

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM
ANIMAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DE *Lactobacillus rhamnosus* E DE *Lactococcus lactis* ISOLADOS DE QUEIJO
DE COALHO NA VIABILIDADE E PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA B POR
Staphylococcus aureus FRI-S6 EM QUEIJO**

BIANCA SERIDAN DE ASSIS

ORIENTADOR: PROFESSOR MARCELO RESENDE DE SOUZA

CO-ORIENTADOR: PROFESSOR JACQUES ROBERT NICOLI

CO-ORIENTADOR: PROFESSOR LUIZ SIMEÃO DO CARMO

BELO HORIZONTE – JULHO DE 2010

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Queijos.....	6
2.1.1. Histórico.....	6
2.1.2. Conceito.....	7
2.1.3. Mercado.....	9
2.1.4. Produção.....	10
2.1.5. Microbiota do queijo.....	12
2.1.5.1. Microrganismos provenientes do leite.....	12
2.1.5.2. Microrganismos introduzidos durante o processamento.....	13
2.2. Probióticos.....	14
2.2.1. Histórico.....	14
2.2.2. Conceito.....	16
2.2.3. Características dos microrganismos probióticos.....	16
2.2.4. Benefícios.....	17
2.2.4.1. Benefícios para o hospedeiro.....	17
2.2.4.2. Segurança alimentar.....	19
2.2.5. Riscos do uso de microrganismos probióticos.....	21
2.3. Bactérias acidoláticas.....	22
2.3.1. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	22
2.3.2. <i>Lactococcus lactis</i>	23
2.4. <i>Staphylococcus</i> spp.	23
2.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.4.2. Enterotoxinas estafilocócicas.....	24
2.4.2.1. Enterotoxinas presentes em alimentos.....	24
2.4.2.2. Enterotoxinas presentes em queijos artesanais.....	24
2.4.3. Intoxicações alimentares.....	25
3. HIPÓTESES	25
4. OBJETIVOS	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1. Delineamento experimental.....	26
5.2. Análises do leite em pó.....	26
5.2.1. Teste de inibidores do crescimento bacteriano.....	26
5.2.2. Teste de enterotoxinas estafilocócicas.....	27
5.3. Produção de queijos.....	28
5.4. Análises dos queijos.....	30
5.4.1. Enumeração de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	30
5.4.2. Detecção de enterotoxina estafilocócica nos queijos.....	31
5.5. Análise estatística.....	32
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6.1. Qualidade do leite em pó.....	32
6.1.1. Inibidores do crescimento microbiano.....	32
6.1.2. Teste de enterotoxinas estafilocócicas.....	33
6.1.3. Enumeração de unidades formadoras de colônias no leite.....	33
6.2. Análises dos queijos.....	33
6.2.1. Enumeração de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	33
6.2.2. Detecção de enterotoxina SEB nos queijos.....	42
7. CONCLUSÃO	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Denominação de queijos segundo teor de gordura na matéria seca ou no grau de maturação.....	8
Tabela 2. Classificação de queijos segundo matéria gorda ou teor de umidade da massa.....	8
Tabela 3. Microrganismos utilizados em produtos fermentados, derivados de leites.....	15
Tabela 4. Tratamentos – queijos e seus inóculos.....	29
Tabela 5. Valores de medianas de enumerações, em UFC/g, de <i>Staphylococcus aureus</i> em queijos frescos, durante 15 dias de estocagem, a 4-8°C.....	34
Tabela 6. Valores de medianas de enumerações, em UFC/g de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> em queijos frescos, durante estocagem por 15 dias, à temperatura de 4-8°C.....	36
Tabela 7. Valores de medianas de enumerações, em UFC/g de <i>Lactococcus lactis</i> em queijos frescos, durante estocagem por 15 dias, à temperatura de 4-8°C.....	37

Lista de figuras

Figura 1. Fluxograma de produção dos queijos.....	30
---	----

Lista de Gráficos

Gráficos 1. Enumerações de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> em queijos frescos em relação ao tempo de estocagem de 15 dias a 4-8°C.....	38
Gráficos 2. Enumerações de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Lactococcus lactis</i> em queijos frescos em relação ao tempo de estocagem de 15 dias a 4-8°C.....	40
Gráficos 3. Níveis médios de SEB, em densidade óptica, em queijos frescos ao longo do tempo de estocagem de 15 dias a 4-8°C.....	43

