominantes durante a produção e maturação de queijos, desenvolvendo um papel essencial nas características organolépticas dos queijos. O estudo da diversidade das bactérias lácticas envolvidas no processamento de queijos pode ser útil para: diferenciar os queijos; estabelecer os efeitos dos parâmetros tecnológicos sobre a especificidade da microbiota; desenvolver um sistema para estudo da dinâmica microbiana nas fermentações mistas; avaliar a contribuição real das diferentes espécies para a maturação dos queijos; obter informações sobre a diversidade. Tais informações poderiam permitir a seleção das linhagens adequadas para serem introduzidas como

culturas iniciadoras em queijos com leite pasteurizado, de forma a reproduzir o sabor obtido em queijo fabricado com leite cru ou a acelerar a maturação do queijo (NESPOLO, 2009).

O processo de maturação é caracterizado por um complexo de reações bioquímicas, bem como por mudanças microbiológicas, físicas e sensoriais, associadas com o desenvolvimento e atividade metabólica da microbiota nativa. O processo fermentativo espontâneo ocorre com a participação de bactérias ácido lácticas. Estes micro-organismos afetam a qualidade, segurança e formam compostos que conferem aroma e sabor (MADERA et al., 2003).

As bactérias lácticas produzem grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (MADERA, 2003; LIMA et al., 2009).

Os gêneros de BAL mais comumente encontrados em queijos são: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (FOX et al., 2000; BERESFORD et al., 2004). As indústrias de alimentos têm demonstrado interesse por *Enterococcus* spp., tendo em vista que várias espécies têm capacidade de produzir substâncias antagonistas capazes de controlar ou inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos em alimentos (CAMPOS et al., 2006; FRANZ et al., 2007). Além disso, algumas bactérias do gênero *Enterococcus* também vêm sendo usadas como probióticos (FRANZ et al., 2003).

2.3.2. *Enterococcus* spp. e sua importância em queijos

O gênero *Enterococcus* inclui mais de 20 espécies, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as duas mais frequentes em alimentos. São encontrados em grandes proporções no trato gastrointestinal de mamíferos e também no solo, superfície das águas e plantas. Os enterococos chegam aos alimentos por meio de contaminações intestinais ou ambientais e se multiplicam durante a fermentação (GIRAFFA, 2003), ocorrendo em grande número em produtos lácteos (SARANTINOPOULOS et al., 2002). Esses micro-organismos sobrevivem a condições adversas, como pH, temperaturas e salinidade extremas (CARIDI et al., 2003).

Alguns autores (FRANZ et al., 1999; GIRAFFA, 2003; FOULQUIE-MORENO et al., 2006, NASCIMENTO et al., 2009) relatam a influência positiva desses micro-organismos no desenvolvimento da maturação dos queijos, em decorrência da lise celular das culturas, promovendo a liberação de aminopeptidases intracelulares na matriz do queijo, contribuindo com a proteólise. Além disso, possuem atividade lipolítica, capacidade de utilização do citrato e formação de compostos voláteis, como acetaldeído, acetoína e diacetil, responsáveis pelo *flavor* característico de certos queijos (CENTENO et al., 1996; FRANZ et al., 1996).

Na Europa, os enterococos são muito utilizados na produção de alimentos fermentados, especialmente em queijos produzidos a partir de leite cru, como os queijos Feta, Kasseri, Manchego e Majonero, onde conferem características sensoriais únicas de sabor e aroma (COGAN et al. 1997). No Brasil, a pesquisa com queijos artesanais de diferentes regiões, também tem evidenciado a predominância de BAL do gênero *Enterococcus* (SCHITTLER, 2012; BRUNO, 2007; CARVALHO, 2007).

Nos alimentos, os enterococos também podem ser utilizados como culturas probióticas na elaboração de alimentos funcionais (FRANZ et al., 1999) e ainda como culturas protetoras, pois produzem várias substâncias antagonistas, em especial as enterocinas, que agem no controle ou na inibição do desenvolvimento de diversos micro-organismos patogênicos relevantes para a segurança dos alimentos, bem como em micro-organismos deteriorantes (GIRAFFA et al., 2002; FRANZ et al., 2003). As formas de utilização mais frequentes das culturas protetoras em alimentos fermentados são através da substituição da cultura iniciadora por uma cultura de *Enterococcus* bacteriocinogênica ou da sua adição como cultura coadjuvante (ANNAMALAI et al., 2009, BELLEI et al., 2011).

Achemchem et al. (2006) adicionaram *E. faecium* F58 como cultura iniciadora, juntamente com a cultura patogênica de *L. monocytogenes*, na elaboração de um queijo fresco, observando redução entre 1 e 4 log UFC.g⁻¹ da concentração inicial de *L. monocytogenes*. Os mesmos autores verificaram que houve eliminação do patógeno quando os queijos foram elaborados com a cultura iniciadora e, após 12 horas, foi adicionada a cultura patogênica.

2.4 Produção de substâncias antagônicas

As bactérias láticas são capazes de produzir metabólitos, caracterizados como substâncias antagônicas, capazes de inibir o desenvolvimento de outras bactérias. Dentre estes se encontram os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, radicais livres, diacetileno, acetaldeído, isômeros D de aminoácidos e as bacteriocinas (PIARD; DESMAZEUD, 1992). Destaque é dado ao estudo das bacteriocinas pela importância na aplicação em indústrias de alimentos como bioconservantes (ORTOLANI, 2009).

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomalmente, biologicamente ativos, produzidos por diversas espécies de bactérias, caracterizados por agirem contra um grupo específico de micro-organismos da mesma espécie, ou de diferentes gêneros (MARTINIS et al., 2001; NESPOLO, 2009; ORTOLANI, 2009).

Muitas bacteriocinas são moléculas catiônicas que apresentam acima de 60 aminoácidos e são termoestáveis (HUGAS, 1998; GARNEAU et al., 2002). A produção de bacteriocinas é favorecida quando o micro-organismo é cultivado em condições de estresse, como em temperaturas sub ótimas ou pH ácido. Nestas condições, ocorre baixa taxa de multiplicação microbiana, resultando na melhor utilização de energia e maior disponibilidade de metabólitos para a síntese das bacteriocinas. Em condições ótimas de cultivo há elevada taxa de multiplicação, ocasionando a falta de aminoácidos disponíveis para produção das bacteriocinas (VAN DEN BERGHE et al., 2006).

As bacteriocinas produzidas pelas BAL estão divididas em três classes, de acordo com seus mecanismos de ação e particularidades da sua estrutura (NES et al., 1996; DEEGAN et al., 2006). A classe I é denominada lantibióticos, e são pequenos peptídeos (<5 kDa), termoestáveis, modificados pós-translacionalmente, formando aminoácidos desidratados, denominados de lantioninas e metilantioninas. Dentro da classe I, ainda há outra subdivisão: Ia e Ib. A subclasse Ia inclui peptídeos longos, flexíveis e com carga positiva, que causam a destruição dos micro-organismos sensíveis pela ligação e formação de poros na membrana citoplasmática. A subclasse Ib é composta por peptídeos globulares, mais rígidos, que apresentam ou não carga negativa, e atuam nos micro-organismos sensíveis interferindo em suas reações enzimáticas (DEEGAN et al., 2006). O principal representante da classe I é a nisina, produzida por algumas cepas de

Lactococcus lactis subsp. *lactis*, sendo composta por 34 aminoácidos. A molécula de caráter ácido, o que explica a sua completa estabilidade em pH 2,0, podendo ser estocada durante longos períodos a temperaturas de 2 a 7°C (GÁLVEZ et al., 2007). No entanto, a nisina é inativada em pH superior a 7, inclusive em temperatura ambiente.

Na classe II estão incluídos pequenos peptídeos antimicrobianos não modificados (<10 kDa), termoestáveis e que não apresentam resíduos de lantionina (NES; JOHNSBORG, 2004; COTTER et al., 2005). Geralmente apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua interação na membrana citoplasmática da célula (DRIDER et al., 2006). Esta classe é subdividida em IIa (pediocina e enterocina), IIb (lactocina G) e IIc (lactocina B) (CINTAS et al., 2001; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; GÁLVEZ et al., 2007).

Na subclasse IIa estão os peptídeos ativos contra *Listeria* spp., que são conhecidos como *pediocin-like* (similares a pediocina) (RENYE et al., 2009; KHAN; FLINT; YU, 2010). Os representantes desta classe possuem entre 37 e 48 aminoácidos, com uma porção N-terminal com configuração de folha pregueada e com uma porção C-terminal, contendo uma ou duas α -hélices (FIMLAND et al., 2005). As bacteriocinas desta classe se inserem na membrana celular do microrganismo alvo pela porção C-terminal, promovendo a formação de poros e consequente dissipação da força próton motriz, causando uma aceleração no consumo de ATP e posterior morte celular (KAISER; MONTVILLE, 1996).

Devido a sua natureza proteica e sensibilidade a enzimas proteolíticas, incluindo as de origem pancreática (tripsina e α -quimiotripsina), permitem a realização de testes de inibição com diferentes enzimas, podendo-se assim caracterizar as bacteriocinas produzidas por BAL. A sensibilidade das bacteriocinas à degradação por enzimas proteolíticas é bastante interessante com relação à segurança alimentar, uma vez que a ingestão de bacteriocinas não promove alterações na ecologia do trato gastrointestinal e, por isso, não apresenta os mesmos riscos relacionados ao uso de antibióticos. Contudo, estudos toxicológicos são necessários para a aprovação do uso de novos tipos de bacteriocinas em alimentos (MORENO, 1995).

A capacidade de conservação, por parte das bactérias, que ocorrem naturalmente nos alimentos, tem auferido grandes aliados nos últimos anos, devido à demanda dos consumidores para o uso reduzido de conservantes sintéticos

(VOULGARI et al., 2010). Bactérias ácido lácticas com atividade bacteriocinogênica são encontradas normalmente em quantidades significativas em leite e queijos (RODRÍGUEZ et al., 2000), mas podem também ser adicionadas com intenção de bioconservação (DEEGAN et al., 2006). Além das culturas propriamente ditas, as bacteriocinas purificadas podem ser adicionadas também a alimentos com os mesmos objetivos, mas para isso, tanto estas quanto aquelas, devem atingir o *status* GRAS (*generally recognized as safe* – usualmente reconhecido como seguro) (CHEN; HOOVER, 2003; DEEGAN et al., 2006).

Embora várias bacteriocinas com potencial de emprego nos alimentos, já tenham sido purificadas e caracterizadas, a nisina e, em menor extensão, a pediocina PA-1, são as únicas bacteriocinas produzidas em escala comercial (COTTER et al., 2005). No Brasil, a nisina foi aprovada pela Divisão Nacional de Alimentos (DINAL) do Ministério da Saúde (Portaria nº6, 1990), para ser utilizada em preparados à base de queijos fundidos e em queijos fundidos, em uma dose máxima de 12,5 mg/Kg. A mesma dose de nisina foi liberada pelo DETEN (Departamento de Técnicas Normativas) do Ministério da Saúde para requeijão (Portaria nº 34/1992) e queijo pasteurizado (Portaria nº29/1996) (BRASIL, 1996). Em 1998, a Divisão de Operações Industriais do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pertencente ao Ministério da Agricultura e do Abastecimento, aprovou o uso de nisina em solução de 200ppm (0,02%) para o emprego em superfícies externas de embutidos, mais especificamente de salsichas de todo tipo.

2.5 Probióticos

De acordo com a FAO/WHO (2001), probióticos são definidos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do indivíduo. Conseqüentemente, várias espécies e gêneros poderiam ser considerados potenciais probióticos; porém, comercialmente, as linhagens mais importantes são as de bactérias ácido lácticas (VASILJEVIC; SHAH, 2008), já que são encontradas em grande número no intestino de animais e humanos saudáveis e muitas delas são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS), de acordo com o FDA (PARVEZ et al., 2006). Embora *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. mereçam destaque, na literatura têm sido descritos outros

gêneros como *Enterococcus* spp. (FRANZ et al., 1999) e *Escherichia* spp. (KRUIS et al., 2004; HENKER et al., 2007; UKENA et al., 2007).

O gênero *Enterococcus* se caracteriza por ser constituído de micro-organismos colonizadores transitórios do trato gastrointestinal, indispensáveis no tratamento das diarreias, principalmente na invasão do rotavírus. É capaz de reduzir o LDL colesterol pela ativação do sistema enzimático hepático. A espécie *faecium* se destaca dentre as demais por exercerem tais funções de maneira mais acentuada (FISIOQUANTIC, 2005).

Entretanto, o *E. faecium* foi, por muito tempo, confundido com o *E. faecalis*, uma espécie patogênica, razão pela qual seus estudos foram prejudicados, tendo seu início tardio em relação as demais bactérias benéficas ao organismo humano (ECOLOGY HEALTH CENTER, 2005).

O *E. faecium* é uma bactéria não patogênica, com um tempo de reprodução de 19 minutos, diferente do *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium* que é de aproximadamente 60 minutos. Com reprodução três vezes mais rápida, seu efeito na remoção de microbiotas patogênicas nos intestinos, é mais efetivo. É mais resistente ao ácido do estômago, sendo menos inibido quando veiculado por suplemento oral, com conseqüente colonização mais rápida nas paredes intestinais. A atividade benéfica relatada em vários estudos se refere ao aumento na absorção intestinal de nutrientes em relação aos demais micro-organismos, quando comparada com os *Lactobacillus*. Segundo o Ecology Health Center (2005), os efeitos do *E. faecium* na microbiota intestinal são frequentemente visíveis nos primeiros dias após sua ingestão, o que não é observado com outros produtos contendo *Lactobacillus* spp. As pesquisas sobre a utilização na dieta e o potencial probiótico do *E. faecium* se encontram em crescimento em vários países, como na Alemanha e na Eslováquia. Estudos de Marciňáková; Simonová e Lauková (2004), Vahjen et. (2005) e Pollman et. al (2005) avaliaram o potencial probiótico de diferentes cepas de *E. faecium* (ECOLOGY HEALTH CENTER, 2005).

E. faecium foi reconhecido no Brasil como micro-organismo probiótico e o seu uso foi licenciado pela ANVISA (2008). Já no Canadá, em 2004, seu uso foi proibido como cultura probiótica (OGIER; SERROR, 2008). No entanto, na Dinamarca, um leite fermentado probiótico é comercializado contendo *E. faecium* (TAMIME, 2002). Nos EUA, uma cultura probiótica é comercializada com o nome de Causido®, que

consiste na combinação das culturas de *S. thermophilus* e *E. faecium* (GIRAFFA et al., 2003).

Apesar do potencial dos *Enterococcus* como culturas probióticas, sua utilização deve ser feita com cautela. Novos isolados devem ser avaliados quanto a habilidade de transferir genes de resistência a antibióticos, sua capacidade hemolítica, a presença de gelatinases, a resistência a sais biliares, ao pH e sensibilidade a lisozima, antes da sua utilização como cultura probiótica (OGIER; SERROR, 2008).

Os mecanismos pelos quais os probióticos exercem esses efeitos são ainda desconhecidos, mas podem envolver modificação do pH (produção de ácidos orgânicos), atividade antagonista sobre patógenos por meio da produção de compostos antimicrobianos, competição com patógenos por sítios de ligação, efeito de barreira no intestino, produção de enzimas (β -galactosidase, sal biliar hidrolase), síntese e aumento da disponibilização de nutrientes (hidrólise de proteínas e lipídios), estimulação de células imunomodulatórias, redução da atividade de enzimas que ativam a carcinogênese e inibição do crescimento ou apoptose de células tumorais (produção de ácidos graxos de cadeia curta, como exemplo, butirato) (PARVEZ et al., 2006; VASILJEVIC; SHAH, 2008; VENTURA et al., 2009).

As culturas probióticas são extensivamente exploradas pela indústria de laticínios. Como crescem lentamente no leite devido à baixa atividade proteolítica, as culturas *starters* tradicionais do iogurte são juntamente incorporadas aos leites fermentados contendo probióticos (DAVE; SHAH, 1998). Recentemente, aplicações em queijos e produtos não fermentados como soro de leite e sorvete, além de outros produtos não lácteos receberam a adição de probióticos como maionese, sucos de frutas, produtos cárneos e produtos à base de aveia, conforme relatado por Vasiljevic e Shah (2008). Além disso, probióticos também são vendidos como suplementos na forma de tabletes, cápsulas ou preparações liofilizadas.

Contudo, é essencial que os produtos probióticos contenham um número satisfatório de células ativas no momento do consumo. Os valores mínimos das concentrações de probióticos para efeitos terapêuticos citados na literatura variam entre 10^5 e 10^7 UFC⁻¹ (DAVE; SHAH, 1998; BARRRETO et al., 2003; SANZ, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008). Gomes e Malcata (1999) afirmaram que isso foi exigido em função da dose terapêutica mínima diária ser geralmente considerada 10^8 a 10^9 células viáveis, alcançada com o consumo de 100 g de produto fermentado

contendo 10^6 a 10^7 de células viáveis/mL ou g. Além disso, é necessário que haja o consumo regularmente para que se mantenha o efeito desses micro-organismos sobre a composição da microbiota intestinal, já que a colonização não é permanente e sim transitória.

De acordo com as atualizações de julho de 2008 da lista de alegações de propriedade funcional aprovadas da ANVISA, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante, e deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação da propriedade funcional (ANVISA, 2008). Os micro-organismos *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subespécie *thermophilus* foram retirados da lista tendo em vista que além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado.

Potenciais linhagens probióticas devem atender a certos critérios para que possam ser efetivas e utilizadas: de segurança, tecnológicos e funcionais. A Figura 1 mostra, segundo Lee et al. (1999), a árvore decisória para desenvolvimento de novos probióticos.

As bactérias probióticas fornecidas por meio de sistemas alimentares devem primeiramente sobreviver durante a passagem pelo trato gastrointestinal para, então, persistirem no intestino e prover efeitos benéficos ao hospedeiro. Para isso, devem apresentar como critérios funcionais: tolerância à acidez e a sais biliares e capacidade de adesão à mucosa intestinal. Adicionalmente, atividade antagonista é outro requisito fundamental para a sobrevivência no intestino (REINHEIMER, 2003; HUANG; ADAMS, 2004; VINDEROLA; SCHILLINGER et al., 2005).

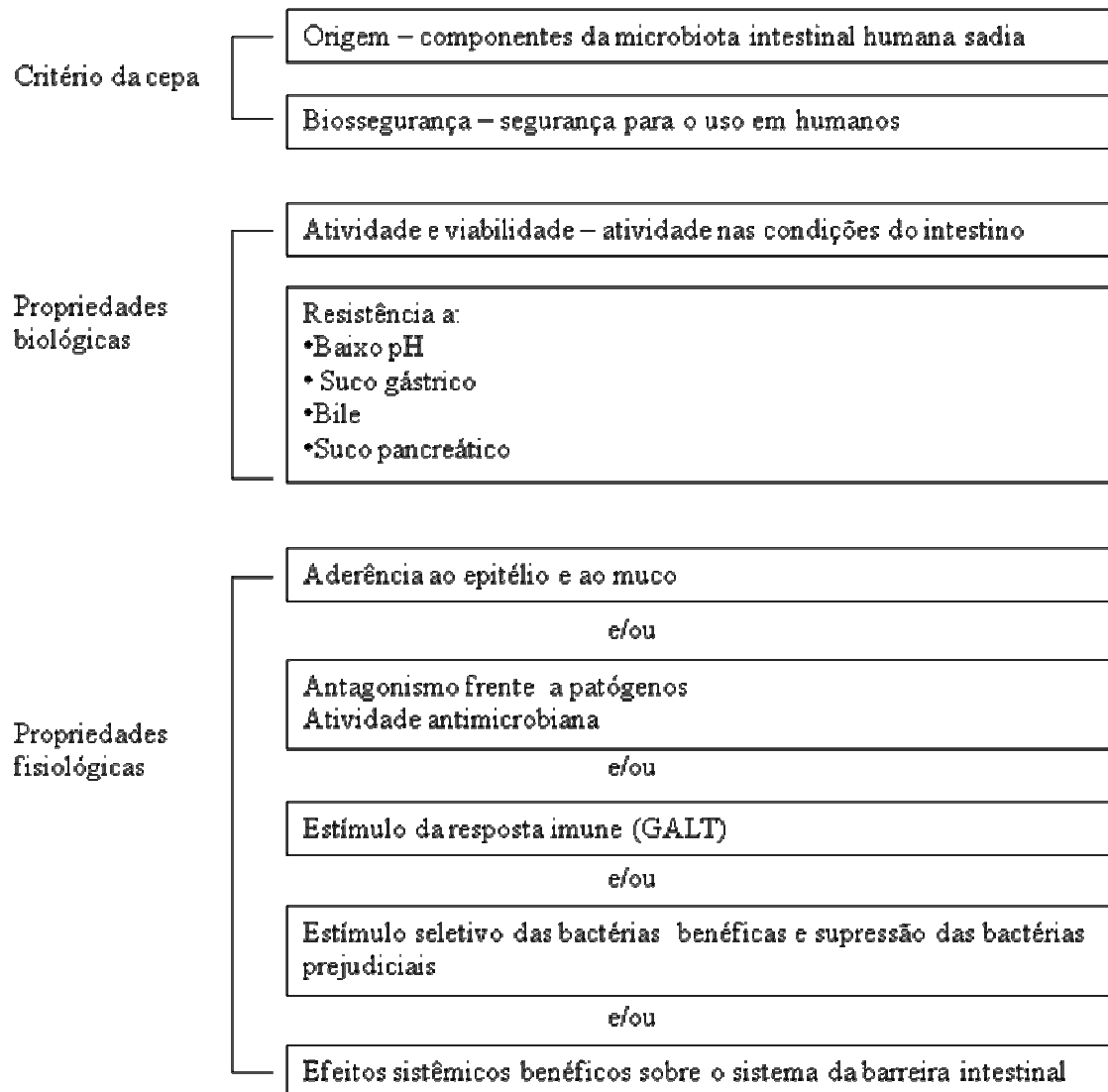


Figura 1 – Árvore decisória para o desenvolvimento de novos probióticos.