Título: Efeito de *Lactobacillus rhamnosus* e de *Lactococcus lactis* isolados de queijo coalho na viabilidade e produção de enterotoxinas tipo B por *Staphylococcus aureus* FRI S-6 em queijo

Linha de pesquisa: Biotecnologia aplicada a produtos de origem animal - utilização de microrganismos para elaboração de novos produtos

Autora: Bianca Seridan de Assis

Orientador: Professor Marcelo Resende de Souza

Co-Orientador: Professor Jacques Robert Nicoli

Co-Orientador: Professor Luiz Simeão do Carmo

Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Escola de Veterinária

Universidade Federal de Minas Gerais

1. Introdução

O consumo de queijos produzidos de forma artesanal, a partir de leite cru, é muito difundido no Brasil, sobretudo no estado de Minas Gerais, sendo representantes principais os queijos Canastra, Serro e Frescal, e na região Nordeste, o queijo de coalho. Estes queijos representam um forte ícone social que, formalizados pelo hábito alimentar, compõem a identidade cultural brasileira. Apesar de serem amplamente consumidos no Brasil, esses queijos são, frequentemente, responsabilizados por surtos de intoxicação alimentar, devido ao risco de contaminação do alimento com bactérias patogênicas possivelmente presentes no leite não processado termicamente. Um representante bastante frequente desse risco alimentar é *Staphylococcus aureus*, cujo potencial de produção de enterotoxinas pode levar a quadros de doença grave, incluindo óbitos (Carmo, 2001; Ostyn *et al.*, 2010).

Em que pese o alto consumo de queijos artesanais com risco de contaminações, o número de notificações de intoxicações por *Staphylococcus* spp. está aquém do esperado em função da pouca comunicação aos serviços específicos de saúde pública, provavelmente, pelo hábito de o brasileiro não buscar serviço médico em casos de quadros com sintomas moderados. Outra possível razão para o baixo número de casos registrados de intoxicação estafilocócica associada à ingestão de

produtos derivados do leite é a inibição de produção de enterotoxinas por fatores presentes no leite. Destes fatos, conclui-se que o controle deste patógeno é uma das formas efetivas de manutenção da qualidade e segurança alimentar de queijos artesanais brasileiros. Uma solução pertinente para a redução do crescimento desses patógenos nos queijos artesanais e de sua produção de enterotoxinas seria o uso de bactérias inibidoras de seu crescimento, como as probióticas, por promoverem efeitos benéficos no organismo do consumidor. Essas bactérias, isoladas dos próprios queijos artesanais, se inoculadas em contagens adequadas, poderiam garantir níveis de segurança alimentar para queijos produzidos com leite cru, viabilizando o reconhecimento desse produto pelo órgão de inspeção federal, sem descaracterização dos produtos.

O consumo de queijos artesanais, produzidos a partir de leite cru, é uma realidade no Brasil; a segurança alimentar desses produtos, porém, não é garantida devido ao fato de grande parte deste alimento não estar submetido à inspeção, seja ela municipal, estadual ou federal. Para que essa inspeção seja viável, torna-se importante o conhecimento do comportamento da microbiota presente nesses queijos; então passa a ser de interesse a presença de fatores atenuantes do crescimento de bactérias patogênicas bem como de sua produção de toxinas. O domínio sobre as relações microbianas do

queijo artesanal possibilitaria a criação de parâmetros adequados como base para inspeção, conferindo segurança ao queijo artesanal, o que incentivaria o consumo desse alimento e fortaleceria os hábitos e tradições da região de Minas Gerais, o que movimentaria valiosos recursos econômicos no País.

Além do aspecto social, a utilização de cepas capazes de promover efeitos benéficos à saúde do consumidor, bem como para a qualidade do alimento, possibilitaria a elaboração de queijo veiculando microrganismos probióticos, produto de fácil acesso ao mercado consumidor.

Para que a elaboração de tais queijos seja possível, a viabilidade e os efeitos desejáveis desses microrganismos devem ser bastante conhecidos e dominados nos alimentos, justificando a importância dessa pesquisa.