Fonte: Lee et. al (1999)

2.6 Susceptibilidade a antimicrobianos e fatores de virulência dos *Enterococcus*

Há divergência nos diversos estudos sobre a susceptibilidade de *Enterococcus* spp., a antimicrobianos, principalmente no se refere a sua resistência. De acordo com a literatura, a resistência parece depender da região geográfica onde foi isolado o micro-organismo e do próprio isolado. Kayser (2003) descreve que os enterococos são intrinsecamente resistentes a penicilinas semissintéticas e as cefalosporinas, possuindo a capacidade de adquirir genes de resistência, através de plasmídeos e transposons, a antibióticos como cloranfenicol, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e vancomicina.

As principais espécies de enterococos que causam infecções no homem são *Enterococcus faecalis* (80 a 90%) e *Enterococcus faecium* (5 a 15%), sendo que a resistência a vancomicina é mais frequentemente descrita com o *Enterococcus faecium*. A aquisição da infecção por Enterococos Resistente à Vancomicina (VER) geralmente ocorre a partir da microbiota endógena após manipulação do trato gastrointestinal, por transmissão cruzada através das mãos contaminadas dos manipuladores que servem como fontes de transmissão.

No entanto, Teuber et al. (1999) descrevem que poucos enterococos isolados de alimentos são resistentes aos antibióticos clínicos de importância, como a ampicilina, penicilina, gentamicina e vancomicina.

Vale ressaltar que para a utilização de *Enterococcus* como culturas iniciadoras ou como cultura coadjuvante é importante, como critério de segurança, a verificação da ausência da capacidade de transferir resistência a antibióticos (FRANZ et al., 2001; DE VUYST et al., 2003).

Entretanto, a patogenicidade desses micro-organismos não pode ser explicada apenas pelo perfil de resistência aos antimicrobianos, devendo-se levar em consideração, também, outros fatores de virulência. Os principais fatores de virulência conhecidos associados a *Enterococcus* spp. são: aderência a tecidos, invasão e formação de abscessos, modulação da resposta imune e secreção de toxinas (EATON; GASSON, 2001).

Um importante fator de virulência é a β -hemolisina, uma enzima que é capaz de lisar eritrócitos humanos e de animais como equinos e coelhos (EATON; GASSON, 2001). De acordo com Abriouel et al. (2008) nenhum isolado de *E. faecalis* e *E. faecium* proveniente de alimentos vegetais, água e solo apresentou atividade β -hemolítica.

A presença de tais fatores de virulência e a aquisição de genes de resistência a antibióticos pode indicar a associação destes micro-organismos com infecções em humanos (GIRAFFA, 2002). A classificação taxonômica do gênero *Enterococcus* não permite distinção entre isolados patogênicos e não patogênicos, pois as diferenças entre ambos não são evidentes e o potencial para aquisição de genes de virulência não é bem elucidado (EATON; GASSON, 2001).

No entanto, Khan et al. (2010) avaliaram isolados de *Enterococcus* de várias fontes e testaram os seus fatores de virulência, verificando que os isolados de amostras clínicas apresentam maior frequência de fatores de virulência, seguidos de

isolados provenientes de animais e de alimentos. Já Mannu et al. (2003) compararam a ocorrência de fatores de virulência e de resistência a antibióticos de *E. faecium* isolados de produtos lácteos, animais e clínicos, e observaram resultados semelhantes entre os isolados.

De acordo com De Vuyst et al. (2003) isolados de *Enterococcus* spp. que não apresentam atividade hemolítica e não carregam genes da citolisina e da resistência a vancomicina podem ser considerados seguros e utilizados como culturas iniciadoras, culturas coadjuvantes ou probióticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada, inicialmente, junto a propriedades rurais, da região Fronteira Noroeste do estado do RS, de onde foram coletadas amostras de leite “in natura” e queijos artesanais. Os experimentos foram realizados junto aos Laboratórios de Microbiologia, Físico-química e Planta Piloto da UNIJUÍ – Universidade Regional do Noroeste do Estado do RS, contando com suporte dos laboratórios da UFSM – Universidade Federal de Santa Maria. A extração do DNA, para identificação molecular das bactérias ácido lácticas foi realizada junto ao Laboratório de Bioquímica, do ICTA – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O sequenciamento do DNA das BAL foi realizado junto à empresa ACTGene – Análises Moleculares, de Porto Alegre.

3.1 Materiais

Com apoio da EMATER regional de Santa Rosa/RS foram selecionadas dez propriedades rurais de diferentes municípios (Doutor Maurício Cardoso, Horizontina, Três de Maio, Nova Candelária, Tuparendi, Tucunduva e Santa Rosa) da região Fronteira Noroeste do Estado do RS (Figura 2) que produzem queijos artesanais, com leite cru e sem adição de cultivo iniciador. Em cada propriedade foram realizadas duas coletas, uma durante os meses de primavera-verão e outra durante os meses de outono-inverno. De cada propriedade foram coletadas: 01 amostra de leite “in natura”, totalizando 20 amostras (n=20) e dois queijos, com 01 dia de fabricação, totalizando 40 amostras (n=40). Um dos queijos foi analisado imediatamente, caracterizando o Tempo 01 dia (T1). O outro queijo foi maturado, por sete dias, sob refrigeração a 7°C, caracterizando o Tempo 07 dias (T7), conforme prática adotada pelos produtores.

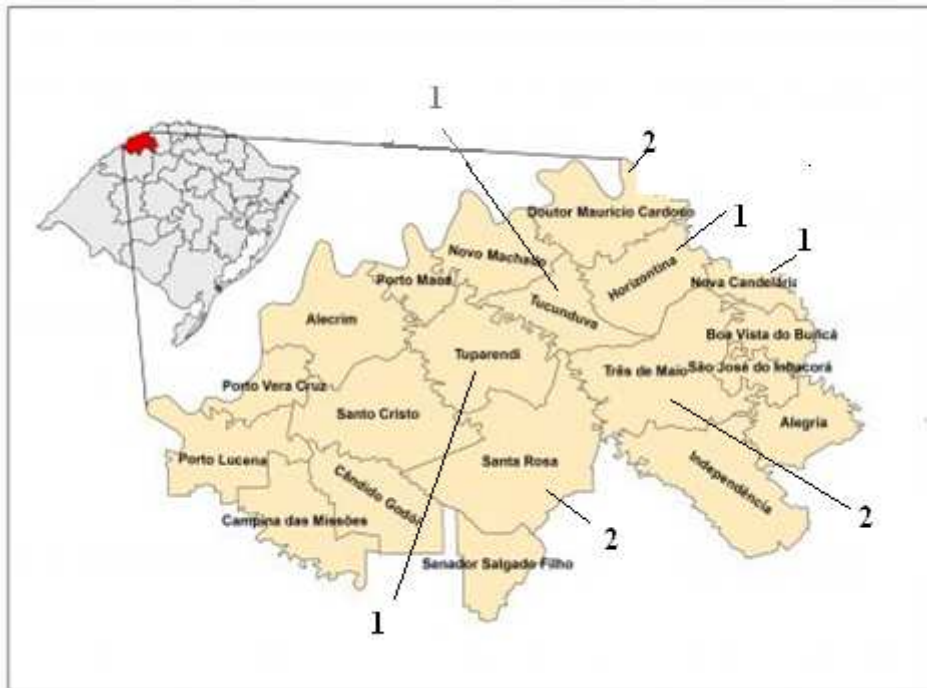


Figura 2 – Mapa geográfico demonstrando a localização e os municípios da Região Fronteira Noroeste do Estado do RS.

O número ligado ao município onde foram realizadas as coletas refere-se ao número de propriedades amostradas.

Fonte: Corede Fronteira Noroeste, 2011.

3.2 Métodos

3.2.1 Isolamento, purificação e armazenamento das BAL

As BAL foram isoladas, das amostras de leite “in natura” e dos queijos artesanais, em trabalho conjunto com Funck (2012). O isolamento foi realizado em ágar De Man, Rogosa e Sharpe – MRS (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), sob anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil) a 35°C por 72h (IDF, 1983). Após este período, foram selecionadas, de cada amostra, cinco colônias pequenas, opacas e arredondadas, características típicas de bactérias ácido lácticas. Estas foram purificadas em ágar MRS (Oxoid). Da placa purificada, foi selecionada uma colônia isolada e esta cultivada em caldo MRS (Oxoid), a 35°C por 24h. O cultivo foi acrescentado de 20% de glicerol (v/v) e armazenado em ultra-freezer a temperatura de – 50°C para testes posteriores de coloração de Gram, catalase, segundo MAPA (2003) e atividade antagonista.

3.2.2 Determinação da atividade antagonista das BAL frente a micro-organismos patogênicos

Os isolados purificados, que foram identificados como Gram-positivos e catalase negativa, foram transferidos para caldo MRS (Oxoid) e cultivados a 35°C por 18 – 24h, para então ser realizada a determinação da atividade antagonista. Estes isolados também foram, anteriormente, testados por Funck (2012).

A fim de verificar a manutenção da capacidade antagonista de tais isolados, os mesmos foram novamente testados quanto à atividade antagonista frente a linhagens de referência Gram positivas: *Listeria monocytogenes* ATCC 7466 e *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, bem como Gram negativas: *E. coli* ATCC 8739, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13076 e a linhagem de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, como controle positivo, tendo como foco principal a verificação da atividade antagonista frente a *Listeria monocytogenes*. O teste de antagonismo e a leitura dos halos de inibição foram realizados de acordo com o teste da gota (*spot-on-the-lawn*) proposto por Jacobsen et al. (1999). Para realização do teste, o sobrenadante dos cultivos foi neutralizado, a fim de eliminar o efeito antagônico ocasionado pela produção de ácido láctico, durante o processo fermentativo e, então, uma alíquota de 5µL de cada cultivo, em caldo MRS (Oxoid), foi inoculada, em forma de gotas, em placas contendo ágar MRS (Oxoid). Após absorção das gotas, as placas foram incubadas a 35°C em jarra de anaerobiose por 24h. Decorrido este período, cada placa recebeu uma sobre camada de 10 mL de ágar BHI (Oxoid) semi-sólido (0,8%) contendo aproximadamente 10^6 UFC.mL⁻¹ da cultura de referência, citada anteriormente, previamente cultivada em caldo BHI (Oxoid) por 24h. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas, em aerobiose, a 35°C por 24h. O resultado positivo para atividade antagonista em relação à cultura de referência e controle positivo foi determinado pela formação de halo de inibição. O diâmetro dos halos foi medido utilizando um paquímetro digital 200 MM-8” (Marca Marberg – China).

3.2.3 Perfil fermentativo dos isolados de BAL

Os isolados com atividade antagonista foram submetidos a teste para verificação de seu perfil fermentativo. A capacidade de fermentar glicose com produção de gás foi determinada em tubos de ensaio contendo tubos de Durham e caldo MRS (Oxoid) suplementado com 3% de glicose. A incubação se deu a 37°C por 48h (LIMA et al., 2009). As culturas de referência, *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 foram usadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Os tubos nos quais os isolados produziram gás, foram caracterizados como heterofermentativos e os que não produziram, foram assinalados como homofermentativos.

3.2.4 Caracterização da natureza proteica das substâncias antimicrobianas produzidas pelas BAL

Com base no teste do antagonismo, os isolados de BAL com atividade antagonista foram testados quanto à natureza proteica das substâncias antimicrobianas produzidas, frente a enzimas (Sigma St. Louis, MO, USA): pepsina, α -quimotripsina e proteinase K, segundo Lewus et al., 1991.

Para isso, inicialmente, os isolados foram cultivados em caldo MRS (Oxoid) a 35°C por 24h. Destas culturas foram inoculadas quatro gotas de 5 μ L, cada, em placas de ágar MRS (Oxoid). As placas foram incubadas em anaerobiose a 35°C por 24h. Decorrido este tempo foram perfurados orifícios de 5mm de diâmetro, a 5mm de distância de cada colônia. Cada orifício foi preenchido com solução de cada uma das enzimas citadas acima a 20mg/mL. Após absorção, as placas receberam uma sobrecamada de ágar BHI (Oxoid) semi-sólido a 0,8% contendo em torno de 10⁶UFC.mL⁻¹ de *Listeria monocytogenes*. Em seguida as placas foram incubadas a 35°C/24h em aerobiose.

A interpretação dos resultados foi feita mediante observação dos halos de inibição, sendo que a retração do halo (formato de meia lua), próximo à enzima, indicou sensibilidade a referida enzima, caracterizando a substância antimicrobiana como sendo de natureza proteica, indicando ser esta, supostamente, uma bacteriocina.

3.2.5 Verificação da capacidade de produção de substâncias antimicrobianas de natureza protéica das BAL, em temperatura de refrigeração

Os isolados de BAL, com atividade antagonista, foram inicialmente inoculados em caldo MRS e incubados sob refrigeração (7 – 10°C) por sete dias. Após este período foi realizado o mesmo procedimento para verificação da produção de substâncias antimicrobianas de natureza proteica, descrito anteriormente.

3.2.6 Caracterização de BAL com potencial probiótico

O potencial probiótico foi testado para aqueles isolados de BAL que apresentaram atividade antagonista frente às cepas de referência de micro-organismos patogênicos, já que esta é uma das condições para classificação de um isolado como probiótico. Para isso foram realizados os seguintes experimentos:

- Resistência a condições ácidas;
- Resistência a sais biliares;
- Tolerância ao fenol;
- Resistência ao trânsito gastrointestinal superior, de forma simulada;
- Capacidade de auto-agregação e hidrofobicidade;
- Atividade da enzima β -galactosidase.

3.2.6.1 Resistência a condições ácidas e sais biliares

A resistência dos isolados sob diferentes condições ácidas foi utilizada como critério de seleção dos isolados mais resistentes para realização sequencial dos demais experimentos, já que inicialmente as BAL probióticas devem resistir às condições ácidas estomacais. Ressalta-se que esta se torna condição essencial quando os micro-organismos não são protegidos por meio de encapsulação. Assim, a resistência dos isolados foi avaliada em caldo MRS (pH 6,5) (Oxoid) ajustado a pH 2 e 2,5 com HCl concentrado e ainda a pH 2,5 + pepsina (Sigma) (3mg/mL).

A avaliação da tolerância bacteriana a sais biliares foi realizada em caldo MRS (Oxoid) suplementado com bile bovina (Sigma) a 0,3% e 1,0% (m/v).

Após preparação dos caldos, conforme tratamentos mencionados acima, culturas de 24 h com concentração final entre 10^6 e 10^7 UFC.mL⁻¹ foram inoculadas

nos mesmos e incubadas a 37°C por 4 horas, juntamente com controles em pH 6,5. A sobrevivência sob diferentes condições foi avaliada por contagem em placas com limite de detecção de $1,7 \log_{10}$ UFC mL⁻¹. Ambas as avaliações seguiram o protocolo de Perelmuter et al. (2008). O percentual de sobrevivência dos isolados frente às diferentes condições ácidas e aos sais biliares foi calculado com base nas contagens de células viáveis iniciais, anterior ao período de incubação.

De acordo com Charteris et al. (1997), foram considerados micro-organismos tolerantes para o teste de sobrevivência à simulação gástrica (resistência às condições ácidas), aqueles que diminuíram, no máximo, em 30% a sua concentração celular e, para o ensaio de sobrevivência ao trânsito intestinal (resistência aos sais biliares), aqueles que apresentaram uma redução de até 1,5 log da sua contagem inicial.

3.2.6.2 Tolerância ao fenol

A habilidade de crescimento na presença de fenol foi realizada utilizando caldo MRS (Oxoid) adicionado de 0,4% de fenol, conforme Pinto et al. (2006). A enumeração das bactérias foi realizada no tempo inicial e após 4 horas de incubação a 37°C.

3.2.6.3 Tolerância ao trânsito gastrointestinal superior, de forma simulada

Um dos isolados, com resistência às condições anteriores, foi selecionado para avaliação de tolerância ao trânsito gastrintestinal superior, de forma simulada, conforme Huang e Adams (2004). As células bacterianas com 24 h de incubação foram separadas por centrifugação (3400rpm por 10min a 4°C), lavadas duas vezes com tampão fosfato pH 7,0 e ressuspensas em solução salina a 0,5%. Uma alíquota de 0,2 mL da suspensão celular foi misturada a 0,3 mL de solução salina e 1,0 mL de suco gástrico ou intestinal simulado e incubada a 37°C. A contagem de células viáveis foi realizada nos tempos inicial e em 15, 30, 60, 120, 180 e 240min para tolerância ao trânsito gástrico e após 240min para a determinação da tolerância ao trânsito no intestino delgado.

O suco gástrico simulado consistiu em pepsina (Sigma) (3mg/mL) e pH 2,5, enquanto, o suco intestinal simulado foi composto por pancreatina (Sigma) (1mg/mL), pH 8,0, com e sem adição de 0,5% de sais biliares (Sigma).

A influência da presença de um alimento, na sobrevivência durante o trânsito gástrico em pH 2,5, foi avaliado da mesma forma, porém, substituindo a solução salina por 0,3mL de leite desnatado reconstituído a 10% (m/v).

3.2.6.4 Capacidade de autoagregação e hidrofobicidade

As propriedades *in vitro* de autoagregação e hidrofobicidade foram realizadas como *screening* inicial para detecção das cepas com capacidade de adesão, como descrito por Collado et al. (2008).

Primeiramente, os isolados foram incubados a 30⁰C/24h em caldo MRS (Oxoid) e então as células foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes e ressuspensas em tampão fosfato pH 7,0 10mmol/L, para se ter uma absorbância de 0,25+/-0,02 a 600nm.

A técnica de autoagregação foi realizada como segue: as suspensões celulares foram incubadas a 37⁰C e os valores de absorbância a 600nm, da camada superior foi medido em diferentes intervalos de tempo (2, 16, 20 e 24h). Os resultados foram expressos em percentual, conforme a fórmula:

$$1 - (A_{600nm} \text{ da suspensão superior} / A_{600nm} \text{ da suspensão bacteriana total}) \times 100$$

A avaliação de hidrofobicidade empregou xileno para determinar a adesão bacteriana ao hidrocarboneto. Para isso, a suspensão celular (3mL) foi agitada em vórtex por 60s com 400µL de xileno. Depois de 2h a 37⁰C, a fase aquosa foi cuidadosamente removida e a absorbância a 600nm foi medida. A hidrofobicidade foi determinada como o percentual de adesão, de acordo com a fórmula:

$$[(A_0 - A) / A] \times 100$$

Onde A₀ e A são as absorbâncias antes e depois da extração com xileno, respectivamente.

3.2.6.5 Atividade da enzima β -galactosidase

A atividade da enzima β -galactosidase foi determinada de acordo com Vinderola e Reinheimer (2003).

Inicialmente, os isolados foram cultivados em caldo MRS (Oxoid) e as células lavadas e permeabilizadas com 1:9 (v/v) tolueno:acetona, através de agitação. Após, as suspensões bacterianas foram incubadas com o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG, Sigma) a 37°C/15min e a reação paralisada com Na_2CO_3 1mol.L⁻¹. Os valores de absorvância foram medidos a 420 e 560nm e os resultados expressos como unidades Miller, como a seguir:

$$\text{Atividade } \beta\text{-galactosidase} = 1000 \times [(A_{420} - 1,75 \times A_{560}) / (15\text{min} \times 1\text{mL} \times A_{1_{560}})]$$

Onde: A1 é a absorvância imediatamente antes e A2 a densidade das células da reação.

3.2.7 Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico e atividade da enzima β -hemolisina

Os isolados de BAL, supostamente bacteriocinogênicos e probióticos foram avaliados quanto a susceptibilidade a antimicrobianos e atividade da enzima β -hemolisina, como fator de virulência.

A avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos foi realizada pelo método de difusão em ágar, utilizando-se o ágar Mueller-Hinton - MH (Merck), conforme descrito por Renye et al. (2009). Foram testados quatro diferentes antibióticos: ampicilina (10 μ g), penicilina G (10 μ g), vancomicina (30 μ g) e tetraciclina (30 μ g) (Laborclin/Brasil).

Os isolados foram inoculados em caldo MRS e incubados a 35°C por 24h. Inoculou-se 0,1mL das culturas com 10⁷ – 10⁸UFC.mL⁻¹ na superfície do Agar MH e, após completa absorção do inoculo, adicionaram-se os discos de antibiótico. As placas de petri foram incubadas a 35°C por 24h e, após esse período, mediram-se os diâmetros das zonas de inibição com auxílio de paquímetro digital 200 MM-8” (Marca Marberg – China), os quais foram expressos em milímetros. Os resultados foram expressos como isolados resistente (R), sensibilidade intermediária (I) ou

sensível (S), com base nos valores de referências indicados pela *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (2005) (Tabela 1).

Tabela 1- Tamanho dos halos de inibição (mm) para classificação dos isolados como Resistente (R), Intermediário (I) e Sensível (S) frente a antimicrobianos.

Antimicrobiano	Halos de inibição (mm)		
	Resistente (R)	Intermediário (I)	Sensível (S)
Ampicilina 10ug	≤ 14	-	≥ 17
Penicilina 10ug	≤ 14	-	≥ 15
Vancomicina 30ug	≤ 14	15 – 16	≥ 17
Tetraciclina 30ug	≤ 14	15 – 18	≥ 19

A atividade da enzima β -hemolisina foi verificada através da visualização de zonas claras ao redor das colônias crescidas em ágar sangue (EATON; GASSON, 2001). Para isso, inicialmente, os isolados foram inoculados em caldo MRS e incubados a 35^oC/24h. Em seguida, os mesmos foram inoculados em placas de ágar tripticase de soja – TSA (Merck) suplementado com 5% de sangue de cavalo e incubados a 37^oC por 24-48h.

3.2.8 Identificação molecular das BAL

Os isolados das BAL, provenientes de leite e queijos artesanais, com características probióticas e bacteriocinogênicas foram identificados molecularmente, junto ao Laboratório de Bioquímica do ICTA/UFRGS, por meio da amplificação, através da técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction) e sequenciamento do rDNA 16S e da região espaçadora intergênica (ITS) do rDNA16S-23S, no caso do isolado Y5. O DNA total foi extraído pelo método do fenol/clorofórmio e as PCRs foram realizadas empregando os primers universais 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), conforme Lisboa et al. (2006) para a amplificação do gene do 16S e os primers 13BF (5'-GTGAATACGTTCCCGGCCT-3') e 6R (5'-GGGTTYCCCCRTTCRGAAAT-3') onde (Y=C ou T, R=A ou G) (Chen et al., 2004) para a amplificação do fragmento correspondente à região ITS. A confirmação da amplificação foi realizada através da migração em gel de agarose 1%. Os produtos das PCRs foram purificados e

enviados para o sequenciamento no laboratório ATCGene (Porto Alegre, Brasil). As seqüências obtidas foram alinhadas no software Clustal X (THOMPSON et al., 1997), editadas no software Bioedit7.0.5.3 (HALL, 1999) para a geração dos *contigs*. A busca por similaridade foi realizada através do algoritmo BLAST presente no site do GenBank (Disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> Acesso em 03 de janeiro de 2013.

3.2.9 Produção de queijos a nível piloto

Foram produzidos queijos a nível piloto sob sete tratamentos diferentes:

- 1- Queijo controle: sem adição de cultura;
- 2- Queijo controle: com adição de *Listeria monocytogenes*;
- 3- Queijo com adição de cultura supostamente bacteriocinogênica, previamente definida;
- 4- Queijo com adição de cultura supostamente bacteriocinogênica, previamente definida, + *Listeria monocytogenes*;
- 5- Queijo com adição de cultura probiótica, previamente definida;
- 6- Queijo com adição de cultura probiótica, previamente definida, + *Listeria monocytogenes*;
- 7- Queijo com adição das culturas, supostamente bacteriocinogênica e probiótica + *Listeria monocytogenes*.

As etapas de produção dos queijos são demonstradas no fluxograma da Figura 3, tendo o experimento sido realizado com três repetições.

O leite cru foi fornecido por uma Plataforma de Recebimento de Leite, de uma Cooperativa do Município de Santa Rosa, RS. As análises físico-químicas, os testes de fraudes e antibióticos foram realizados pelo Laboratório da Plataforma de Recebimento.

Ao chegar ao laboratório, o leite (65L), foi inicialmente pasteurizado, por processo lento, a 63 - 65^oC/30min, em tacho aberto, sob constante agitação. Após resfriamento, o leite foi analisado microbiologicamente, segundo MAPA (2003), quanto à presença de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, Contagem Total de Bactérias e Contagem de Bactérias Ácido Lácticas.

Na sequência, o leite pasteurizado foi dividido em sete lotes conforme os tratamentos mencionados anteriormente. Para cada tratamento foram produzidos cinco queijos, de aproximadamente, 150g cada.

As culturas foram adicionadas em momentos distintos, dependendo de suas características. Desta forma, a cultura supostamente bacteriocinogênica foi adicionada ao leite a 33 – 35^oC e após 20min foram então adicionados os demais ingredientes: cloreto de cálcio a 50% (0,4mL/L), ácido láctico (0,25mL/L) e coalho bovino (0,8mL/L). Já a cultura probiótica e o inóculo de *Listeria monocytogenes* foram adicionados após a dessoragem e imediatamente antes da enformagem.

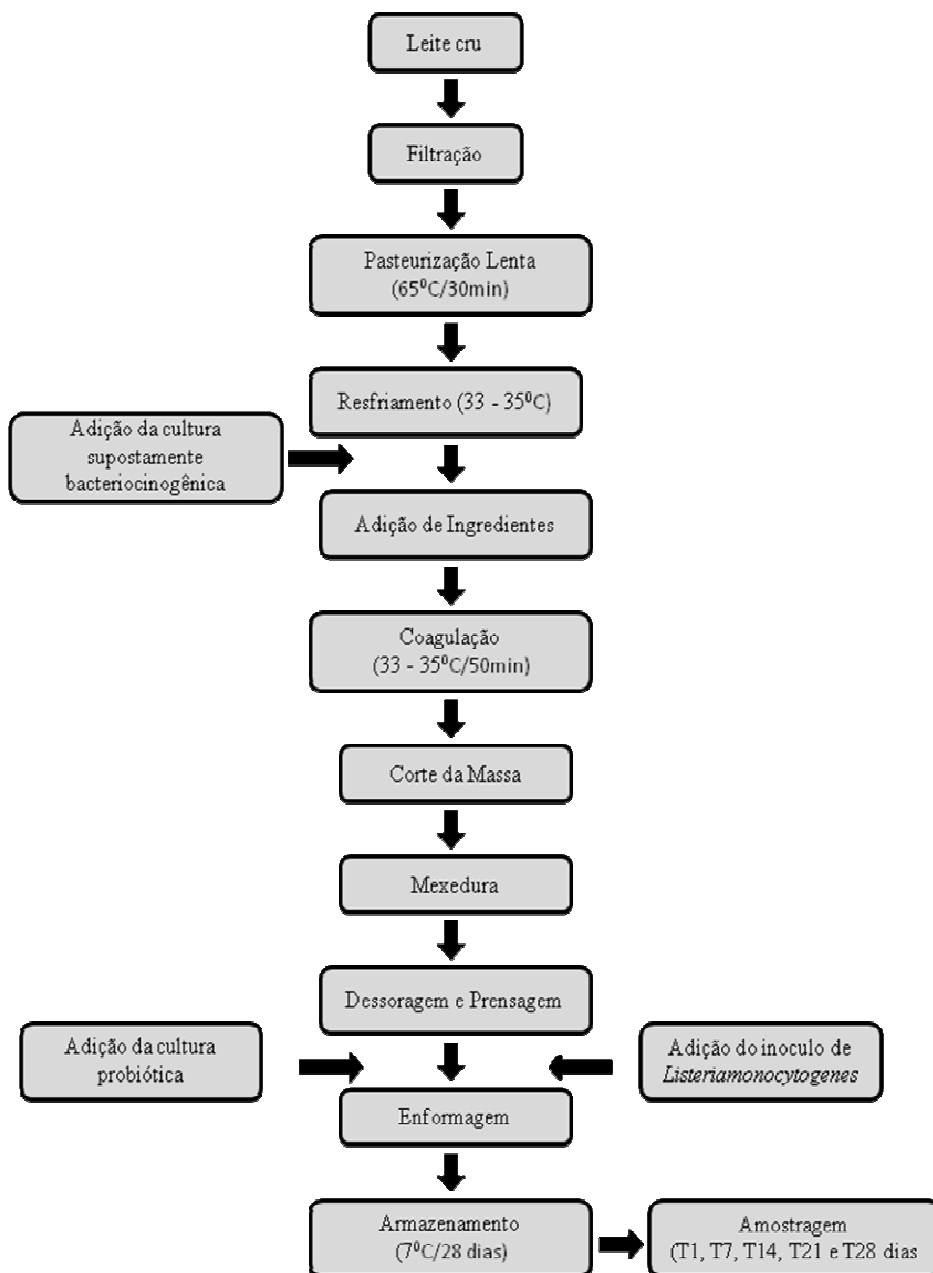


Figura 3- Etapas da produção de queijos a nível piloto, com adição de culturas de BAL e inóculo de *Listeria monocytogenes*.

3.2.10 Preparo dos inoculos

Para preparação dos inoculos e adição da cultura supostamente bacteriocinogênica, da cultura probiótica e de *Listeria monocytogenes* nos queijos, seguiu-se metodologia utilizada por Furtado (2010), com modificações. Para isso, inicialmente, os isolados foram cultivados em 30mL de caldo MRS e BHI, respectivamente, a 35⁰C/24h. Após esse período, as células bacterianas foram separadas por centrifugação (3400rpm por 10min a 4⁰C), lavadas com tampão fosfato pH 7,0 e ressuspendidas em solução salina a 0,5%. O procedimento foi repetido mais duas vezes. A fim de se saber o número de células viáveis, realizou-se diluições decimais de cada cultura, com posterior plaqueamento em superfície de 0,1mL dos inoculos em ágar MRS para as BAL e em ágar Oxford para *Listeria monocytogenes*.

Tomando por base as contagens obtidas, calculou-se o volume de inoculo da cultura, supostamente bacteriocinogênica, a ser adicionado no leite, a fim de se ter uma concentração de 10⁶UFC.mL⁻¹, conforme Furtado (2010).

Para adição da cultura probiótica, optou-se em adicionar o inoculo na massa, após dessoragem, na intenção de não se ter perda significativa de células viáveis, junto ao soro, de acordo com Saad; Cruz; Faria (2011). Assim, com base nas contagens prévias das células, calculou-se o volume a ser adicionado, a fim de se ter uma concentração de 10⁶ – 10⁷ UFC.mL⁻¹, objetivando atingir uma contagem de 10⁸ – 10⁹ UFC/100g no produto final, conforme preconiza a ANVISA (2008), para designação como produto probiótico.

A quantia de inoculo de *Listeria monocytogenes* a ser adicionada foi calculada para se ter uma concentração de 10³ – 10⁴UFC.g⁻¹, conforme Furtado (2010). O inoculo foi adicionado à massa, em capela de fluxo laminar e misturada com movimentos sutis, usando luvas cirúrgicas.

Os queijos foram maturados sobre refrigeração a 7⁰C por 28 dias, sendo coletada uma amostra (um queijo) por tempo de maturação: tempo um (T1), tempo sete (T7), tempo quatorze (T14), tempo vinte e um (T21) e tempo vinte e oito (T28) dias.

A cada coleta, as amostras foram submetidas a análises microbiológicas e físico-químicas.

A análise microbiológica de contagem de bactérias ácido lácticas foi realizada através de plaqueamento em superfície, em Ágar MRS (Oxoid), sob anaerobiose a 35⁰C/24-48h. Já a análise de enumeração de *Listeria monocytogenes* foi realizada apenas nos tratamentos onde foi adicionado o inóculo deste micro-organismo, seguindo metodologia proposta por Pagotto (2001).

As análises físico-químicas de pH, umidade e atividade de água foram realizadas em todas as amostras, ao longo do período de maturação, de acordo com as Normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2004).

3.2.11 Análise estatística

Os resultados dos dados obtidos de experimentos e análises em triplicata foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, com nível de significância de 0,05, utilizando o programa *Statística* (Statsoft versão 7.0).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de BAL

Durante os dois períodos de coleta de amostras de leite “in natura” e queijos artesanais (verão e inverno), foram isoladas cento e doze colônias com características semelhantes de BAL. Estas foram submetidas à caracterização morfológica, teste de coloração de Gram e teste da catalase. De acordo com a Tabela 2, pode-se verificar que 54,46% dos isolados demonstraram-se positivos para coloração de GRAM e negativos para catalase, caracterizando-se como BAL. Destes, 26,23% apresentaram morfologia de bacilos e 73,77% apresentaram morfologia de cocos ou coco-bacilos. Os 44,64% restantes dos isolados não se caracterizaram como BAL.

Tabela 2 - Características fenotípicas (coloração de GRAM, teste de catalase e morfologia celular) de bactérias isoladas de leite e queijos artesanais produzidos na região Fronteira Noroeste do RS.

	Características fenotípicas					
	Coloração de Gram		Teste de Catalase		Morfologia Celular	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Bacilos	Cocos/ Coco-bacilos
Isolados (n/%)	61 (54,46%)	51 (44,64%)	51 (44,64%)	61 (54,46%)	16 (26,23%)	45 (73,77%)

Da mesma forma que neste estudo, em que a maioria dos isolados, demonstrou-se como cocos, também Moraes et al. (2010), ao estudar leite cru e queijos elaborados a partir deste, provenientes da região de Viçosa/MG, isolaram culturas características de BAL e obtiveram predominantemente cocos GRAM positivos e catalase negativa de seus isolados. Lima et al. (2009) avaliou a presença de BAL em queijos Minas artesanais e as espécies mais encontradas em sua pesquisa foram *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae*. Já Souza et al. (2003), analisando queijos artesanais da Serra Gaúcha, encontrou *Lactobacillus* como gênero mais abundante, seguidos de *Enterococcus* e *Lactococcus*.

Além destes, outros autores têm demonstrado que a microbiota nativa encontrada em produtos provenientes de fermentação natural de alimentos de origem animal é bastante diversificada. Segundo Moraes et al. (2010) a população microbiana de cada produto lácteo varia de acordo com a região geográfica onde este é produzido, podendo se atribuir variações em razão do leite utilizado, do clima predominante e dos métodos empregados no processamento.

4.2 Detecção da atividade antagonista dos isolados de BAL

As BAL são utilizadas há muito tempo em alimentos como uma forma de conservação natural. Estas, através de seu metabolismo, transformam carboidratos principalmente em ácido láctico. Porém, outros peptídeos antimicrobianos são produzidos por BAL. Estas substâncias são responsáveis por inibir diversos microrganismos deteriorantes e patogênicos. A pesquisa por BAL que produzam substâncias potencialmente antagônicas é de fundamental importância para aplicação destas como culturas iniciadoras, para produção de alimentos com qualidade e com características que identifiquem determinada região.

Os 54,46% dos isolados que se caracterizaram como BAL foram testados através do teste da gota (*spot-on-the-lawn*) proposto por Jacobsen et al. (1999), quanto a sua atividade antagonista, frente a micro-organismos patogênicos de referência: *E. coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 7466, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13076 e como controle positivo a linhagem de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Do total de isolados, caracterizados como BAL, vinte e um (34,43%), demonstraram atividade antagonista, já que desenvolveram halos de inibição contra todos os micro-organismos testados, conforme Tabela 3. Estes isolados conferem com àqueles, anteriormente encontrados por Funck (2012). Destes, quinze isolados foram provenientes de amostras coletadas no verão e seis de amostras coletadas no inverno. Conforme os dados apresentados também se pode observar que a maioria dos isolados com atividade antagonista foi isolado de queijos com um dia de maturação.

Tabela 3 – Atividade antagonista de BAL nativas de leite e queijos artesanais da região Fronteira Noroeste do RS, frente a patógenos de referência, com base na medida dos halos de inibição.

Isolados com atividade antagonista frente a patógenos					
Isolado	Procedência	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
AC4	V-Q7	30,13 mm	15,83 mm	15,12 mm	18,18 mm
J4	V-L	26,88 mm	19,80 mm	19,50 mm	22,77 mm
R4	V-Q1	29,37 mm	20,41 mm	18,81 mm	21,81 mm
R1	V-Q1	23,64 mm	17,92 mm	16,52 mm	20,19 mm
R3	V-Q1	21,76 mm	19,01 mm	20,26 mm	23,83 mm
Y5	V-Q7	29,57 mm	26,70 mm	26,06 mm	28,23 mm
F4	V-Q7	25,36 mm	16,86 mm	21,94 mm	22,70 mm
E4	V-Q1	29,68 mm	22,17 mm	27,17 mm	25,79 mm
R2	V-Q1	24,15 mm	16,48 mm	20,83 mm	21,72 mm
U4	V-Q1	24,49 mm	20,10 mm	20,74 mm	23,13 mm
P2	V-Q7	21,97 mm	19,89 mm	20,77 mm	23,45 mm
A5	V-L	29,35mm	28,25mm	35,69mm	44,37mm
C4	V-Q7	21,85 mm	18,07 mm	17,54 mm	18,75 mm
U3	V-Q1	27,45 mm	22,24 mm	20,28 mm	21,58 mm
U5	V-Q1	22,75 mm	20,87 mm	19,66 mm	22,40 mm
F9	I-Q7	24,50mm	17,40mm	22,95mm	27,34mm
B6	I-Q1	20,40 mm	30,62 mm	36,98 mm	28,47 mm
I6	I-Q7	22,72 mm	24,12 mm	25,23 mm	20,97 mm
R7	I-Q1	22,20 mm	19,75 mm	24,70 mm	22,58 mm
AB7	I-Q1	18,50 mm	26,78 mm	29,03 mm	34,88 mm
BB9	I-Q1	20,57 mm	29,46 mm	28,53 mm	28,68 mm

V – Amostras coletadas no verão; I – Amostras coletadas no inverno.

L – Leite; Q1 – Queijo com um dia de maturação; Q7 – Queijo com sete dias de maturação.

Outros pesquisadores também observaram atividade antagonista de BAL nativas procedentes de diversos produtos fermentados. Nero et al. (2008) verificaram o potencial antagônico de 360 colônias de BAL isoladas de leite cru e observaram que 25,3% mostraram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e apenas 9,2% demonstraram antagonismo contra *Salmonella Enteritidis*. Os autores sugerem que alimentos com altas populações microbianas nativas interferem diretamente no crescimento e desenvolvimento de patógenos

como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., pois estes precisam de condições muito específicas para crescer.