2. Revisão de literatura

2.1. Queijos

2.1.1. Histórico

Existe, atualmente, grande variedade de queijos, produzidos desde as formas mais artesanais- que são extremamente valorizadas e apreciadas no Brasil e na Europa- até escalas industriais. Apesar de toda a tecnologia atualmente empregada no processamento de queijos, sua origem

ocorreu, simultaneamente, em diversas localidades e de formas diferentes. Seu processo de elaboração artesanal foi desenvolvido empiricamente, quando os resultados de fermentação acidental foram observados e, posteriormente, controlados e modificados. Essa evolução simultânea, em regiões geograficamente distintas, favoreceu o surgimento de diferentes tipos de queijos, em regiões distantes entre si (Casson, 1969).

No Egito Antigo, a técnica da agricultura e a construção de túmulos para os faraós passaram a requerer grande número de pessoas para o trabalho. A própria agricultura foi capaz de suprir de alimento toda essa população em períodos posteriores às enchentes, mas não na seca, quando as margens do rio Nilo não favoreciam o cultivo de grãos. Nessas épocas, porém, em suas margens extremamente férteis, brotavam grãos suficientes para alimentar alguns animais, como ovinos e alguns bovinos. Seu leite passou, então, a ser fonte de sobrevivência dos povos do deserto durante as estações de seca. Como era de se esperar, a alta temperatura favoreceu o processo de fermentação desse leite que, em função de raros recursos, era consumido sem prejuízo à saúde. Com o uso de técnicas de filtragem em tecidos vegetais e papiro, o leite passou a ser conservado por mais tempo na forma de grumos filtrados, o que seriam os prelúdios do queijo como é conhecido hoje.

O uso desse leite coalhado no Egito foi documentado (Casson, 1969).

Os registros mais antigos de produção de queijo se encontram na região do Mar Mediterrâneo, provavelmente pelo favorecimento do clima ameno, vários anos antes de Cristo. Há também registros de queijos encontrados em tumbas de faraós, feitos com leites de vaca, ovelha e cabra. Em uma mesma época, os queijos foram apreciados pelos gregos, egípcios e romanos. E estes últimos demonstraram grande domínio da técnica, sendo o queijo utilizado em banquetes e para alimentar os tão conhecidos exércitos romanos. Os soldados e suas invasões foram peça importante na disseminação do conhecimento sobre a produção de queijos em suas colonizações e domínio de terras e povos. Essa disseminação tem como comprovação o fato de em 58 A.C. ter sido registrada a produção do primeiro queijo Emmental na região dos Alpes, onde hoje se situa a Suíça. Como se ainda não fossem suficientes os registros mencionados, encontraram-se registros, entre 100 e 50 anos a.C., de importação de queijos da Europa e Ásia, região que, por muito tempo permaneceu com sua maneira própria de produzir queijos sem modificações pela cultura romana (Kosikowski, 1977).

2.1.2. Conceito

O conceito de queijo, segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (Brasil, 1997), em seu Título VII, Capítulo IV, é “produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.”

Ainda, segundo o RIISPOA (Brasil, 1997), os queijos podem ser classificados segundo sua maturação, como sendo fresco (o que está pronto para o consumo logo após a sua produção) e maturado (o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo). A denominação “queijo” só pode ser usada para produto cuja base láctea não apresente adição de gordura e / ou de proteína de origem não láctea.”

O queijo é um produto obtido a partir da coagulação das proteínas do leite, especialmente a caseína, e a gordura. O resíduo desse processo é o soro do leite, que

deve ser tratado antes de liberado ao ambiente, devido ao seu alto poder eutroficante e poluente (Bylund, 1995).