Meira et al. (2010) avaliaram seis isolados de bactérias lácticas obtidos de leite e queijo de ovelha em relação à atividade antagonista contra seis bactérias patogênicas – *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium – e também contra a bactéria láctica *Lactobacillus fermentum*. Os resultados da atividade antagonista pelo método *spot-on-the-lawn*, evidenciaram que todas as linhagens de BAL exibiram zonas de inibição frente às bactérias indicadoras. Os sobrenadantes das culturas não foram capazes de inibir nenhum dos patógenos testados tanto pelo método *spot-on-the-lawn* quanto pelo método de difusão em ágar. Somente quando empregado o método em placa de micro titulação os sobrenadantes ácidos das linhagens apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos patogênicos. Esses resultados, diferentemente dos encontrados neste trabalho, sugerem que a atividade antagonista dos *Lactobacillus* é principalmente devido ao ácido láctico produzido pelas bactérias lácticas.

4.3 Perfil fermentativo dos isolados de BAL

Os isolados de BAL que apresentaram atividade antagonista frente a patógenos de referência foram submetidos ao teste de fermentação da glicose para determinação de seu perfil fermentativo. Este teste é importante quando se deseja selecionar BAL para uso como culturas iniciadoras.

As bactérias homofermentativas produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação da glicose, enquanto que as heterofermentativas produzem, além de ácido láctico, substâncias como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetileno. É interessante também ressaltar que, no caso específico das BAL heterofermentativas, sua utilização em alimentos é, sobretudo, pela sua capacidade de produzir compostos flavorizantes, muito mais do que pela sua habilidade acidificante (CARR et al., 2002).

O emprego de culturas homo ou heterofermentativas vai depender do tipo de queijo que se deseja produzir, tendo em vista as características de cada variedade. Os queijos artesanais de uma maneira geral apresentam-se com uma massa fechada, sem olhaduras, típico de um processo homofermentativo.

Dos 21 isolados testados, nenhum produziu gás a partir da glicose, o que sugere classificá-los como homofermentativos. Esse resultado é positivo visto que BAL homofermentativas são desejáveis para utilização como culturas iniciadoras, neste tipo de queijo, já que produzem somente ácido láctico evitando problemas de *flavor* decorrentes da formação de ácido acético e características indesejáveis, como olhaduras, causadas pela produção de CO₂.

Khedid et al. (2009) submeteram os isolados de BAL proveniente de leite de camela do Marrocos ao teste do perfil fermentativo e observaram que 68% deles não produziram gás e 32% fermentaram a glicose com formação de gás, caracterizando os isolados como homo e heterofermentativos, respectivamente. Sengun et al. (2009) isolaram de Tarhana, um tradicional produto fermentado a base de iogurte proveniente da Turquia, e caracterizaram 73,5% destes como BAL homo fermentativas. Frâncios et al. (2009) isolaram de leite cru bovino linhagens de BAL e submeteram-nas a caracterização da sua atividade metabólica. Os autores observaram que apenas uma linhagem, *E. durans* S15 foi capaz de produzir gás a partir da glicose. Estes salientam ainda, que linhagens com estas características são impróprias para uso na produção de alguns queijos porque podem causar a formação de olhaduras indesejadas. Souza et al. (2003) isolaram de queijos artesanais um baixo número de lactobacilos heterofermentativos e *Leuconostoc* spp. e sustentaram sua hipótese de que grande número de olhaduras nos queijos são provenientes das altas contagens de coliformes.

4.4 Caracterização da natureza proteica das substâncias antimicrobianas produzidas pelas BAL

Considerando os resultados obtidos no teste do antagonismo, vinte e uma culturas de bactérias ácido lácticas, seis oriundas de amostras do inverno e quinze de verão, supostamente bacteriocinogênicas, foram testadas quanto à natureza proteica das substâncias antimicrobianas produzidas, frente a enzimas (Sigma): pepsina, α -quimotripsina e proteinase K, a 20mg/mL, segundo Lewus et al. (1991), com modificações, usando *Listeria monocytogenes* como micro-organismo indicador.

A confirmação da produção de bacteriocinas pelas culturas se deu pela sensibilidade frente a uma ou mais enzimas, identificada pela retração do halo, com formato de meia lua, próximo à enzima.

A sensibilidade dos isolados de BAL frente às enzimas testadas pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação do caráter proteico das substâncias antimicrobianas produzidas por BAL, com base na susceptibilidade a enzimas proteolíticas.

Isolados	Sensibilidade às enzimas		
	Pepsina	Proteinase K	α – Quimotripsina
BB9 (I)	+	+	+
AB7 (I)	+	+	+
R7 (I)	+	+	+
F9 (I)	+	+	+
I6 (I)	+	+	+
B6 (I)	-	-	-
U5(V)	-	-	-
U3 (V)	-	-	-
U4 (V)	-	-	-
R3 (V)	-	-	-
R2 (V)	-	-	-
F4 (V)	-	-	-
E4 (V)	-	-	-
J4 (V)	-	-	-
P2 (V)	-	-	-
R1 (V)	+	+	+
C4 (V)	-	-	-
AC4 (V)	-	+	+
Y5 (V)	-	-	-
A5 (V)	-	-	-

(+): indica sensibilidade do isolado frente à enzima; (-): indica que o isolado não se mostrou sensível frente à enzima. (I): isolado proveniente de amostra coletada no inverno; (V): isolado proveniente de amostra coleta no verão.

De acordo com os dados obtidos, constatou-se que sete dos isolados (33,33%) com atividade antagonista, demonstram ser capazes de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica, frente à *Listeria monocytogenes*, sendo caracterizados como supostamente produtores de bacteriocinas. Destes, cinco isolados foram oriundos de amostras coletadas no inverno e dois de amostras coletadas no verão. Em relação ao tipo de amostra, três dos isolados foram provenientes de queijos com sete dias de maturação e quatro isolados foram provenientes de queijos com um dia de maturação.

Os resultados deste estudo são semelhantes aos encontrados por Schittler (2012), que isolando e caracterizando BAL de leite “in natura” do oeste de Santa Catarina, observou que 36% dos seus isolados com atividade antagonista frente à *Listeria monocytogenes*, apresentarem-se capazes de produzir bacteriocinas. Em contra-partida demonstrou um percentual superior de isolados com capacidade de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica, em relação a trabalho similar desenvolvido por Ortolani (2009), que detectou 14,9% dos isolados de leite cru e queijo frescal com sensibilidade a enzimas proteolíticas, sendo estes classificados como supostamente produtores de bacteriocinas. Furtado (2010), através do isolamento de BAL de queijo frescal de leite de cabra, também obteve percentual inferior aos encontrados neste estudo, tendo identificado 10% de seus isolados como sendo produtores de bacteriocinas.

Desta forma, percebe-se que os isolados de queijos artesanais da região Fronteira Noroeste do RS, apresentam potencial promissor para serem usados como conservantes naturais devido sua habilidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes*.

4.5 Verificação da capacidade de produção de bacteriocinas sob refrigeração

Os isolados de BAL testados previamente quanto à natureza proteica das substâncias antimicrobianas produzidas foram também testados quanto a sua capacidade de produzir tais substâncias sob temperatura de refrigeração (7 -10⁰C) em um período de sete dias de incubação. Na Tabela 5 pode se observar a sensibilidade das BAL, frente às enzimas testadas, nestas condições.

Comparando-se os resultados apresentados na Tabela 5 com os apresentados na Tabela 4, observa-se que os isolados se mostraram capazes de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica, mesmo em temperatura de refrigeração. Porém, em relação ao isolado BB9, pode-se observar que o mesmo não foi capaz de produzir tais substâncias com sensibilidade frente à α -quimotripsina e à proteinase K, quando sob refrigeração. Ainda, o isolado AC4 não produziu substâncias antimicrobianas de natureza proteica na temperatura de refrigeração frente à enzima pepsina.

Tabela 5 – Sensibilidade dos isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) frente a enzimas proteolíticas, após incubação a 7 – 10⁰C por sete dias.

Isolados	Sensibilidade às enzimas		
	Pepsina	Proteinase K	α – Quimotripsina
BB9 (I)	+	-	-
AB7 (I)	+	+	+
R7 (I)	+	+	+
F9 (I)	+	+	+
I6 (I)	+	+	+
R1 (V)	+	+	+
AC4 (V)	-	+	+

(+): indica sensibilidade do isolado frente à enzima; (-): indica que o isolado não se mostrou sensível frente à enzima. (I): isolado proveniente de amostra coletada no inverno; (V): isolado proveniente de amostra coleta no verão.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Furtado (2010) que em trabalho similar, também verificou esta capacidade em seus isolados de queijo frescal de leite de cabra. Isso demonstra que tais cepas são promissoras para o controle de *Listeria monocytogenes* em queijos refrigerados.

A fim de selecionar um dos isolados capaz de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica frente a enzimas proteolíticas, usando *Listeria monocytogenes*, como micro-organismo indicador, foi considerada a atividade antagonista frente a este patógeno, analisando os halos de inibição, conforme Tabela 03 e ainda a capacidade de produzir substâncias supostamente bacteriocinogênicas sob refrigeração, conforme Tabela 05.

De acordo com estes resultados, os isolados BB9 e AC4 não foram considerados para serem utilizados como culturas supostamente bacteriocinogênicas, já que não demonstraram manutenção da capacidade de produção de substâncias antimicrobianas de natureza protéica sob temperaturas de refrigeração, frente a todas as enzimas testadas (pepsina, proteinase K e α – quimotripsina). Além disso, o isolado AC4 não pode ser utilizado, por perda de viabilidade até o momento da análise, conforme Tabela 13. Os isolados AB7 e R1, também foram desconsiderados já que estes foram identificados, conforme Tabela 13, como *Phyllobacterium myrsinacearum* e *Phyllobacterium catacumbae*, respectivamente. O gênero *Phyllobacterium* foi descrito pela primeira vez por Knösel, em 1962 e inclui espécies que se desenvolvem dentro de nódulos de plantas ornamentais tropicais, sendo algumas classificadas como bactérias promotoras de

crescimento vegetal (MERGAERT; CNOCKAERT; SWINGS; 2002). Assim, pressupõe-se que a presença de tais isolados nos queijos possa ser decorrente de contaminação, já que os mesmos são produzidos com leite cru e, na maioria dos casos, sem condições adequadas de higiene.

Dentre os demais isolados (R7, F9 e I6) que apresentaram capacidade de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica, mesmo sob temperatura de refrigeração e que foram identificados, como *Enterococcus durans*, conforme Tabela 14, optou-se pelo isolado F9, por este apresentar maior halo de inibição (24,50mm) frente à *Listeria monocytogenes*, micro-organismo indicador utilizado neste estudo.

4.6 Identificação de isolados de BAL com potencial probiótico

Para a triagem inicial de potenciais bactérias probióticas, testes *in vitro* são recomendados pela FAO/WHO (2001).

As bactérias probióticas fornecidas por meio de sistemas alimentares devem primeiramente sobreviver durante a passagem pelo trato gastrintestinal para, então, persistirem no intestino e promover efeitos benéficos ao hospedeiro. Para isso, devem apresentar como critérios funcionais: tolerância à acidez e a sais biliares e capacidade de adesão à mucosa intestinal. Adicionalmente, atividade antagonista é outro requisito fundamental para a sobrevivência no intestino (REINHEIMER, 2003; HUANG; ADAMS, 2004; VINDEROLA; SCHILLINGER et al., 2005).

4.6.1 Tolerância ao pH ácido

Cerca de 2,5L de suco gástrico a um pH de aproximadamente 2,0 é secretado diariamente no estômago, o que causa a destruição de muitos micro-organismos ingeridos, já que a maioria é sensível em valores de pH abaixo de 3,0. Normalmente, os alimentos permanecem no estômago entre 2 a 4 horas, entretanto, a digestão de líquidos no estômago é mais rápida que a dos sólidos, levando apenas 20 minutos. Neste sentido, a resistência ao trânsito gástrico humano é um importante critério de seleção para micro-organismos probióticos (REINHEIMER, 2003; HUANG; ADAMS, 2004; VINDEROLA).

Na Tabela 6 são apresentadas as contagens de células viáveis em $\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ e os percentuais de sobrevivência dos isolados que se apresentaram mais resistentes às diferentes condições ácidas testadas, após 4h de incubação. Os demais isolados de BAL que apresentaram atividade antagonista, também foram testados quanto à sua resistência a tais condições. No entanto, os resultados não são apresentados, por terem apresentado baixa ou nenhuma contagem de células viáveis após os tratamentos, o que sugere tratarem-se estes, de isolados não resistentes à passagem pelo estômago.

Tabela 6 – Sobrevivência (%S) das BAL, isoladas de leite e queijos artesanais, a diferentes condições ácidas, após quatro horas de incubação, com base na contagem de células viáveis.

Isolado	pH 2,0			pH 2,5		pH 2,5 + pepsina 0,3%	
	Controle $\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$	$\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$	% S	$\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$	% S	$\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$	% S
A5	6,72±0,007 ^a	4,7 ±0,06 ^b	10,68	5,68±0,007 ^c	92,23	5,70±,09 ^{cd}	97,08
U3	6,66±0,06 ^a	5,27±0,05 ^b	38,46	5,4 ±0,05 ^c	43,08	5,19±0,01 ^{cd}	23,85
U4	8,25±5,23 ^a	5,23±0,07 ^b	25,56	5,67±0,10 ^c	71,43	5,72±0,08 ^{cd}	69,17
U5	6,34±0,02 ^a	5,45±0,21 ^b	46,15	5,64±0,04 ^{bc}	66,92	5,77±0,04 ^{cd}	89,23
Y5	7,09±0,04 ^a	N.D. ^b	0	6,03±0,18 ^c	28,57	6,10±0,03 ^{cd}	32,73

N.D: Não detectado

Limite de detecção = 1,7 $\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$

Valores de contagem de células viáveis expressos como médias de triplicatas ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Como observado, o isolado Y5, proveniente de queijo com sete dias de maturação e identificado como *Lactobacillus plantarum* (Tabela 13), não foi capaz de se desenvolver em pH 2,0 após 4h de incubação, o que vem ao encontro de outros estudos, nos quais linhagens de *Lactobacillus* foram capazes de reter sua viabilidade a valores de pH entre 2,5 e 4,0, mas apresentaram perda de viabilidade a valores de pH inferiores (HWANHLEM et al., 2010; MEIRA, et al., 2012).

Os demais isolados (A5), proveniente de uma amostra de leite “in natura” e (U3, U4 e U5), provenientes de amostras de queijos com um dia de maturação e, identificados como *Enterococcus faecium* (Tabela 13) foram capazes de sobreviver em todas as condições ácidas a que foram submetidos, sendo que os maiores percentuais de sobrevivência se observaram em pH 2,5 e em pH 2,5 adicionado de pepsina a 0,3%. A contagem de células viáveis ($\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$) não diferiu nestes

dois tratamentos a um nível de significância de 0,05, enquanto em relação ao controle todos os isolados se mostram afetados pelas condições ácidas, tendo uma diminuição de 1 a 3 ciclos logarítmicos na contagem de células.

De acordo com Charteris et al. (1997), percentual de redução inferior a 30% da população inicial, torna-se condição essencial para classificação de um microrganismo como resistente às condições de *stress* estomacal. Assim, os isolados A5, U5 e U4 foram os que se mostram mais resistentes a estes tratamentos, tendo uma redução de 5,35, 21,92 e 29,7%, respectivamente, no número de células viáveis (\log_{10} UFC.mL⁻¹). Redondo (2008), investigando características probióticas *in vitro* de *E. faecium* CRL 183, encontrou perda de viabilidade, deste isolado, de aproximadamente 20% ao final das 3 horas.

Cabe ainda ressaltar que estes isolados foram provenientes, unicamente, de amostras coletadas no verão. Nenhum dos isolados de amostras coletadas no inverno se mostrou resistente a tais condições ácidas.

4.6.2 Tolerância a sais biliares

Outra barreira que as bactérias probióticas devem transpor é a bile presente no intestino delgado, no qual o tempo de trânsito do alimento é geralmente entre 1 a 4 horas. Os sais biliares são os principais componentes da bile, capazes de desorganizar a estrutura de membranas celulares e, dessa forma, tóxicos às células vivas (BEGLEY et al., 2006).

Na Tabela 7 se observa através da contagem de células viáveis e do percentual de sobrevivência, a tolerância dos isolados de BAL frente à bile bovina a 0,3% e 1,0%, após quatro horas de incubação. Todos os isolados foram capazes de se desenvolver em ambas as concentrações de bile, mas se mostraram afetados pela presença da mesma, tendo seu crescimento sido significativamente diferente ($p < 0,05$) do controle. Houve redução de 1 a 2 ciclos logarítmicos na contagem de unidades formadoras de colônias, nos tratamentos contendo bile.

Para classificação dos isolados como resistentes aos sais biliares, estes devem apresentar uma redução de até 1,5 log da sua contagem inicial, segundo Charteris et al. (1997). Assim, os isolados A5, U3, U5 e Y5 foram considerados resistentes ao tratamento com bile bovina, sendo que os isolados U3, U4 e U5 não

apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quanto ao crescimento a 0,3 e 1,0% de bile bovina.

Tabela 7 – Avaliação da sobrevivência (%S) de BAL frente a diferentes concentrações de bile, com base na contagem de células viáveis, após quatro horas de incubação.

Isolado	Controle	Bile bovina 0,3%		Bile bovina 1,0%	
	$\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$	$\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$	% S	$\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$	% S
A5	$6,72 \pm 0,007^a$	$5,69 \pm 0,05^b$	95,15	$5,53 \pm 0,05^c$	65,05
U3	$6,66 \pm 0,06^a$	$5,65 \pm 0,01^b$	68,46	$5,56 \pm 0,07^b$	56,15
U4	$8,25 \pm 0,08^a$	$5,51 \pm 0,04^b$	48,87	$5,46 \pm 0,04^b$	43,61
U5	$6,34 \pm 0,02^a$	$5,65 \pm 0,07^b$	59,23	$5,65 \pm 0,04^b$	68,46
Y5	$7,09 \pm 0,04^a$	$6,52 \pm 0,01^b$	85,71	$6,27 \pm 0,13^c$	49,35

Valores de contagem de células viáveis expressos como médias de triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Estes resultados são promissores e demonstram o potencial de tais isolados serem utilizados como probióticos, já que a concentração de sais biliares de 0,15 a 0,3% tem sido recomendada para a avaliação *in vitro* da passagem pelo intestino delgado (HUANG; ADAMS, 2004). Meira (2010), em avaliação do potencial probiótico de BAL isoladas de leite e queijo de ovelha, verificou que as bactérias isoladas foram capazes de tolerar apenas baixas concentrações dos sais biliares (0,1 e 0,3%) e somente uma linhagem apresentou contagem celular acima do limite de detecção após exposição a 0,5% de sais biliares. Para a concentração de 1% da mistura de sais, nenhuma das linhagens alcançou viabilidade acima do limite de detecção após 4 horas de incubação.

4.6.3 Tolerância ao fenol

O fenol é um produto catabólico de aminoácidos aromáticos e tem atividade bacteriostática (PINTO et al., 2006). Sendo assim, a tolerância das BAL foi testada frente a este, a fim de servir como mais um fator de classificação das mesmas como potenciais bactérias probióticas. Na Tabela 8 pode ser observado que o crescimento dos isolados foi pouco afetado pela presença do fenol, sendo que o percentual de

sobrevivência variou de 82,30 a 100%, com exceção do isolado A5, com sobrevivência de apenas 56,25% após 4h de incubação com fenol 0,4%.

Tabela 8 – Avaliação de sobrevivência (%S) de BAL frente ao fenol 0,4%, após quatro horas de incubação, com base na contagem de células viáveis.

Isolado	T0	T4	% S
	$\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$	$\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$	
Y5	6,45 ± 0,02	6,5 ± 0,28	100
A5	5,75 ± 0,01	5,50 ± 0,01	56,25
U5	5,74 ± 0,13	5,67 ± 0,01	82,30
U3	5,47 ± 0,15	5,57 ± 0,05	100
U4	5,81 ± 0,03	5,75 ± 0,06	87,50

Valores expressos como média de triplicatas ± Desvio Padrão.

4.6.4 Identificação dos isolados mais resistentes às barreiras biológicas *in vitro*

Os isolados de BAL, com potencial probiótico, evidenciado pelos testes de resistência às barreiras biológicas *in vitro*, realizados anteriormente, foram comparados em relação aos percentuais de sobrevivência, a fim de se indicar aquele com maior resistência a todos os tratamentos empregados.

Na Figura 4, são demonstrados os percentuais de sobrevivência dos isolados frente aos diferentes tratamentos. Os valores estão expressos como a média das condições ácidas (pH 2,5 e pH 2,5 + pepsina 0,3%) e do fenol (0,4%).

Para facilitar a identificação dos isolados mais resistentes foi traçada uma linha junto ao percentual 70, já que de acordo com Charteris et al. (1997), percentual de redução inferior a 30% da população inicial, permite classificar um micro-organismo como resistente às condições de *stress* estomacal.

Desta forma, percebe-se que os isolados resistentes, em ordem decrescente, às condições ácidas são A5 > U5 > U4.

Em relação ao fenol, usando o mesmo parâmetro de avaliação, já que não há um parâmetro específico, observa-se que os isolados mais resistentes, em ordem decrescente são: U3 = Y5 > U4 > U5 > A5.

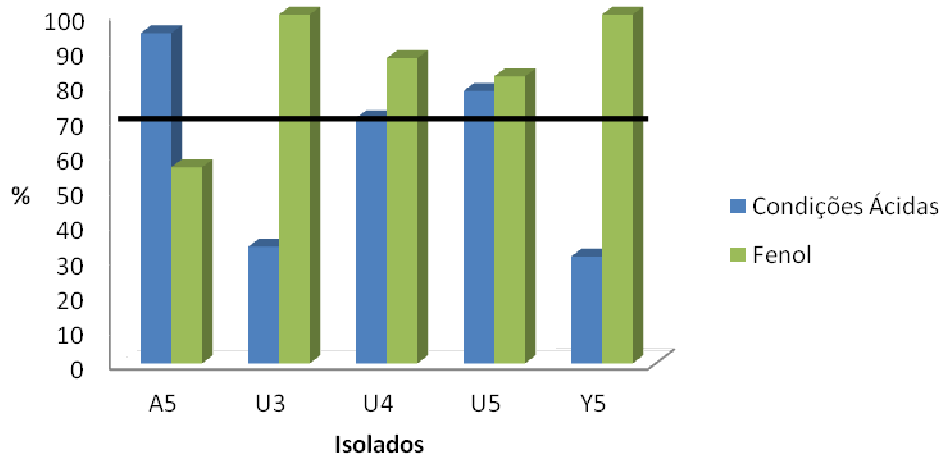


Figura 4 – Variação dos percentuais de sobrevivência de BAL com base na susceptibilidade a condições ácidas e ao fenol.

Para classificação de um micro-organismo como resistentes aos sais biliares, Charteris et al. (1997) preconiza que este deve apresentar uma redução de até 1,5 log da sua contagem inicial.

Assim, de acordo com a Tabela 9, se observa, segundo a redução logarítmica, em relação à contagem inicial de células viáveis ($\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$), que os isolados mais resistentes a bile 0,3% foram, em ordem decrescente, $A5 > Y5 > U5 = U3 > U4$. Já em relação a bile 1,0%, o grau de resistência decresce do isolado $U5 > U3 > Y5 > U4 > A5$.

Desta forma, pode-se dizer que o isolado U5 é o mais resistente frente a maiores concentrações de bile.

Através da comparação dos percentuais de sobrevivência dos isolados frente aos diferentes tratamentos ácidos e ao fenol, bem como, quanto à redução logarítmica frente à bile, pode-se identificar que o isolado U5 foi o que apresentou maior resistência, sendo então utilizado para avaliação de sua tolerância ao trânsito gástrico superior simulado.

Tabela 9 - Redução logarítmica no número de células viáveis de BAL após exposição à bile.

Isolado	Contagem		Redução logarítmica	Bile 1,0%	Redução Logarítmica
	Inicial (log ₁₀ UFC.mL ⁻¹)	Bile 0,3%			
A5	5,71 ± 0,01 ^a	5,69 ± 0,05 ^a	0,02	5,23 ± 0,05 ^b	0,48
U3	5,82 ± 0,05 ^a	5,65 ± 0,01 ^b	0,17	5,56 ± 0,07 ^{bc}	0,26
U4	5,83 ± 0,02 ^a	5,51 ± 0,04 ^b	0,32	5,46 ± 0,04 ^{bc}	0,37
U5	5,82 ± 0,05 ^a	5,65 ± 0,07 ^b	0,17	5,65 ± 0,04 ^{bc}	0,17
Y5	6,59 ± 0,04 ^a	6,52 ± 0,01 ^a	0,07	6,27 ± 0,13 ^b	0,32

Valores de contagem de células viáveis expressos como médias de triplicatas ± desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.6.5 Tolerância ao trânsito gastrointestinal superior, de forma simulada

O isolado U5, considerado o mais resistente frente aos tratamentos anteriores, foi utilizado para avaliação de tolerância ao trânsito gastrointestinal superior, de forma simulada. Para isso, o isolado foi submetido inicialmente a um suco gástrico artificial (pH 2,5 + pepsina 3mg/mL) ao longo de 4h de incubação, avaliando-se a tolerância do mesmo nos tempos: T0, T15, T30, T60, T120, T180 e T240min. Paralelamente foi avaliada a tolerância do isolado, nestas mesmas condições, acrescida a presença de um alimento, no caso, leite desnatado, reconstituído a 10%. O comportamento do isolado pode ser visualizado na Figura 6.

O isolado também foi avaliado quanto a sua tolerância a um suco intestinal artificial (pH 8,0 + pancreatina 1mg/mL) e (pH 8,0 + pancreatina 1mg/mL + bile 0,5%) após 240min de incubação.

Na Tabela 10, são apresentados os valores das contagens de células viáveis (log₁₀UFC.mL⁻¹) no decorrer de 240min de incubação sob condições gástricas, com e sem adição de leite e condições intestinais artificiais, com e sem bile, bem como os percentuais de sobrevivência do isolado U5.

Pelos dados apresentados, em relação ao suco gástrico artificial, observa-se que até 60min após a incubação não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na contagem de células viáveis entre os tratamentos com a presença de alimento, no caso leite, e na ausência deste. A partir de 120min a diferença torna-se significativa ($p < 0,05$), observando-se nitidamente a influência positiva do alimento no suco

gástrico artificial, conforme se pode também observar na Figura 5. No tempo de 120min, na ausência de alimento, a sobrevivência das células caiu para 15% em relação à concentração inicial, enquanto na presença deste, o número de células aumentou. Nos tempos 180 e 240min, o crescimento microbiano continuou ocorrendo, chegando praticamente a dobrar a população no tempo 180min. Em contrapartida, na ausência de alimento, nestes mesmos tempos, não se detectou crescimento do isolado.

Esses dados estão de acordo com o que preconiza a literatura e com outros autores. Ranadheera et al. (2010) estabelece que o alimento influencia o crescimento, a viabilidade e sobrevivência, a tolerância ao ácido e à bile e diferenciada funcionalidade dos probióticos, o que determina sua eficácia no trato gastrointestinal. No estudo de Pinto et al. (2006), entre as variáveis que afetam a sobrevivência bacteriana durante um modelo de passagem pelo estômago, o veículo alimento foi considerado importante e adotado na avaliação *in vitro*. Meira (2010), também observou a ação protetora dos componentes do leite em seu estudo com isolados de leite de cabra e atribui o fato, possivelmente, pelo aumento do pH (acima de 5) provocado pela adição do leite.

Tabela 10 - Sobrevivência (%S) do isolado U5, em distintos intervalos de exposição ao suco gástrico artificial, com e sem alimento, e suco intestinal artificial, com e sem bile.

Tempos (min)	Suco Gástrico Artificial				Ausência de Bile
	Ausência de Alimento (leite)		Presença de Alimento (leite)		
	$\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$	%S	$\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$	%S	$\log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$
0	$7,66 \pm 0,01^a$	100	$7,64 \pm 0,04^a$	100	$7,73 \pm 0,08^A$
15	$7,63 \pm 0,02^a$	93,48	$7,58 \pm 0,07^a$	79,59	-
30	$7,71 \pm 0,03^a$	113,04	$7,66 \pm 0,04^a$	93,88	-
60	$7,69 \pm 0,11^a$	108,70	$7,76 \pm 0,01^a$	118,37	-
120	$6,84 \pm 0,08^a$	15	$7,91 \pm 0,03^b$	167,35	-
180	N.D. ^a	0	$7,98 \pm 0,01^b$	191,84	-
240	N.D. ^a	0	$7,90 \pm 0,01^b$	163,27	$7,98 \pm 0,02^A$
Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.					Médias seguidas de letras distintas, na mesma linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

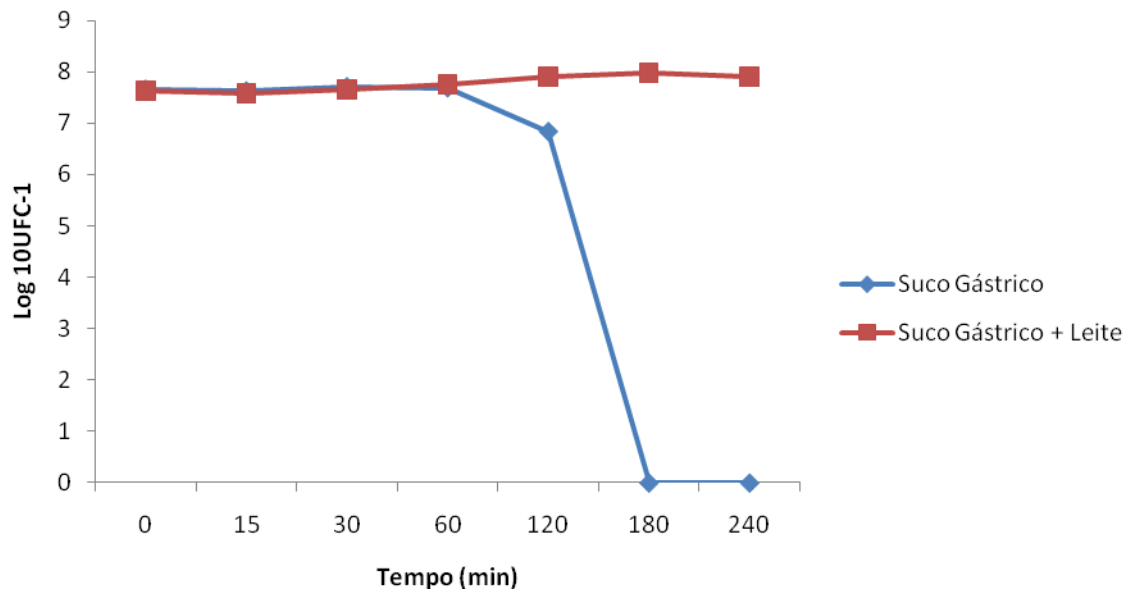


Figura 5 – Avaliação da sobrevivência do isolado U5 frente a suco gástrico artificial e suco gástrico artificial acrescido de leite, com base na contagem de células viáveis.

A avaliação de resistência do isolado U5 frente ao suco intestinal artificial, conforme Tabela 10 demonstrou que na presença de bile (0,5%), o mesmo teve seu crescimento significativamente afetado ($p < 0,05$) quando comparado àquele na ausência de bile, com redução de 1 ciclo logarítmico na contagem de células viáveis. Em relação à concentração inicial de células, o isolado U5 apresentou um percentual de sobrevivência de 20,34% ao suco intestinal artificial acrescido de bile, enquanto na ausência desta, o número de células viáveis aumentou, chegando a praticamente dobrar a população.

4.6.6 Capacidade de adesão

A aderência da bactéria probiótica à mucosa intestinal, como primeiro passo para assegurar ao menos uma colonização temporária, é considerada de grande importância para possibilitar os efeitos benéficos à saúde a ela atribuídos. Há indícios de que este critério funcional esteja relacionado ao aumento da habilidade de estimulação do sistema imune (SCHILLINGER et al., 2005).

A adesão pode ocorrer às diferentes partes da superfície da mucosa intestinal: células epiteliais, camada de muco e/ou matriz extracelular. Como compostos mediadores da adesão se destacam as adesinas. Em geral, as adesinas apresentam natureza hidrofóbica e assim, o grau de hidrofobicidade da superfície

celular é muitas vezes medido, porque pode favorecer a colonização às superfícies da mucosa intestinal (associado, algumas vezes, com a capacidade de autoagregação) e exercer papel na adesão a células epiteliais e proteínas na matriz extracelular (VÉLEZ et al., 2007). Porém, Schillinger et al. (2005) afirmam ao avaliar 19 linhagens de *Lactobacillus* que a hidrofobicidade pode ser útil na adesão, mas não constituiu um pré-requisito para a forte capacidade de aderência.

Autoagregação parece ser necessária para a adesão de linhagens probióticas às células epiteliais e a habilidade de co-agregação podem formar uma barreira para prevenir a colonização por patógenos (COLLADO et al., 2008).

Na Tabela 11 são demonstradas as propriedades de adesão “in vitro”: autoagregação e hidrofobicidade dos isolados de BAL, provenientes de leite e queijos artesanais.

Tabela 11 - Propriedades de adesão (autoagregação e hidrofobicidade) de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de leite e queijos artesanais.

Isolado	% Autoagregação				% Hidrofobicidade
	2h	16h	20h	24h	
A5	16,00±1,3	54,00±0,9	62,00±0,7	62,00±0,8	69,16±3,4
U3	13,30±2,1	60,00±1,2	77,00±1,5	70,00±1,8	57,89±2,6
U4	12,00±0,8	57,00±2,3	57,00±1,4	48,00±2,3	80,14±3,7
U5	20,00±1,4	55,00±1,2	55,00±2,1	59,00±0,6	70,10±1,5
Y5	19,60±2,0	44,50±1,0	51,15±1,7	56,70±1,3	70,55±2,1

Valores expressos como média de triplicatas ± desvio padrão.

De acordo com os resultados percebe-se que após 16h de incubação os isolados apresentaram capacidade de autoagregação, de no mínimo 50%. O isolado U3 demonstrou ser o com maior capacidade de autoagregação, 70% após 24h. No entanto, este e o isolado U4 apresentaram redução na capacidade autoagregativa após 24h, em relação ao tempo de incubação de 20h. Já os isolados A5, U5 e Y5, mantiveram esta capacidade ao longo do tempo, atingindo 62, 59 e 56,7% de autoagregação ao final de 24h. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Meira et al. (2012), onde isolados de queijos de ovelha, também apresentaram percentuais de autoagregação superior a 50%, após 24h de incubação.

Em relação à hidrofobicidade, Tamang et al. (2009) classificou como bactérias hidrofóbicas aquelas com percentual de hidrofobicidade maior que 70%. Desta forma, de acordo com a Tabela 11, os isolados U4, U5 e Y5, poderiam ser assim classificados, já que os mesmos apresentaram percentuais de 80,14%, 70,10% e 70,55% de hidrofobicidade, respectivamente.

Diante destes resultados, os isolados U5 e Y5 podem ser indicados como aqueles com melhor comportamento em relação à manutenção da propriedade de autoagregação e maior percentual de hidrofobicidade. Estes isolados foram identificados, de acordo com a Tabela 13, como *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus plantarum*, respectivamente.

4.6.7 Atividade da enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase (β -gal) catalisa a hidrólise da lactose em seus monômeros galactose e glicose, resultando em aplicações para melhoria de características tecnológicas e sensoriais de alimentos, como aumento da solubilidade e redução de risco de cristalização em leite condensado.

Nutricionalmente, a β -gal permite a ingestão de alimentos contendo lactose por pessoas intolerantes a esse carboidrato. A intolerância à lactose consiste na ausência de produção de β -gal pelo intestino delgado provocando sintomas caracterizados por diarreia, flatulência e dor abdominal devido à lactose não digerida, geralmente utilizada pelas bactérias do intestino produzindo ácidos orgânicos e gases (HONDA et al., 2007). No Brasil, apesar de poucos estudos, a incidência de intolerantes à lactose entre a população está entre 46 e 67% (GRANATO et al., 2010). Dessa forma, alimentos adicionados da enzima pura ou fermentados com culturas produtoras de β -gal são capazes de melhorar a digestão da lactose com pouco ou nenhum efeito adverso.

Vinderola e Reinheimer (2003), em estudo sobre características probióticas de bactérias lácticas caracterizaram uma cultura *starter* de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, e uma cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* com as maiores produções da enzima β -gal (2053 Miller units) e (1301 Miller units), respectivamente. A cultura probiótica por eles estudada, com menor produção foi a de *Lactobacillus casei*, enquanto nenhuma espécie de *Lactococcus* demonstrou produzir β -gal.

Também no presente estudo, onde os isolados A5, U3, U4 e U5 foram identificados como *Enterococcus*, houve baixa ou nenhuma produção da enzima β -gal, conforme Figura 6. Já o isolado Y5, identificado como *Lactobacillus plantarum* demonstrou uma atividade superior da enzima β -gal (115 Miller units).

A maioria das espécies de lactobacilos são produtoras desta enzima (HONDA et al., 2007). Meira et al. (2012), pesquisando a atividade da enzima β -gal, de isolados de BAL, provenientes de queijos de ovelha, encontraram como menor valor o de 47,7 unidades Miller, para *L. casei* SM-H e valores mais elevados, de 1941 e 2503 unidades Miller, para *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. plantarum* SM-I, respectivamente.

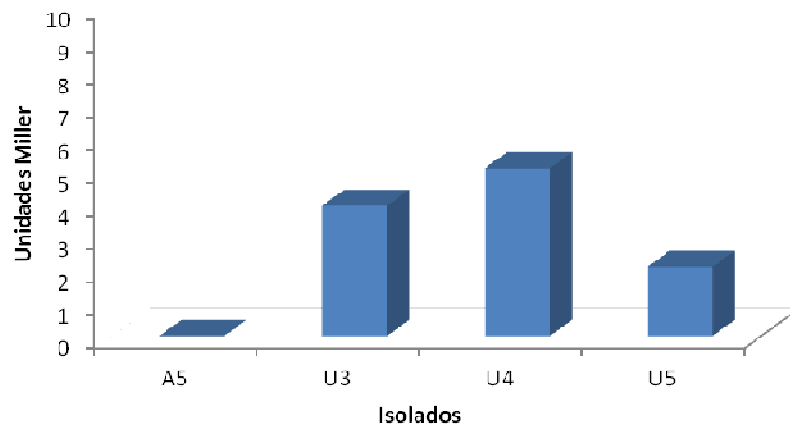


Figura 6 - Atividade da enzima β -gal dos isolados de bactérias ácido lácticas (BAL), identificados como *Enterococcus*.

4.6.8 Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos e da atividade da β -hemolisina

Os enterococos podem ser utilizados como culturas probióticas ou como culturas iniciadoras pelas indústrias de alimentos, entretanto, alguns isolados podem ser patogênicos ao homem e animais (OGIER; SERROR, 2008). Desta forma, é importante que isolados de *Enterococcus* sejam avaliados quanto à susceptibilidade a antimicrobianos e a atividade da enzima β -hemolisina.

Neste sentido, nove isolados de *Enterococcus*, alguns com características probióticas e outros de serem bacteriocinogênicos, foram avaliados quanto à susceptibilidade frente a antimicrobianos de uso clínico. De acordo com a Tabela 12, do total de isolados, 89% se demonstrou sensível à ampicilina, 78% à tetraciclina, 67% à vancomicina e 44% à penicilina. A maior resistência foi observada em relação

à penicilina (56%), sendo que todos os isolados com características bacteriocinogênicas se mostraram resistentes a este antimicrobiano. Já dos isolados com características probióticas, 20% se mostraram resistentes à penicilina.