Conforme *Food and Agricultural Organization e World Health Organization* (FAO/WHO, 2006), de acordo com o

Codex Alimentarius, standard Stan A-6, os queijos são classificados segundo sua firmeza, como sendo moles, semi-duros, duros e extra duros. Essas características são baseadas no teor de matéria gorda no extrato seco ou ainda no grau de maturação do queijo, demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Denominação de queijos segundo teor de gordura na matéria seca ou no grau de maturação

Teor de gordura na matéria seca (%)	Denominação da massa do queijo	Grau de maturação
≤51	Extra – dura	Maturado
49 – 56	Dura	Maturado por fungos
54 – 69	Semi-mole	Não maturado ou fresco
≥ 67	Mole	Fresco em salmoura

Fonte: FAO/WHO - *Codex Alimentarius, Stan A-6* (2006)

A legislação brasileira, Instrução Normativa nº 146 (Brasil, 1996), adota outra classificação para os queijos, que toma

como base os parâmetros matéria gorda e umidade, apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação de queijos segundo matéria gorda ou teor de umidade da massa

Denominação	Teor de gordura	Denominação	Teor de umidade
Extra gordo ou duplo creme	>60%	Muito alta umidade	>55%
Gordo	45 a 59,9%	Alta umidade	46 a 54,9%
Semi-gordo	25 a 44,9%	Média umidade	36 a 45,9%
Magro	10 a 24,9%	Baixa umidade	<35,9%
Desnatado	<10%		

Fonte: Brasil - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, Instrução Normativa nº 146 (1996)

Queijos maturados são aqueles submetidos a um processo de estocagem por tempo variado, segundo o tipo de queijo a ser produzido, e temperatura adequada para que ocorram as reações bioquímicas necessárias para conferir o sabor, o odor e a textura adequados (FAO/WHO, 2006).

Queijo fresco é aquele que está pronto para o consumo imediatamente após a sua fabricação, não havendo a necessidade de sua estocagem em temperatura e tempo controlados. Esses queijos têm uma menor vida útil, devido ao maior teor de água livre em sua estrutura (Bylund, 1995).

Os queijos maturados por fungos são pouco frequentes no Brasil, porém são extremamente comuns no mercado francês, sendo o Camembert, o Brie e o Reblochon exemplos clássicos por apresentarem uma crosta branca sobre sua casca, de sabor característico (Leite *et al.*, 2008).

2.1.3. Mercado

O mercado internacional de lácteos do Brasil mostra-se ativo, apesar de as importações ainda serem maiores que as exportações, caracterizando um *déficit* de US\$ 11,4 milhões na balança comercial brasileira. Embora possa ser observado um aparente desequilíbrio no comércio internacional de produtos lácteos do Brasil, a taxa de exportação vem crescendo 1.043,8% entre 1996 e 2006, atingindo, em 2008, 1,8% da produção total do país. Em

consonância com o aumento nas exportações, a taxa de importações caiu 71,5% em volume no mesmo período, fator que demonstra tendência ao equilíbrio da balança comercial brasileira. Dentre os produtos comercializados, o soro de leite compõe o maior volume entre os importados e, entre os exportados, os mais expressivos são o leite condensado, o leite em pó integral e os queijos fundidos (Leite, 2008).

Os queijos fundidos do Brasil têm como principais compradores os países do MERCOSUL e das Américas, e os queijos fabricados de forma tradicional têm como principal destino a Europa (Leite, 2008).

O mercado internacional de queijos movimentou, no mundo, US\$ 45 bilhões entre 2004 e 2006, sendo destes, US\$ 33 bilhões relacionados a queijos não caracterizados nos grupos fresco, ralados ou em pó e mofados ou azuis, sendo então Brie, Camembert, Edam, Provolone, Gouda e Saint-Paulin. Este mercado é movimentado por 9,4% dos países em importações e, em porcentagem ainda menor em exportações, o que mostra a concentração do mercado internacional de queijos. Essa concentração ocorre principalmente na Europa, sendo esta responsável por 50% das importações de queijos fundidos e 70% dos outros grupos de queijos. O segundo maior pólo do mercado de queijos é o dos Estados Unidos, seguido por Canadá e Japão. Mas, o mais

curioso é que os principais fornecedores dos países da Europa são os próprios produtores europeus, sendo este um mercado, não só concentrado, como fechado entre os países de maior poder de compra. Isto caracteriza o queijo como um produto comercializado em mercados refinados, responsável por grande movimentação financeira (Leite, 2008).

Segundo dados apresentados pela *Food and Agricultural Policy Research Institute* (FAPRI, 2008), o Brasil produziu, em 2007, 26.750 toneladas de leite fluido, sendo destes, 14.582 toneladas para consumo líquido e 11.645 para fabricação de produtos derivados. Destes, 580 toneladas foram usadas na fabricação de queijos, 505 toneladas na fabricação de leite em pó integral, 128 toneladas para leite em pó desnatado e 82 na produção de manteiga. O queijo se mostrou, então, o produto derivado de maior importância econômica interna, sendo toda a produção de consumo doméstico. As exportações e importações se mostraram equilibradas, porém com pequena tendência ao aumento da exportação de queijos até 2017.

Nestes dados apresentados, foram contabilizados apenas os derivados fabricados a partir de leite tratado termicamente, ou pasteurizados, descartando-se, por impossibilidade de controle os produtos produzidos a partir de leite cru. O desconhecimento dessa produção expõe a falta de controle do

alimento produzido dessa forma, bem como do potencial econômico dos alimentos artesanais. Sendo os produtos artesanais produzidos nas propriedades onde o leite é obtido, seu controle é dificultado. Ainda assim, sabe-se que esse alimento faz parte da dieta do brasileiro, sobretudo em regiões rurais, abrangendo regiões urbanas de forma clandestina e ilegal, o que confere alto risco sanitário do alimento por ausência de fiscalização.

A entrada desses alimentos no mercado brasileiro legal representa um ganho econômico para o país; porém, para que isso ocorra, é necessário o conhecimento de suas características sanitárias bem como a criação de padrões para sua fiscalização adequada.

2.1.4. Produção

O processo de produção de queijos consiste, basicamente, das etapas de fermentação ácida bacteriana, coagulação química ou enzimática, corte da massa coagulada, eliminação do soro, prensagem, salga e, em alguns casos, maturação. Essas etapas sofrem modificações de acordo com o tipo de queijo a ser produzido, podendo haver variações no pH a ser atingido na fermentação inicial, na concentração de coalho ou mesmo sua natureza, no tamanho do grão após corte do coágulo, presença ou não de pré-prensagem, na presença ou não de aquecimento da massa, no caso de queijos de massa cozida, lavagem ou

dessoragem, ou ainda podem haver várias formas de salga, sendo por superfície ou salmoura. Ao final da salga, pode haver maturação ou não. E, ainda, em qualquer das etapas do processamento, pode haver introdução de alguns agentes fúngicos ou bacterianos que agirão durante a fabricação ou em etapa posterior, na maturação (Bylund, 1995).

O início efetivo da produção do queijo ocorre no instante em que a cultura iniciadora é adicionada ao tanque, que armazena o leite a 30°C. Há dois tipos de cultura. A mesofílica, cuja temperatura ótima é de 20 a 40°C; e a termofílica, cujo crescimento se intensifica acima de 45°C. Normalmente, os microrganismos mais utilizados na produção de queijos pertencem a essas duas culturas; as mesofílicas agem no início do processo, liberando ácido láctico da fermentação da lactose; e as termofílicas, após o corte da massa, quando há aumento da temperatura em massas cozidas, para produção de gás carbônico (CO₂) e formação de olhaduras. Usando-se um tipo puro ou os dois combinados, as culturas têm como função principal a redução do pH para propiciar a quebra da caseína e formação do coágulo, além de produção de compostos responsáveis pelo sabor (Bylund, 1995).

Caso o leite tenha sido pasteurizado, deve-se adicionar cloreto de cálcio (CaCl₂), em concentração máxima de 20g por 100Kg de leite. O cloreto de cálcio tem como função

aumentar a concentração de cálcio livre para ligar e unir micelas de caseína e formar um coágulo firme. Porém, sua concentração não deve ultrapassar 30g por 100Kg de leite, pois, pode haver formação de coágulo muito firme, com corte desfavorecido. Em concentrações acima de 40g por 100g, o sabor do queijo pode ser afetado, ficando amargo (Furtado, 1991).