Outros trabalhos também têm buscado demonstrar a sensibilidade de isolados de *Enterococcus* frente a antimicrobianos de uso clínico. Schittler (2012) observou que 94% dos 16 isolados de BAL, provenientes de leite “in natura” demonstraram sensibilidade a ampicilina, 81% a tetraciclina e 100% a vancomicina. Peters et al. (2003), verificaram que 100% dos 118 isolados de *Enterococcus* de alimentos de origem animal, na Alemanha, foram sensíveis aos antibióticos ampicilina e vancomicina. Da mesma forma, Renye et al. (2009), nos EUA, relataram que todos os 33 isolados de *Enterococcus* obtidos de queijo apresentaram sensibilidade a vancomicina. Cariolato et al. (2008) relataram que nenhum dos 81 isolados de *Enterococcus* provenientes de derivados de leite, no norte da Itália, apresentou resistência à penicilina e 30,8% apresentaram resistência a tetraciclina.

De acordo com Giraffa (2002, 2003), a resistência bacteriana a antibióticos está relacionada com o uso destas drogas na terapêutica humana e veterinária. No Brasil, a penicilina é utilizada em larga escala no tratamento de mastite do gado bovino, o que pode explicar os resultados encontrados neste estudo (ZAFALON et al., 2008).

Ressalta-se que para que um isolado de *Enterococcus* seja utilizado como uma cultura iniciadora ou probiótica, além da sensibilidade aos antimicrobianos, se faz necessário avaliar alguns outros fatores de virulência, como a presença da atividade da enzima β -hemolisina.

Neste estudo, nenhum dos isolados apresentou atividade da enzima β -hemolisina (Tabela 12). Embora a ausência da atividade dessa enzima não signifique, necessariamente, que o isolado não possui potencial patogênico, tendo em vista que pode possuir outros fatores de virulência (FRANZ, 2001), esta é uma das características fenotípicas comumente utilizadas como marcador de sua patogenicidade. Outros autores, como Poeta et al. (2007), também não encontraram isolados apresentando atividade da β -hemolisina, e relatam que esta enzima é mais frequentemente encontrada em isolados de origem clínica. Entretanto, Barbosa et al. (2010) e Eaton e Gasson (2001), relatam a presença dessa enzima em isolados de *Enterococcus* provenientes de alimentos.

Tabela 12 - Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e atividade da β -hemolisina de bactérias ácido lácticas (BAL), com características bacteriocinogênicas e probióticas.

Isolados	Susceptibilidade a Antimicrobianos				Atividade β -hemolisina
	Ampicilina	Penicilina	Vancomicina	Tetraciclina	
	10 μ g	10 μ g	30 μ g	30 μ g	
R7 (B)	S	R	I	R	-
I6 (B)	S	R	R	S	-
BB9 (B)	S	R	S	S	-
F9 (B)	S	R	S	S	-
Percentual de Sensibilidade dos Isolados Bacteriocinogênicos					
Sensível (S) (n/%)	4/100	0/0	2/50	3/75	
Intermediário (I) (n/%)	0/0	0/0	1/25	0/0	
Resistente (R) (n/%)	0/0	4/100	1/25	1/25	
Y5 (P)	R	R	R	R	-
A5(P)	S	S	S	S	-
U5 (P)	S	S	S	S	-
U4 (P)	S	S	S	S	-
U3 (P)	S	S	S	S	-
Percentual de Sensibilidade dos Isolados Probióticos					
Sensível (S) (n/%)	4/80	4/80	4/80	4/80	
Intermediário (I) (n/%)	0/0	0/0	0/0	0/0	
Resistente (R) (n/%)	1/20	1/20	1/20	1/20	
Percentual de Sensibilidade Total: Isolados Probióticos e Bacteriocinogênicos					
Sensível (S) (n/%)	8/89	4/44	6/67	7/78	
Intermediário (I) (n/%)	0/0	0/0	1/11	0/0	
Resistente (R) (n/%)	1/11	5/56	2/22	2/22	

4.6.9 Identificação molecular das BAL

De acordo com a Tabela 13, percebe-se que a maioria dos isolados, deste estudo, com características bacteriocinogênicas, foram identificados como *Enterococcus durans*. Dois isolados foram identificados como espécies pertencentes ao gênero *Phyllobacterium*. Segundo Mergaert; Cnockaert; Swings (2002), bactérias pertencentes a este gênero são comumente encontradas em nódulos de plantas ornamentais tropicais. Isso leva a concluir que tenha havido uma possível contaminação durante a produção dos queijos. Estudos similares têm mostrado uma diversificação de gêneros e espécies, como o de Schittler (2012), onde houve predominância de *E. faecium* em amostras de leite “in natura”, da região oeste de Santa Catarina. Já os resultados obtidos por Ortolani (2009), demonstraram que *L. lactis* foi a BAL, com características bacteriocinogênica prevalente em leite “in natura” da região de Viçosa, MG. Esses resultados corroboram outros estudos que relatam a interferência do local de isolamento sobre a predominância de certos gêneros/espécies de micro-organismos, bem como destacam o potencial que existe para se isolar bactérias com capacidade para serem utilizadas como bioconservadoras, nas diferentes bacias leiteiras do Brasil.

Levando-se em consideração as grandes diferenças entre as regiões brasileiras produtoras de leite, tanto em clima, quanto em manejo do gado leiteiro, infere-se que esses fatores podem influenciar decisivamente na microbiota presente e, por consequência, no tipo e potencial bacteriocinogênico das BAL isoladas.

Entre os isolados de BAL, provenientes de leite e queijos artesanais da Região Fronteira Noroeste do Estado do RS, com características probióticas, a grande maioria dos isolados (quatro de cinco) foram identificados como *Enterococcus faecium* e apenas um como *Lactobacillus plantarum*. Diferentemente, Meira (2011), demonstrou que BAL, provenientes de leite e queijos de ovelha, com potencial probiótico, pertenciam ao gênero *Lactobacillus*, entre eles *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*.

Tabela 13 - Identificação por 16S rDNA dos isolados de BAL e através da região ITS para o isolado Y5, com características bacteriocinogênicas e probióticas.

Cepas	Característica	Origem	Identificação por 16S rDNA
BB9	Bacteriocinogênica	Queijo T1	<i>Enterococcus durans</i> (99%)
R7	Bacteriocinogênica	Queijo T1	<i>Enterococcus durans</i> (99%)
F9	Bacteriocinogênica	Queijo T7	<i>Enterococcus durans</i> (99%)
I6	Bacteriocinogênica	Queijo T7	<i>Enterococcus durans</i> (98%)
AC4	Bacteriocinogênica	Queijo T7	N.I.
R1	Bacteriocinogênica	Queijo T1	<i>Phyllobacterium catacumbae</i> (98%)
AB7	Bacteriocinogênica	Queijo T1	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (98%)
A5	Probiótica	Leite	<i>Enterococcus faecium</i> (99%)
U3	Probiótica	Queijo T1	<i>Enterococcus faecium</i> (99%)
U4	Probiótica	Queijo T1	<i>Enterococcus faecium</i> (99%)
U5	Probiótica	Queijo T1	<i>Enterococcus faecium</i> (95%)
Cepas	Característica	Origem	Identificação pelo ITS 16S-23S
Y5	Probiótica	Queijo T7	<i>Lactobacillus plantarum</i> (99,9%)

N.I. – Não identificado.

5 ELABORAÇÃO DOS QUEIJOS A NÍVEL PILOTO

5.1 Qualidade do leite

O leite cru fornecido e analisado, pela plataforma de recebimento, em relação aos parâmetros físico-químicos listados na Tabela 14, demonstrou estar de acordo com os padrões para leite cru, estabelecidos pela Instrução Normativa 62, do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2011).

Tabela 14 – Condições físico-químicas do leite cru fornecido pela plataforma de recebimento, para elaboração dos queijos a nível piloto.

Parâmetros Físico-químicos	Resultados	IN 62 doMAPA
Acidez (g de ácido láctico/100mL)	0,15	0,14 a 0,18
Índice Crioscópico (⁰ H)	0,536	- 0,530 ⁰ H a -0,550 ⁰ H
Densidade a 15 ⁰ C (g/ml)	1,030	1,028 a 1,034
Gordura (g/100g)	3,7	Mín. 3,0
Proteína Total (g/100g)	3,3	Mín. 2,9
Sólidos Não Gordurosos (ESD) (g/100g)	8,5	Mín. 8,4
Antibióticos	Ausência	Ausência
Reconstituintes	Ausência	Ausência
Redutores	Ausência	Ausência
Conservantes	Ausência	Ausência

Este leite foi filtrado e pasteurizado de forma lenta a 63 – 65⁰C/30min e então analisado microbiologicamente quanto aos parâmetros listados na Tabela 15. Os resultados demonstraram que o processo de pasteurização foi eficiente na eliminação dos micro-organismos patogênicos pesquisados, atendendo o que estabelece a Instrução Normativa 62, do Ministério da Agricultura (BRASIL 2011), para leite pasteurizado.

Tabela 15 – Condições microbiológicas do leite pasteurizado utilizado para fabricação dos queijos

Parâmetro	Resultado	IN 62 do MAPA
Contagem total de bactérias mesófilas (UFC/mL)	$< 1,0 \times 10^2$	$8,0 \times 10^4$
Contagem de bactérias lácticas (UFC/mL)	$< 1,0 \times 10^2$	-----
Coliformes totais (NMP/mL)	$< 0,3$	4
Coliformes termotolerantes (NMP/mL)	$< 0,3$	2
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/mL)	$< 1,0 \times 10^2$	-----
<i>Salmonella</i> spp./25mL	Ausência	Ausência
<i>Listeria monocytogenes</i> /25mL	Ausência	-----

5.2 Elaboração dos queijos

Após o processo de pasteurização, o leite foi utilizado para fabricação dos queijos a nível piloto, conforme descrito no item 4.2.9.

As culturas foram preparadas conforme descrito no item 4.2.10, inoculando os isolados F9 (10^6 UFC.g⁻¹) e U5 (10^6 – 10^7 UFC.g⁻¹), como supostamente bacteriocinogênico e probiótico, respectivamente. O inóculo de *Listeria monocytogenes* foi adicionado de forma a se atingir uma concentração de 10^3 – 10^4 UFC.g⁻¹.

Os queijos, elaborados a nível piloto, com adição de *Listeria monocytogenes*, cultura supostamente bacteriocinogênica e cultura probiótica, bem como queijo isento destes micro-organismos (controle), foram avaliados em relação ao desenvolvimento das bactérias lácticas e da ação destas sobre a *Listeria monocytogenes*, ao longo de um período de maturação de 28 dias, sob refrigeração. Os parâmetros físico-químicos: pH, Aw e umidade, também foram avaliados.

5.2.1 Contagens de bactérias lácticas

Os isolados de BAL, com características probióticas e supostamente bacteriocinogênicas se mostraram capazes de sobreviver ao longo do período de maturação, conforme contagens de células viáveis, apresentadas na Tabela 16.

De acordo com estes dados pode-se observar que o queijo contendo apenas o isolado probiótico apresentou uma leve diminuição na contagem de bactérias lácticas, no tempo sete, em relação ao tempo um, sendo que nos tempos quatorze (14 dias) e vinte e um (21 dias), o número de bactérias lácticas viáveis, não foi significativamente diferente ao tempo um ($p > 0,05$). No tempo vinte e oito (28 dias), houve uma redução na contagem de células, embora não diferente estatisticamente ($p > 0,05$) do tempo sete. Ao final do período de maturação verificou-se uma contagem logarítmica de $7,32\text{UFC.g}^{-1}$. Esse valor permite afirmar que tal cultura pode ser utilizada com o propósito probiótico, já que é capaz de permanecer viável no produto final em quantia suficiente para exercer seus efeitos benéficos, cerca de 10^8 a $10^9\text{UFC}/100\text{g}$ de produto, conforme recomenda a legislação em vigor (ANVISA, 2008).

Da mesma forma, o queijo contendo a cultura probiótica, adicionado de *Listeria monocytogenes*, também manteve uma contagem de bactérias lácticas na ordem de 10^7UFC.g^{-1} , não diferindo estatisticamente do tratamento sem adição de *Listeria monocytogenes* ($p > 0,05$), o que demonstra que este micro-organismo patogênico não interferiu na multiplicação e sobrevivência da cultura probiótica.

O queijo contendo somente a cultura bacterionogênica e aquele contendo esta adicionado da *Listeria monocytogenes* apresentaram comportamento similar em relação à contagem de bactérias lácticas ao final do período de maturação, na ordem de 10^7UFC.g^{-1} , não diferindo estatisticamente entre os tratamentos ($p > 0,05$). No queijo somente com adição da cultura bacteriocinogênica, não houve diferença estatística na contagem de bactérias lácticas entre os tempos vinte e oito e um dia ($p > 0,05$). Já no queijo com a cultura bacteriocinogênica, adicionado de *Listeria monocytogenes*, a multiplicação da bactéria láctica foi maior, tendo seu número significativamente maior no tempo vinte e oito, em relação ao tempo um ($p < 0,05$).

Furtado (2010), em estudo similar, adicionando cultura bacteriocinogênica em queijo fresco, também obteve contagens de bactérias lácticas de 10^7UFC.g^{-1} , ao final de dez dias de estocagem.

No tratamento onde foram adicionadas as duas culturas, probiótica e bacteriocinogênica, a contagem de bactérias lácticas também ficou em torno de 10^7UFC.g^{-1} ao final do período de maturação, não diferindo estatisticamente dos tratamentos anteriores ($p > 0,05$), onde as culturas foram utilizadas isoladamente.

Isso demonstra que as duas culturas de BAL, podem ser utilizadas concomitantemente na fabricação de queijos.

Tabela 16 - Desenvolvimento das BAL ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$), com características probióticas e supostamente bacteriocinogênicas, nos queijos submetidos a diferentes tratamentos, ao longo do período de maturação de 28 dias.

Contagens de células viáveis de BAL ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$)					
Tratamentos/ Tempos	T1	T7	T14	T21	T28
C	0	0	0	0	0
C + L	0	0	0	0	0
P	7,98 ±	7,49 ± 0,02 ^{aCD}	7,66 ± 0,02 ^{bBC}	8,08 ± 0,02 ^{aA}	7,32 ± 0,02 ^{aD}
P + L	7,57 ± 0,03 ^{bB}	7,47 ± 0,02 ^{aB}	8,08 ± 0,04 ^{aA}	7,11 ± 0,02 ^{cC}	7,26 ± 0,02 ^{aBC}
B	6,99 ± 0,03 ^{cB}	7,08 ± 0,02 ^{bB}	7,11 ± 0,03 ^{cB}	7,67 ± 0,02 ^{abA}	7,28 ± 0,02 ^{aB}
B + L	6,89 ± 0,03 ^{cC}	6,67 ± 0,58 ^{cC}	7,50 ± 0,02 ^{bB}	7,9 ± 0,02 ^{abA}	7,38 ± 0,03 ^{aB}
P + B + L	7,15 ± 0,01 ^{cC}	7,60 ± 0,05 ^{aAB}	7,36 ± 0,02 ^{bBC}	7,83 ± 0,03 ^{abA}	7,23 ± 0,04 ^{aC}

C = Controle; C + L = Controle + Listeria; P = Probiótica; P + L = Probiótica + Listeria; B = Bacteriocinogênica; B + L = Bacteriocinogênica + Listeria; P + B + L = Probiótica + Bacteriocinogênica + Listeria.

Valores expressos como média de triplicatas ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na mesma linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5.2.2 Enumeração de *Listeria monocytogenes*

As culturas de bactérias lácticas probiótica e supostamente bacteriocinogênica, utilizadas como inoculo, nos diferentes tratamentos, foram analisadas quanto a sua ação antagonista frente à *Listeria monocytogenes*. A Tabela 17 mostra a contagem de células viáveis deste micro-organismo, ao longo do período de maturação dos queijos.

Pelos dados apresentados e conforme Figura 7, verifica-se que nos tratamentos controle e naquele contendo cultura probiótica, a contagem de *Listeria monocytogenes* se manteve constante nos tempos um e sete, aumentando a partir daí seu número de células viáveis. Do tempo quatorze até o tempo vinte e oito as contagens não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$), chegando a 10^5UFC.g^{-1} no final do período de maturação. Isso demonstra que a cultura probiótica não exerceu papel antagonista capaz de inibir o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*.

Nos tratamentos contendo a cultura supostamente bacteriocinogênica, as contagens de *Listeria monocytogenes* não diferiram daquelas do controle até o tempo sete, sendo que a partir do tempo quatorze, estas foram estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) às do controle, com redução de um ciclo logarítmico. Este valor permaneceu praticamente constante, não apresentando diferença significativa até o final do período de maturação, na ordem de 10^4UFC.g^{-1} . Os queijos contendo cultura supostamente bacteriocinogênica e associação desta com a cultura probiótica, demonstraram comportamento semelhante, sem diferença significativa ao tratamento em que apenas a cultura bacteriocinogênica foi adicionada ($p > 0,05$). Isso demonstra que o efeito antagônico frente à *Listeria monocytogenes* foi mesmo promovido pela cultura supostamente bacteriocinogênica.

Tabela 17- Enumeração de *Listeria monocytogenes* ($\log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$) nos queijos submetidos a diferentes tratamentos, ao longo do período de maturação de 28 dias.

Contagens de células viáveis de <i>Listeria monocytogenes</i> ($\log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$)					
Tratamentos/ Tempos	T1	T7	T14	T21	T28
C + L	4,23 ± 0,02 ^{aC}	4,41 ± 0,02 ^{aC}	5,45 ± 0,03 ^{aAB}	5,75 ± 0,01 ^{aA}	5,39 ± 0,02 ^{aB}
P + L	4 ± 0,05 ^{aB}	4,27 ± 0,02 ^{aB}	5,36 ± 0,03 ^{aA}	5,49 ± 0,02 ^{aA}	5,36 ± 0,02 ^{aA}
B + L	4 ± 0,15 ^{aC}	4,27 ± 0,04 ^{aC}	4,78 ± 0,08 ^{bB}	4,84 ± 0,02 ^{bB}	4,80 ± 0,04 ^{bB}
P + B + L	4,07 ± 0,03 ^{aB}	4,14 ± 0,03 ^{aB}	4,85 ± 0,02 ^{bA}	4,80 ± 0,02 ^{bA}	4,84 ± 0,03 ^{bA}

C + L = Controle + Listeria; P + L = Probiótica + Listeria; B + L = Bacteriocinogênica + Listeria; P + B + L = Probiótica + Bacteriocinogênica + Listeria.

Valores expressos como média de triplicatas ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na mesma linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

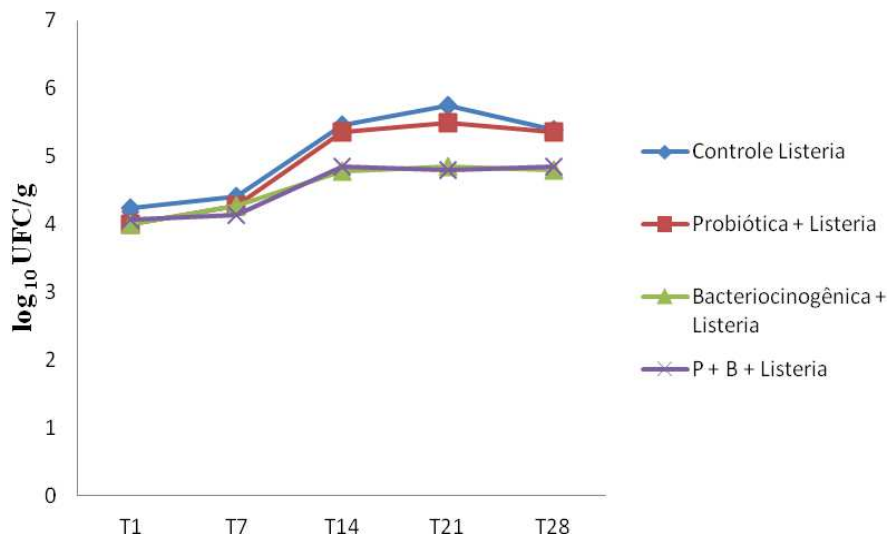


Figura 7 – Enumeração (\log_{10} UFC.g⁻¹) de *Listeria monocytogenes* nos queijos com adição de cultura probiótica, supostamente bacteriocinogênica e associação destas.