O agente coagulante normalmente utilizado é uma solução de enzimas digestivas retiradas de abomaso de bezerros e purificadas para concentração entre 1:10.000 e 1:15.000. Usa-se uma concentração máxima de 30ml dessa solução em queijos firmes, podendo ser menor em massas moles. Essa enzima, a quimosina, tem como função hidrolisar a kapa-caseína entre os aminoácidos 105 (fenilalanina) e 106 (metionina) e liberá-la do cálcio solúvel para que se ligue ao fosfato e forme uma rede entre alfa e beta-caseínas, ligadas por fosfatos de cálcio, dando origem ao coágulo (Furtado, 1991). O leite deve ser deixado em repouso no tanque por, pelo menos, 10 minutos, sendo necessários de 30 a 45 minutos, dependendo da variedade do queijo. Nesse tempo, há formação do coágulo (Kosikowaki, 1977; Bylund, 1995).

Após coagulação do leite, procede-se ao corte da massa com as liras, de forma manual ou mecânica, lentamente. Nesse processo, o soro é liberado. Em massas cozidas, há elevação da temperatura, sob

agitação, para ativação das bactérias termofílicas introduzidas com a cultura iniciadora. Há, então, separação do soro de forma manual com retirada dos coágulos, ou drenagem do soro ou mesmo drenagem dos coágulos, com auxílio de vácuo, direto para a prensa. Ocorre, então, a prensagem da massa, podendo haver pré-prensagem, normalmente em queijos de massa firme (Kosikowski, 1977).

Após o período de prensagem, que varia entre as diversas variedades de queijo, o produto fresco é retirado e exposto à salga, que pode ser por salmoura, ou salga seca, em que o sal fino é colocado sobre a superfície do queijo ainda fresco. Os queijos de massa mole e frescos estão prontos para a distribuição e o consumo, e os que necessitam maturação, serão armazenados sob temperatura de aproximadamente 12°C por tempo e umidade específicos para cada tipo de queijo. Testes de qualidade, como percussão, são feitos antes da liberação do produto para o mercado.

2.1.5. Microbiota do queijo

A matriz alimentar no queijo é propícia para o desenvolvimento de diversas espécies bacterianas e fúngicas devido aos seus altos teores médios de proteína, de gordura de 10 a mais de 60% no extrato seco e, muitas vezes, sua alta umidade que varia de 35,9 a 55%, assim como o leite (Jay, 1996).

A microbiota presente nesse alimento pode variar largamente segundo alguns aspectos, como os teores de umidade, o tempo de maturação, uso de cultura iniciadora, origem do leite e cuidados durante o processamento (Jay, 1996).

2.1.5.1. Microrganismos provenientes do leite

No Brasil há dois tipos de queijo bastante consumidos: são eles o queijo artesanal, produzido com leite cru, e o queijo industrial, produzido com leite pasteurizado.

A microbiota do queijo artesanal reflete a microbiota do leite cru, predominantemente Gram negativo, podendo estar presentes alguns exemplares dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, e *Lactobacillus*. A presença ou ausência de determinados gêneros varia com a presença destes na glândula mamária da vaca ou no exterior do úbere, conforme a qualidade da higienização prévia à ordenha (Jay, 1996).

Desses gêneros, salientam-se, em importância, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus* como sendo representantes do grupo de bactérias produtoras de ácido-láctico. Este grupo é amplamente utilizado na indústria produtora de queijo e de outros produtos fermentados.

Além destes, podem estar presentes os gêneros *Proteus*, *Pseudomonas*, *Brucella*, *Listeria* e *Staphylococcus*, que podem estar presentes no leite cru, saindo da glândula mamária. A característica comum a esses gêneros é a possibilidade de causar doença no homem e, a maior parte deles, reflete o estado sanitário da vaca. Um exemplar encontrado com grande frequência no leite cru no Brasil e, em consequência, no queijo artesanal, é *Staphylococcus aureus*, presente na glândula mamária de vacas com mastite subclínica, problema freqüente em rebanhos brasileiros.

A produção industrial de queijo utiliza, por determinação do RIISPOA (Brasil, 1997), leite tratado termicamente por meio da pasteurização que consiste na submissão do leite à temperatura de 72 a 75°C durante 15 a 20 segundos. O objetivo desse tratamento térmico é eliminar completamente os microrganismos patogênicos e reduzir em 99,9% os microrganismos deteriorantes do leite. Sendo assim, o queijo produzido com leite pasteurizado reflete tão somente a qualidade da pasteurização, bem como dos microrganismos adicionados ao leite durante o beneficiamento. Entretanto, o processamento térmico não é capaz de eliminar espécies termodúricas como alguns representantes dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus* e esporos de *Bacillus*, além de *Clostridium*, se presentes (Jay, 1996). A pasteurização é também incapaz de eliminar algumas toxinas termoestáveis como as

enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* (Carmo, 2001).

2.1.5.2. Microrganismos introduzidos durante o processamento

A etapa inicial da produção de queijo é a fermentação ácida, efetuada pelo inóculo da cultura de bactérias acidoláticas. As espécies presentes no inóculo variam de acordo com o tipo de queijo a ser produzido e devem ser, forçosamente, seguras para a saúde humana. Entre os gêneros mais comuns estão presentes *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e alguns fungos utilizados nas etapas posteriores de maturação, como *Penicillium candidum* e *Penicillium roquefortii*.

Outra forma de introdução de microrganismos é a manipulação do leite e do queijo, associada a falhas nas práticas de fabricação, bem como práticas ineficientes de higienização dos utensílios e maquinários. Dentre as espécies mais frequentemente associadas a esse tipo de introdução estão *Bacillus cereus* associado aos equipamentos (Åsa Eneroth *et al.*, 2001.) e *Staphylococcus aureus*, associado à manipulação (Baird-Parker, 1990). Essa contaminação de microrganismos, normalmente confere riscos à saúde do consumidor do produto final, devido à dificuldade do controle dessa inserção e o desconhecimento das cepas introduzidas, que podem ser patogênicas e sobreviverem

às condições do processamento do alimento.

Alguns dos microrganismos encontrados no leite cru provenientes da glândula mamária de vacas sadias, ou adicionados durante o processamento, vêm sendo estudados em busca de vantagens para o consumidor do produto laticínio ou benefícios para o próprio alimento. Microrganismos com essa capacidade são denominados probióticos.

2.2. Probióticos

2.2.1. Histórico

O primeiro relato sobre o uso de microrganismos probióticos foi feito por Metchnikoff, em 1908, pesquisador do Instituto Pasteur, que postulou que os microrganismos probióticos, no caso, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, produzia efeitos benéficos nos hospedeiros, pois, ao se desenvolver no lúmen intestinal de humanos, inibia o crescimento de bactérias putrefativas ali presentes. Essa capacidade reduziria a produção de substâncias tóxicas, levando os consumidores de iogurtes a viver por mais tempo (Fuller, 2000).

Posteriormente, mostrou-se que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* não sobrevive no trato gastrointestinal de humanos, nem coloniza o intestino. Porém, o trabalho de Metchnikoff iluminou um campo totalmente desprovido de pesquisas,

levando à descoberta posterior de que outras espécies do gênero *Lactobacillus* detinham o poder de sobreviver ao trato gastrointestinal, crescer nestas condições, conferindo benefícios ao hospedeiro, mesmo que, até agora, nenhuma espécie tenha se mostrado apta a colonizar este ambiente. Observou-se, porém, após algum tempo de pesquisas, que a cultura iniciadora para iogurtes detinha o poder de dinamizar a digestão de lactose pela produção de enzimas que permaneciam na luz intestinal, mesmo após a morte bacteriana (Gilliland e Kim, 1984).

Hargrove e Alford (1980) mostraram que a fermentação por certos tipos de microrganismos aumentava o valor nutritivo dos produtos lácteos, possibilitando melhor digestibilidade pelos humanos. Essa técnica conduz a pesquisas focadas em sua ação não no alimento, mas no consumidor do produto, após sua ingestão. Passa-se, então, a buscar os efeitos probióticos das diversas culturas conhecidas e das ainda não descobertas.

Ao longo do tempo, um seleto grupo de microrganismos, apresentados na Tabela 3, vem sendo utilizado como culturas iniciadoras nos processos de fermentação, tanto na fabricação de iogurtes como de queijos. Além dessas espécies, outras passaram a ser adicionadas durante os processos de fabricação, com diferentes funções (Kosikowski, 1977).