Embora não tenha sido possível eliminar a contaminação por *Listeria monocytogenes* nos queijos, os dados levam a concluir que a cultura supostamente bacteriocinogênica tenha, realmente, exercido seu papel antagonista frente a este microrganismo patogênico, vindo a minimizar sua multiplicação durante o processo de maturação, conforme Figura 7.

Furtado (2010), pesquisando a ação de uma cultura bacteriocinogênica sobre *Listeria monocytogenes*, em queijo fresco, obteve resultado semelhante, em que o número de células viáveis do micro-organismo patogênico não aumentou durante a estocagem, embora não tenha sido possível a sua eliminação.

Segundo Galvez et. al. (2007), a produção de bacteriocinas “in situ” depende de vários fatores físico-químicos, como pH, temperatura, A_w , presença de O₂, CO₂, etc., assim como fatores relacionados à estrutura ao processamento do alimento. Além disso, a interação da cepa bacteriocinogênica com os demais micro-organismos presentes no alimento, também podem interferir na capacidade de produção de bacteriocina (SCHILLINGER et al., 1996).

5.2.3 Valores de atividade de água (A_w) e umidade

A classificação dos queijos é baseada no conteúdo de matéria gorda no extrato seco e no conteúdo de umidade (BRASIL, 1996). A perda gradual de umidade ocorre durante a maturação de queijos, causada pela evaporação na

superfície do queijo (FALLICO et al., 2006), o que leva a uma diminuição da atividade de água e aumento nos teores de sólidos totais. Os teores de gordura, proteína, cinzas e cloreto de sódio aumentam ao longo da maturação, evidenciado, sobretudo, quando os cálculos são feitos com base na matéria seca (MADRAU et al., 2006).

A fabricação de queijo é, essencialmente, um processo de desidratação do leite, no qual a caseína, a gordura e os sais minerais são concentrados de 6 a 12 vezes. Cerca de 90% da água presente no leite é removida (AQUARONE et al., 2001)

A atividade de água é entendida como a relação, em dada temperatura e, em equilíbrio, entre a pressão de vapor do solvente na solução e aquela do solvente em estado puro. Desta forma, a A_w pode ser alterada por fenômenos de desidratação ou por adição de eletrólitos, como sal, ou outros solutos à solução.

A atividade de água se constitui em um importante parâmetro de regulação do processo de maturação dos queijos, sendo influenciada pelo teor de umidade, teor de sal e índice de maturação do queijo (relação entre o nitrogênio não protéico/nitrogênio total). Durante a maturação, os queijos perdem água por evaporação, diminuindo o teor de umidade e conseqüentemente a A_w . O abaixamento da A_w diminui a intensidade de do fenômeno da maturação, já que enzimas proteolíticas e lipolíticas são sensíveis a baixos valores de A_w . As enzimas do coalho, renina e pepsina, que atuam, sobretudo, no início do processo de maturação, são também sensíveis ao abaixamento da A_w (FURTADO, 1991).

Na Tabela 18 é possível observar os valores médios de atividade de água nos queijos ao longo de vinte e oito dias de maturação.

Tabela 18 - Valores médios de atividade de água, nos queijos submetidos aos diferentes tratamentos, durante a maturação.

Valores médios de atividade de água					
Tratamentos/ Tempos(dias)	T1	T7	T14	T21	T28
Controle	0,874 ± 0,004 ^{aA}	0,846 ± 0,004 ^{cB}	0,838 ± 0,002 ^{bBC}	0,828 ± 0,003 ^{cCD}	0,820 ± 0,005 ^{cD}
Controle + Listeria	0,875 ± 0,004 ^{aA}	0,864 ± 0,002 ^{bA}	0,868 ± 0,003 ^{aA}	0,869 ± 0,003 ^{aA}	0,847 ± 0,001 ^{aB}
Probiótica	0,827 ± 0,002 ^{dA}	0,785 ± 0,004 ^{eC}	0,800 ± 0,010 ^{dB}	0,828 ± 0,002 ^{cA}	0,818 ± 0,003 ^{cA}
Probiótica + Listeria	0,842 ± 0,003 ^{cA}	0,799 ± 0,003 ^{eC}	0,821 ± 0,002 ^{cB}	0,829 ± 0,004 ^{cAB}	0,827 ± 0,005 ^{bcB}
Bacteriocinogênica	0,864 ± 0,002 ^{abA}	0,831 ± 0,002 ^{dC}	0,835 ± 0,004 ^{bcC}	0,852 ± 0,002 ^{bAB}	0,841 ± 0,003 ^{abBC}
Bact. + Listeria	0,855 ± 0,005 ^{bcAB}	0,849 ± 0,005 ^{cAB}	0,859 ± 0,002 ^{aAB}	0,862 ± 0,003 ^{abA}	0,842 ± 0,002 ^{aB}
Bact. + Prob. + Listeria	0,878 ± 0,003 ^{aA}	0,877 ± 0,015 ^{aA}	0,867 ± 0,004 ^{aAB}	0,858 ± 0,004 ^{abB}	0,854 ± 0,001 ^{aB}

Valores expressos como média de triplicatas ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na mesma linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O queijo controle, sem adição de *Listeria monocytogenes*, apresentou diminuição significativa da Aw ($p < 0,05$) após sete dias de armazenamento, vindo então a diminuir de forma gradativa, mas sem diferença significativa ($p > 0,05$) ao longo do período de maturação, atingindo ao final de 28 dias, valor de 0,82. Os queijos contendo a cultura probiótica e bacteriocinogênica, sem adição de *Listeria monocytogenes*, também apresentaram redução nos valores de atividade de água, nos sete primeiros dias de maturação, tendo o queijo com cultura probiótica maior redução. A partir daí, os queijos com estas culturas demonstraram acréscimo nos valores de atividade de água, tendo o queijo com cultura bacteriocinogênica apresentado valor superior e significativamente diferente do controle ($p < 0,05$), no final do período de maturação. Já o queijo com cultura probiótica, ao final do período de maturação, não diferiu significativamente ($p > 0,05$) do controle, em relação ao valor de atividade de água.

Nos queijos contendo *Listeria monocytogenes*, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), entre o controle e o queijo com cultura bacteriocinogênica, bem como aquele com cultura bacteriocinogênica mais probiótica, atingindo-se ao final do período de maturação um valor de atividade de água de aproximadamente 0,84. Este valor foi significativamente maior ($p > 0,05$) que àquele encontrado no queijo controle sem adição de *Listeria monocytogenes*, mas não diferente daquele encontrado no queijo com cultura bacteriocinogênica sem adição de *Listeria monocytogenes*.

Em relação à umidade, pode se constatar, de acordo com os dados da Tabela 19, que os queijos tiveram redução em seu teor durante o período de maturação, em todos os tratamentos empregados, tendo o queijo controle apresentado menores valores, em torno de 29%, no final da maturação. De acordo com a Portaria 146, de 1996, do MAPA que estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, os queijos com teor de umidade de até 35,9%, são classificados como queijos com baixo teor de umidade ou ainda, como queijos duros. No entanto, os queijos ditos coloniais costumam apresentar teores de umidade maior, entre 36 e 45,9%, sendo classificados como queijos semi-duros. Os baixos valores de umidade encontrados neste experimento podem estar associados ao pequeno tamanho dos queijos (em torno de 150g cada), o que teria acarretado maior perda de umidade.

Funck (2012), caracterizando os queijos artesanais, produzidos na região Fronteira Noroeste do estado do RS, encontrou valor médio de umidade de 45% para queijos com dez dias de maturação. De acordo com a Tabela 19, observa-se que os queijos elaborados neste projeto, com tempo de maturação entre sete e quatorze dias apresentaram valores médios de umidade entre 40 e 50%, assemelhando-se aqueles queijos artesanais produzidos na região.

Os queijos contendo cultura probiótica e bacteriocinogênica, sem adição de *Listeria monocytogenes*, não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), em relação à umidade, no final do período de maturação, atingindo valor médio de 32,60%, conforme Figura 8.

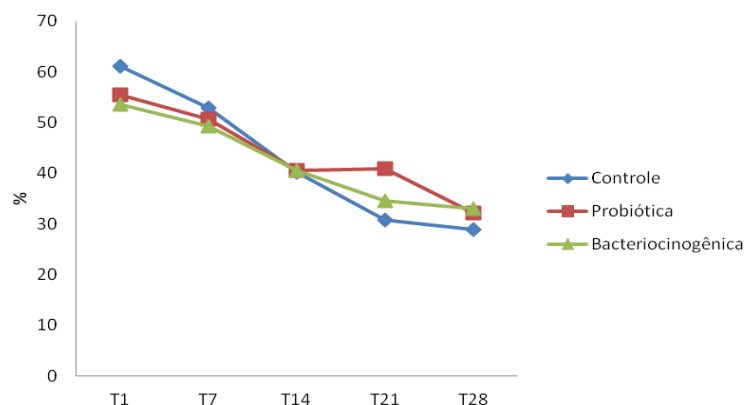


Figura 8 – Teores (%) médios de umidade dos queijos, nos diferentes tratamentos, ao longo do período de maturação.

A presença de *Listeria monocytogenes* nos queijos, conferiu a estes um teor médio de umidade levemente superior (33,18%), mas sem diferença significativa

daqueles sem este microrganismo patogênico ($p > 0,05$), com exceção da cultura probiótica adicionada de *Listeria*, cujo valor da umidade foi significativamente ($p < 0,05$), superior (41,72%).

Tabela 19- Valores médios de umidade (%), nos queijos submetidos aos diferentes tratamentos, durante a maturação.

Tratamentos/ Tempos (dias)	Valores médios de umidade (%)				
	T1	T7	T14	T21	T28
Controle	61,09 ± 0,59 ^{aA}	52,81 ± 0,87 ^{aA}	40,15 ± 1,35 ^{eE}	30,78 ± 1,78 ^{dD}	28,89 ± 0,11 ^{dD}
Controle + <i>Listeria</i>	58,63 ± 0,35 ^{abcAB}	53,69 ± 1,14 ^{aA}	47,2 ± 0,98 ^{abAB}	31,23 ± 1,67 ^{dD}	29,27 ± 0,34 ^{cdCD}
Probiótica	55,46 ± 0,25 ^{bcdBCD}	50,64 ± 0,26 ^{abAB}	40,57 ± 0,67 ^{deDE}	40,83 ± 0,83 ^{aA}	32,15 ± 0,21 ^{bcBC}
Probiótica +					
<i>Listeria</i>	54,65 ± 0,32 ^{cdCD}	49,38 ± 0,49 ^{bB}	43,46 ± 1,10 ^{cdCD}	41,7 ± 0,16 ^{aA}	41,72 ± 0,97 ^{aA}
Bacteriocinogênica	53,5 ± 0,74 ^{dD}	49,28 ± 0,29 ^{bB}	40,63 ± 1,79 ^{deD}	34,53 ± 1,97 ^{cC}	33,04 ± 0,89 ^{bB}
Bact. + <i>Listeria</i>	54,88 ± 0,40 ^{cdCD}	52,2 ± 0,66 ^{abAB}	44,48 ± 1,45 ^{bcBC}	36,96 ± 2,12 ^{bcBC}	32,61 ± 0,23 ^{bB}
Bact. + Prob. +					
List.	56,86 ± 0,76 ^{bcBC}	51,84 ± 1,09 ^{abAB}	47,82 ± 0,90 ^{aA}	39,36 ± 0,66 ^{abAB}	33,74 ± 0,35 ^{bB}

Valores expressos como média de triplicatas ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na mesma linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5.2.4 Valores de pH

O pH pode ser utilizado como um indicativo da fermentação do leite, que ocorre devido à atividade metabólica dos microrganismos presentes, levando a uma diminuição nos valores de pH (MADRAU et al., 2006). A lactose, em geral, é completamente metabolizada durante a maturação dos queijos, podendo variar de acordo com a duração deste período, elevando o teor de ácido láctico (MADRAU et al., 2006).

Segundo Furtado (1991), o pH (potencial hidrogeniônico), dos queijos é inicialmente diminuído, devido a produção de ácido láctico pelos micro-organismos presentes naturalmente ou adicionados como cultura *starter*. À medida que o ácido é consumido e compostos básicos são formados, o pH tende a se elevar durante o processo de maturação, com maior ou menor intensidade, dependendo das características dos microrganismos. A elevação do pH favorece a ação enzimática

de proteases e lipases microbianas, o que tende a acelerar o processo de maturação. Por outro lado, como já comentado anteriormente, este fenômeno é continuamente freado pelo abaixamento da Aw.

Bactérias lácticas do gênero *Enterococcus* são classificadas como homofermentativas, tendo o ácido lático, como principal produto do processo fermentativo da lactose. No entanto, não apresentam rápida atividade acidificante quando inoculadas no leite, em comparação a outros gêneros como *Lactobacillus* e *Streptococcus*, micro-organismos amplamente presentes em fermentos industriais (GIRAFFA, 2001). Sarantinopoulos et al. (2002) avaliando a capacidade acidificante de isolados de *Enterococcus* de origem alimentar, demonstraram serem estes pobres em relação a quantia de ácido lático produzido.

Na Tabela 20, são demonstrados os valores médios de pH ao longo do período de maturação, nos queijos submetidos aos diferentes tratamentos.

Tabela 20 - Valores médios de pH, ao longo do período de maturação, nos queijos submetidos aos diferentes tratamentos.

Tratamentos/ Tempos (dias)	Valores médios de pH				
	T1	T7	T14	T21	T28
Controle	6,45 ± 0,10 ^{aA}	6,12 ± 0,03 ^{bB}	5,97 ± 0,01 ^{cC}	6,05 ± 0,05 ^{aBC}	6,02 ± 0,01 ^{aBC}
Controle + Listeria	6,34 ± 0,04 ^{aA}	6,29 ± 0,03 ^{aA}	6,08 ± 0,02 ^{aB}	6,00 ± 0,01 ^{aB}	5,99 ± 0,04 ^{aB}
Probiótica	5,50 ± 0,02 ^{cAB}	5,33 ± 0,04 ^{fC}	5,52 ± 0,03 ^{dAB}	5,44 ± 0,03 ^{dBC}	5,58 ± 0,03 ^{cA}
Probiótica + Listeria	5,33 ± 0,06 ^{dB}	5,53 ± 0,03 ^{eA}	5,42 ± 0,05 ^{dAB}	5,33 ± 0,02 ^{dB}	5,37 ± 0,05 ^{dB}
Bacteriocinogênica	5,72 ± 0,03 ^{bcAB}	5,77 ± 0,04 ^{dA}	5,54 ± 0,04 ^{cdC}	5,71 ± 0,04 ^{caB}	5,60 ± 0,02 ^{cbC}
Bact. + Listeria	5,70 ± 0,04 ^{cAB}	5,76 ± 0,05 ^{dA}	5,71 ± 0,02 ^{bAB}	5,63 ± 0,03 ^{cb}	5,75 ± 0,03 ^{bAB}
Bact. + Prob. + Listeria	5,84 ± 0,04 ^{bB}	5,99 ± 0,04 ^{cA}	5,80 ± 0,03 ^{bB}	5,84 ± 0,02 ^{bB}	5,86 ± 0,04 ^{bB}

Valores expressos como média de triplicatas ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na mesma linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

De acordo com estes dados e com a representação dos mesmos nas Figuras 9 e 10, pode-se evidenciar que as culturas probiótica e bacteriocinogênica foram capazes de reduzir o pH dos queijos de forma significativamente diferente do controle ($p > 0,05$), já após o primeiro dia de sua inoculação (T1).

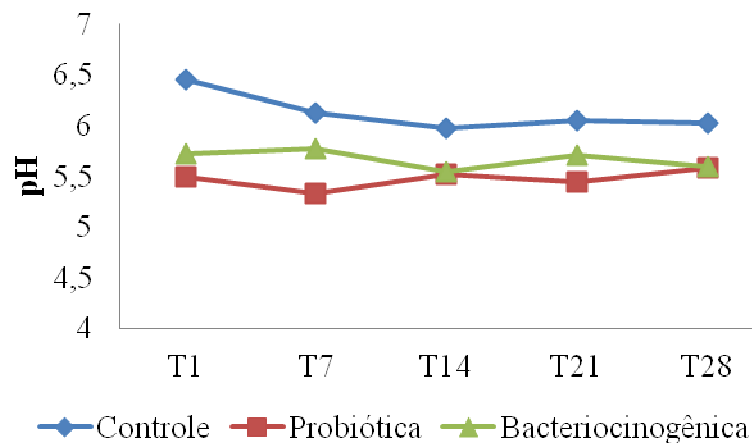


Figura 9 - pH dos queijos, sem *Listeria monocytogenes* durante a maturação.

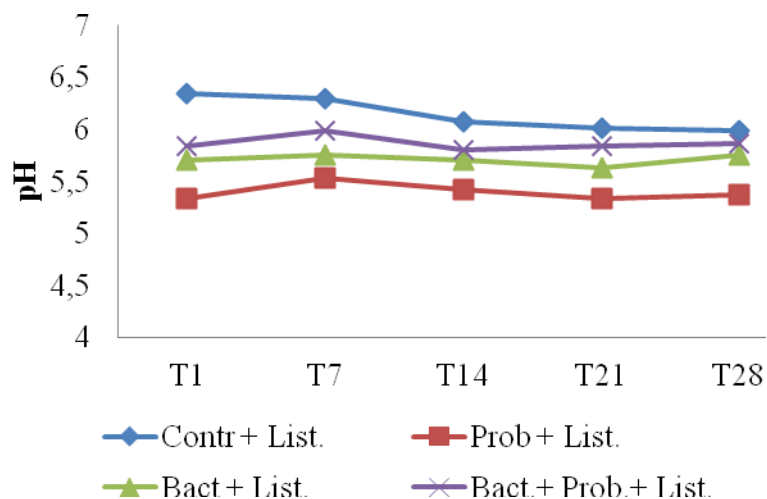


Figura 10 - pH dos queijos, com *Listeria monocytogenes* durante a maturação.

Nos queijos controle, sem e com adição de *Listeria monocytogenes*, o pH foi diminuindo até o décimo quarto dia de maturação. A partir daí, o pH se manteve praticamente constante, não havendo diferença significativa entre os tempos quatorze, vinte e um e vinte e oito ($p > 0,05$).

O queijo contendo a cultura probiótica apresentou uma diminuição no valor do pH, no tempo sete, vindo a aumentar no tempo quatorze, sendo que este valor não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) daquele do tempo um, bem como dos demais tempos, até o final da maturação, no vigésimo oitavo dia.

A cultura bacteriocinogênica provocou uma diminuição do pH no tempo quatorze, vindo a aumentar no tempo vinte e um e retornou a baixar no tempo vinte

e oito, cujo valor não diferiu significativamente ($p > 0,05$) daquele encontrado no tempo quatorze.

No final da maturação, os queijos com cultura probiótica e bacteriocinogênica não diferiram entre si ($p > 0,05$), quanto ao valor do pH, cujo valor ficou em torno de 5,60, sendo este diferente estatisticamente do controle ($p < 0,05$), que apresentou valor médio de pH 6,0. Embora a redução do pH tenha sido pequena, isso demonstra ter havido consumo de lactose pelas culturas, com produção de ácido láctico. Também Villani; Coppola (1994), analisando a capacidade acidificante de 24 isolados de *E. faecium* e 60 de *E. faecalis*, verificaram que grande parte foi capaz de reduzir o pH do leite em 0,4 a 0,8 unidades, indicando baixa atividade acidificante.

Em função dos resultados encontrados em alguns estudos como nos de Villani; Coppola (1994) e Sarantinopoulos et al. (2002), isolados de *Enterococcus*, não são indicados para serem utilizados como cultivos iniciadores, mas sim como cultivos adjuntos, devido a sua grande importância na produção de compostos aromáticos durante a maturação de diferentes tipos de queijos.

De acordo com Aquarone (2001), o processo de desdobramento das proteínas, por enzimas proteolíticas, ocorre mais lentamente que a conversão da lactose em ácido láctico, pelos micro-organismos. Mudanças físicas, químicas e organolépticas que acontecem durante a maturação, dependem da temperatura, da A_w , do tempo de maturação, da atividade das enzimas e dos micro-organismos presentes (FURTADO, 1991).

Segundo Sousa et al. (2001) a proteólise contribui para: alterações na textura do queijo, devido ao rompimento da rede proteica; diminuição da A_w através da ligação da água por liberação de grupos carboxil e amino; aumento no pH, particularmente na superfície de queijos maturados por bolores, o que facilita a liberação de compostos sápidos durante a mastigação. Isso contribui diretamente para o sabor desejado ou indesejado (ex.: amargor) no queijo, através da formação de peptídeos e aminoácidos livres. Ocorre ainda, a liberação de substratos para reações catabólicas secundárias, tais como transaminação, desaminação, descarboxilação, dessulfuração, catabolismo de aminoácidos aromáticos e reações dos aminoácidos com outros compostos.

CONCLUSÃO

O leite “in natura” e os queijos artesanais da região Fronteira Noroeste do Estado do RS possuem bactérias ácido lácticas com atividade antagonista frente a microrganismos patogênicos, incluindo *Listeria monocytogenes*. Dentre os isolados com atividade antagonista, 33,33% demonstrou ser capaz de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica, sendo caracterizados como supostamente bacteriocinogênicos e 23,81% apresentou potencial probiótico.

Dentre os isolados com características supostamente bacteriocinogênicas, o isolado F9 (*Enterococcus durans*) foi o que apresentou melhores características e dentre aqueles com características probióticas, o isolado U5 (*Enterococcus faecium*) foi o que se destacou na maioria dos testes realizados.

Em relação aos marcadores de virulência, nenhum dos isolados apresentou atividade da enzima β -hemolisina. Já em relação à sensibilidade a antimicrobianos de uso clínico, o percentual de sensibilidade variou entre 44 e 89% entre os isolados supostamente bacteriocinogênicos e aqueles com características probióticas. O isolado F9 se mostrou resistente à penicilina e o isolado U5 se mostrou sensível a todos os antimicrobianos de uso clínico testados, o que permite sua utilização como cultura probiótica.

As culturas supostamente bacteriocinogênica e probiótica adicionadas aos queijos produzidos a nível piloto com contaminação artificial de *Listeria monocytogenes* foram capazes de se manter viáveis no produto até o final do período de maturação de 28 dias, com contagens na ordem de 10^7 - 10^8 UFC.g⁻¹. Embora tais culturas não tenham sido capazes de eliminar a contaminação por *Listeria monocytogenes*, a cultura bacteriocinogênica manteve os níveis deste microrganismo patogênico estáveis não permitindo seu aumento. Esses dados sugerem a possibilidade de aplicação destes isolados como cultura supostamente

bacteriocinogênica e probiótica em queijos, tornando o produto mais seguro e com agregação de funcionalidade.

É pertinente mencionar ainda a necessidade da obtenção de leite e produção de queijos com adoção das Boas Práticas de Fabricação, já que uma vez o mesmo estando contaminado com microrganismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes*, a cultura bacteriocinogênica, utilizada com o propósito de bioconservação, não conseguirá garantir a segurança do alimento.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Pesquisar qual a bacteriocina produzida pelo isolado (F9) considerado com melhores características supostamente bacteriocinogênicas;

Purificar a bacteriocina produzida pelo isolado F9 e testar a sua aplicação em queijos a nível piloto, verificando sua eficácia no controle de *Listeria monocytogenes*;

Identificar outras características, como atividade antioxidante e regulação do colesterol sanguíneo, no isolado (U5), considerado potencialmente probiótico;

Verificar a capacidade proteolítica e lipolítica dos isolados de Enterococos utilizados como supostamente bacteriocinogênico e probiótico, em queijos.

REFERÊNCIAS

ABRIOUEL, H., BEN OMAR, N., COBO MOLINOS, A., LUCAS LÓPEZ, R., GRANDE, M.J., MARTÍNEZ-VIDEIRA, P., ORTEGA, E., MARTÍNEZ CAÑAMERO, M., GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, 38- 49, 2008.

ACHEMCHER, F.; ABRINI, J.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M. Control of *Listeria monocytogenes* in Goat's Milk and Goat's Jben by the Bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 Strain. **Journal of Food Protection**, v.69, p 2370-2376, 2006.

ANNAMALAI, N.; MANIVASAGAN, P.; BALASUBRAMANIAN, T.; VIJAYALAKSHMI, S. Enterocin from *Enterococcus faecium* isolated from mangrove environment. **Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, p. 6311-6316, 2009.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm> Acesso em: 13 de abril de 2012.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, 2001. 523p.

BARBOSA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control**, v.21, p.651-656, 2010.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.119-126, 2003.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. G. M. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1729–1738, 2006.

BELLEI, B., MIGUEL, M. MERE DEL AGUILA, E. M., SILVA, J. T., ASCHOALIN., V. M. F. Purification of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* and its effectiveness for preservation of fresh-cut lettuce. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v.3, 119-125, 2011.

BELLO, B. D.; RANTSIOUA, K.; BELLIO, A.; ZEPPAA, G.; AMBROSOLIA, R.; CIVERAB, T.; COCOLINA, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of autochthonous populations. **LWT Food Science and Technology**, v.43, p.1151-1159, 2010.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. (Ed.). **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3.ed. Amsterdam: Elsevier, p. 287-317, v. 1, General Aspects, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº62 de 26 de agosto de 2003**. Métodos de Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para controle de Produtos de Origem Animal e Água.

_____. **Portaria nº 146 de 11 de março de 1996**. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos.

_____. **Portaria nº 57 de 16 de dezembro de 2011**. Critérios para elaboração de queijos artesanais.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996**. Uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados.

_____. **Revisão n.6 do compêndio da legislação de alimentos: atos do Ministério da Saúde**. São Paulo: ABIA, v.1, 1996.

BROADBENT, J. R. Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2 ed, p. 243-299. New York: Marcel Decker, 2001.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G.; CARVALHO, AK. F.; ANDRADE, A. P. C.; QUEIROZ, A. A. M. **Caracterização de microbiota láctica isolada de queijos de Coalho comercializados no Rio Grande do Norte**. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 15, 2007, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: VC Eventos, 2007.

CAMPOS, C. A.; RODRÍGUEZ, O.; CALO-MATA, P.; PRADO, M.; BARROSVELÁZQUEZ, J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Research International**, v.39, p.356-364, 2006.

CARIOLATO, D.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. **Food Control**, v.19, p.886-892, 2008.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.4, p.281-370, 2002.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 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 láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 205-214, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n1/35.pdf>>. Acesso em: 31 outubro de 2009.

CENTENO, J.A.; CEPEDA, A.; RODRIGUEZ-OTERO, J.L. Latic acid bacteria isolated from Arzua cow's milk cheese. **International Dairy Journal**, 6, 65-78, 1996. characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p. 4529–4535, 1996.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology**, 35: 1-27, 1997.

CHEN, C. C.; TENG, L. J.; CHANG, T. C. Identification of Clinically Relevant Viridans Group Streptococci by Sequence Analysis of the 16S-23S Ribosomal DNA Spacer Region. **Journal of Clinical Microbiology**, 42:2651-2657, 2004.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science**, v.2, p.82-100, 2003.

CINTAS, L. M; CASAUS, P.; HERRANZ, C.; NES, I. F.; HERNÁNDEZ, P. E. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Food Science and Technology International**, v.7.p.281-305, 2001.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOUPOULOS, G. LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, **Journal of Dairy Research**, v. 64, n. 3, p. 409-421, 1997.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1065–1073, 2008.

CORBO, R. M.; BEVILACQUA, A.; CAMPANIELLO, D.; D'AMATO, D.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 223–241, 2009.

COREDES. Corede Fronteira Noroeste (2011). **Fundação de Economia e Estatística**. Disponível em: <www.fee.tche.br>. Acesso em: 10 de janeiro de 2013.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. R. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.777-788, 2005.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n.11, p. 2804 –2816, 1998.

DE VUYST L, FOULQUIÉ - MORENO MR, REVETS H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, 99–318, 2003.

DEEGAN, L. H.; 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.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, Roma, v. 38, 2, p. S248–S255, 2006.

DRIDER, D., FIMLAND, G., HÉCHARD, Y., MCMULLEN, L.M., PRÉVOST, H., The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.70, 564–582, 2006.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential of genetic exchange between food and medical samples. **Applied and Environmental Microbiology**, 67, 1628-1635, 2001.

ECOLOGY HEALTH CENTER, 2005. Disponível em: <<http://www.crohns.net/page>>. Acesso em 22 ago. 2012.

EMBRAPA, 2011. Empresa Brasileira de Agropecuária. **Estatísticas do leite**. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/>>. Acesso em: 05 dez 2011.

FAO/WHO, 2001. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, Argentina. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/index.html>. Acesso em 10 de abril. 2010.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23 (Supl), p.162-165, 2003.

FIMLAND, G., JOHNSEN, L., DALHUS, B., NISSEN-MEYER, J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. **Journal of Peptide Science**. v. 11, 688–696., 2005.

FISIOQUANTIC, 2005. Disponível em <http://fisioquantic.com.br/site/>. Acesso em: 22 ago. 2012.

FORTINA, M.G.; RICCI, G.; ACQUATI, A. 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.

FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; VUYST, L. DE. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000.

FRÂNCIOS, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity na technological potential of wild lactic bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 3-11, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694608001428>>. Acesso em: 28 jan. 2012.

FRANZ C. M, WOROBO R. W, QUADRI LEN, SCHILLINGER U, HOLZAPFEL W. H, VEDERAS J. C, STILES M. E. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, 2170–2178, 1999.

FRANZ, C. M. A. P., M. J. VAN BELKUM, W. H. HOLZAPFEL, H. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology**. Rev. 31:293–310 2007.

FRANZ, C. M. A. P.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A. B.; YOUSIF, N. M. K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W. H. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.4385-4389, 2001.

FRANZ, C.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 of black olives. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.29, p.255-270, 1996.

FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2/ 3, p. 105-122, 2003.

FUNCK, G. D. **Isolamento de bactérias ácido lácticas com atividade antagonista frente a patógenos e caracterização microbiológica e físico-química de leite *in natura* e queijos coloniais da Região Fronteira Noroeste do Estado do RS.** 2012. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

FURTADO, D. N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra.** 2010. Dissertação. (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo. São Paulo.

FURTADO, M. M. **A Arte e a Ciência do Queijo.** São Paulo: Globo, 1991. 297p.

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. Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products. **International Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-3, 2007.

GARNEAU, S.; MARTIN, I. N. ; VEDERAS, J.C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.84, p. 577-592, 2002.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**. v.26, p.163 - 171, 2002.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.215-222, 2003.

GOMES, A. M. P., MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, 139-157, 1999.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic Dairy Products as Functional Foods Comprehensive. **Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, 2010. Institute of Food Technologists doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p: 95-98, 1999.

HENKER J.; LAASS, M.; BLOKHIN, B. M.; BOLBOT, Y. K.; MAYDANNIK, V. G.; ELZE, M.; WOLFF, C.; SCHULZE, J. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle

1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. **European Journal of Pediatrics**, v. 166, n. 4, p. 311–318, 2007.

HONDA, H.; KATTAOKA, F.; NAGAOKAS, S.; KAWAI, Y.; KITAZAWA, H.; ITOH, H.; KIMURA, K.; TAKETOMO, N.; YAMAZAKI, Y.; TATENO, Y.; SAITO, T. β -Galactosidase, phospho β -galactosidase and phosphor β -glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.461-466, 2007.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 253– 260, 2004.

HUGAS , M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v.49, n.98, p. 139-150, 1998.

HWANHLEM, N.; WATTHANASAKPHUBAN, N.; RIEBROY, S.; BENJAKUL, S.; H-KITTIKUN, A.; MANEERAT, S. Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 594–601, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químico e Físico para Análise de Alimentos**. 3^o edição. v.1. São Paulo, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE**. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 14 jul. 2010.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Yogurt: enumerations of characteristic microorganisms count technique at 37°C. **Bulletin of International Dairy Federation**, n. 117, p. 1-4, 1983.

JACOBSEN, C. N.; NIELSEN, V. A. R.; HAYFORD, E.; MOLLER, P. L.; MICHAELSEN, K. F.; PARREGAARD, A.; SANDSTRÖM, B.; TVEDE, M.; JAKOBSEN, M. Strains in humans the colonization ability of five selected by *in vitro* techniques and evaluation of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. screening of probiotic activities of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, 1999. Disponível em: <<http://aem.asm.org/> on January 15, 2012 by guest>. Acesso em: 15 jan. 2012.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. New York: Springer, 2005.

KAISER, A. L; MONTVILLE, T. J. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p. 4529–4535, 1996.

KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, 255-262, 2003.

KHAN, H.; FLINT, S.; YU, P. L. Enterocins in food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 1-10, 2010.

KHEDID, K.; FAID, M.; MOKHTARI, A.; SOULAYMANI, A.; ZINEDINE, A. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. **Microbiological Research**, v. 164, p. 81—91, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501306001327>>. Acesso em: 21 nov. 2011.

KRUIS W, FRIC P, POKROTNIEKS J, LUKAS M, FIXA, B. Maintain ingreission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. **Gut** 53: 1617–1623 (2004).

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999.

LEROY, F.; DEVUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p. 67-78, 2004.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. n. 13, p. 145-150, 1991.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias ácido lácticas e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61n1/v61n1a37.pdf>>. Acesso em: 28 mar 2010.

LIN, W. H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W.; TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.

LISBOA, M. P.; BONATTO, D.; BIZANI, D.; HENRIQUES, J. A. P.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin- like substance produced by *Bacillus amylolique faciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **International Microbiology**, v. 9, p. 111-118, 2006.

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

MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 1199–1208, 2007.

MANNU, L.; PABAA, E. A.; COMUNIANA, D. R.; ZANETTIB, S.; DUPRE, I.; SECHI, L. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.291-304, 2003.

MARCIÑÁKOVÁ, M.; SIMONOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A. Probiotic properties of *Enterococcus faecium* EF9296 strain isolated from silage. **Acta Veterinaria**, v.73, p. 513-519, 2004.

MARTINIS, E. C. P.; PÚBLIO, M. R. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 32-37, 2001.

MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F.; TORRIANI, S.; MASTROCOLA, D.; SERIO, A.; CHAVES-LOPEZ, C.; SCHIRONE, M.; SUZZI, G. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzes cheese. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.15, p.571-578, 2005.

MEIRA, S. M. M. **Potencial probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijos de ovelha**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; VELHO, R. V.; MEDINA, L. F. C.; BRANDELLI, A. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. **Brazilian Journal of Food Technology**, p.75-80, 2010.

MENEZES, L. D. M.; PENA, E. C.; SOUZA, V. F. **Avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal produzido em Minas Gerais em 2008**. In: XVI ENCONTRO NACIONAL E II CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009.

MERGAERT, J.; CNOCKAERT, M. C.; SWINGS, J. *Phyllobacterium myrsinacearum* (subjective synonym *Phyllobacterium rubiacearum*) emend. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52, 1821–1823, 2002.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p. 1320-1324, 2010.

MORENO, I. **Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de *Lactococos* e sua utilização no procedimento de queijo Minas Frescal**. São Paulo, 1995. Dissertação (Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP).

NASCIMENTO, M. 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 em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Determinação da compatibilidade de desenvolvimento de culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.29, p.167-170, 2009.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F.; 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 and Public Health**, v.55, p.229-305, 2008.

NES, I. F e JOHNSBORD, O. Exploration of antimicrobial potencial in LAB by genomic. **Current Opinium in Biotechmology**, v.15, p.100-104, 2004.

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

OGIER, J. C., SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus. **International Journal of Food Microbiololy**, v.126, p.291-301, 2008.

OLIVEIRA, R. B. P., OLIVEIRA, A., GLÓRIA B. M. Screening of lactic acid bactéria from vacuum packaged beff for antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, 368-374, 2008.

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

ORTU, S.; FELIS, G. E.; MARZOTTO, M.; DERIU, A.; MOLICOTTI, P.; SECHI, L. A.; DELLAGLIO, F.; ZANETTI, S. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. **International Dairy Journal**, v. 17, p.1312–1320, 2007.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. Official methods for the microbiological analysis of foods. **Compendium of Analytical Methods**, v. 2, Health Protection Branch, 2001.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; KANG, S.; KIM, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**. v. 100, p. 1171–1185, 2006.

PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1718- 1725, 2008.

PETERS, J.; MAC.K, WICHMANN-SCHAUER, H., KLEIN, G., ELLERBROEK, L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, 311-314, 2003.

PIARD, J. C.; DESMAZEUD, M. Inibiting factors producet by lact acid bacteria. Bacterioces and other antibacterial substances. **Le Lait**, v.72, p.113-142, 1992.

PINTO, M. G. V.; FRANZ, C. M. A. P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 205-214, 2006.

POETA, P; COSTA, D.; ROJO-BEZARES,B.; ZARAZAGA , M.; KLIBI, N.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin 88 structural genes in faecal enterococci of wild animals. **Microbiological Research**. v.162, p. 257-263, 2007.

POLLMAN, M.; NORDHOFF, M.; POSPISCHIL, A.; TEDIN, K.; WIELER, V. H. Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine. **Infection and Immunity**, v.73, n.7, p.4346-4353, 2005.

POPPI, L. B; MANCILHA, I. M; Ferreira, A. J. P.; LEAL, D. D. M. Nota prévia: Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, 113-119, 2008.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p.1–7, 2010.

REDONDO, N. C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp*jugurti***. 2008. Dissertação. (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, Brasil). 109p.

RENYE, J. A; SOMKUTI, G. A; PAUL, M.; HEKKEN, D. L. VAN. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolates from Hispanic-style cheeses. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 261-8, 2009.

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.

ROMANOTTO, T. C. Fabricação de queijos artesanais. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com.br>. Acesso em: 03 de março de 2013.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1 ed. São Paulo: Varela, 2011.669p.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1284–1289, 2007.

SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M. D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1/2, p. 125-36, 2002.

SCHILLINGER, U., GUIGAS, C., HOLZAPFEL, W. H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**. 2005.

SCHITTLER, L. **Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas em leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS.

SENGUN, I. Y.; NIELSEN, D. S.; KARAPINAR, M.; JAKOBSEN, M. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 105–111, 2009.

SOUSA, M. J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, 11(4-7): 327-345, 2001.

SOUZA, C. F. V.; ROSA, T. D.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristic of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 260-266, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v34n3/v34n3a16.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2010.

TAMANG, J. P.; TAMANG, B.; SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W. H. Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of Himalayas. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p.28-33, 2009.

TAMIME, A. Y. Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 2-15, 2002.

TEUBER, M.; MEILE, L. SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.76, p.115-137, 1999.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F, & HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.24 p.4876–4882, 1997.

UKENA, S. N.; SINGH, A.; DRINGENBERG, U. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Inhibits Leaky Gut By Enhancing Mucosal Integrity. **Plos One**, v.2, n.12, p. 1308, 2007.

VAHJEN, W.; MANNER, K.; POLLMAN M.; NORDHOFF, M.; POSPISCHIL, A.; TEDIN, K.; WIELER, V.H. Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine. **Infection and Immunity**, v.73, n.7, p.4346-4353, 2005.

VAN DEN BERGHE, E.; DE WINTER, T.; DE VUYST, L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pHdependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p. 159-170, 2006.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714– 728, 2008.

VÉLEZ, M. P.; DE KEERSMAECKER, S. C. J.; VANDERLEYDEN, J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, p. 140–148, 2007.

VENTURA, M.; O'FLAHERTY, S.; CLAESSION, M. J.; TURRONI, F.; KLAENHAMMER, T. R.; SINDEREN, D. V.; O'TOOLE, P. W. Genome-scale analyses of healthpromoting bacteria: probiogenomics. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 7, p. 61-73, 2009.

VILLANI, F.; COPPOLA, S. Selection of enterococcal strains for water-buffalo mozzarella cheese manufacture. **Annals of Microbiology**, v. 44, p.97-105, 1994.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, p. 895–904, 2003.

VOULGARI, K.; HATZIKAMARI, M.; DELEPOGLOU, A.; GEORGAKOPOULOS, P.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. **Food Control**, v. 21, p. 136–142, 2010.

ZAFALON, L. F.; LANGONI, H.; BROCCOLO, C. R.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, p. 56-65, 2008.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. **Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul. Brasil. Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-867, maio/jun. 2007.