Tabela 3. Microrganismos utilizados em produtos lácteos fermentados, derivados de leites

Microrganismo	Função	Produto
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	sabor (ácido propiônico) e olhaduras	Queijo Emmental
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i>	acidificação e sabor	Iogurte, Kefir e queijo Emmental
<i>Lactobacillus lactis</i>	acidificação e sabor	Iogurte, Kefir e queijo Emmental
<i>Lactobacillus helveticus</i>	acidificação e sabor	Iogurte, Kefir e queijo Emmental
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidificação	Leitelho fermentado
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Acidificação	queijos Emmental, Cheddar, queijos italianos e iogurte
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	acidificação e sabor	queijos, manteiga e culturas iniciadoras
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Acidificação	queijo cottage e culturas iniciadoras
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Acidificação	queijo cottage e culturas iniciadoras
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	sabor	queijo cottage e culturas iniciadoras
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	sabor	queijo cottage e culturas iniciadoras
<i>Enterococcus durans</i>	acidificação e sabor	queijos
<i>Enterococcus faecium</i>	acidificação e sabor	queijos

Fontes: Adaptado de IDF (1997); Mogensen (2002)

2.2.2. Conceito

O termo “probiótico” foi definido inicialmente como “organismos vivos que, quando ingeridos, exercem efeito benéfico no balanço da microbiota intestinal do hospedeiro” (Fuller, 1989). Esse conceito foi, posteriormente, enriquecido para “organismos vivos que, quando ingeridos em quantidade adequada, exercem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

A partir desse conceito, surgiu o termo “alimento funcional”, que é considerado qualquer alimento ou ingrediente alimentar que possa exercer efeito benéfico no organismo, além do nutricional, promovendo ou mantendo a saúde. Dentre esses alimentos ou ingredientes, estão os microrganismos probióticos. Esse termo foi introduzido inicialmente no Japão, pelo Ministério da Saúde desse país, *Ministry of Health, Labour and Welfare* (MHLW, 1993) e, até então, era o único país detentor de regulamento técnico para os alimentos funcionais, conhecidos como alimentos para uso específico de saúde ou *Foods for Specific Health Use* (FOSHU).

2.2.3. Características dos microrganismos probióticos

As culturas de microrganismos probióticos usadas em alimentos devem produzir substâncias de interesse, de acordo com o efeito desejado. Os microrganismos

probióticos, dependendo da natureza da cultura, têm potencial de conferir diferentes efeitos benéficos para a saúde humana, se ingeridos de forma regular, pois até então não foi comprovada sua instalação definitiva no lúmen intestinal humano. Para que seja viável o uso desses microrganismos, eles devem resistir às etapas do processamento industrial do produto, ter velocidade de crescimento adequada à produção do alimento e, primordialmente, serem reconhecidamente seguros para a saúde humana, GRAS *Generally Recognized As Safe* (Reid, 1999).

Os microrganismos probióticos podem conferir benefícios à saúde de diversas formas, como redução de níveis glicêmicos, de colesterol, aumento da resposta imune contra invasores do intestino e aumento da capacidade digestiva de alguns elementos. Para tanto, os produtos dessas bactérias devem ser selecionados de acordo com o objetivo específico. Porém, para que essas culturas possam ser usadas em alimentos, esses produtos devem, também, conferir sabor agradável ao alimento (Castilho, 2008).

As características sensoriais dos produtos das culturas utilizadas devem ser mantidas por períodos compatíveis com o viável para fabricação do alimento, sua estocagem, distribuição e consumo. Além disso, a capacidade de crescimento da cultura nas condições do ambiente gástrico, como tolerância ao ácido; e intestinal, como

tolerância à bile e a baixas concentrações de oxigênio, devem ser consideradas, uma vez que a produção de substâncias benéficas só ocorre diante do crescimento bacteriano, ou seu metabolismo (Gilliland, 2001).

Ainda segundo Gilliland (2001), os microrganismos probióticos não se desenvolvem em produtos lácteos da mesma forma que outras culturas tradicionalmente utilizadas, como *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ou *Streptococcus thermophilus*, usados na fabricação do iogurte, ou *Propionibacterium*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, freqüentes em culturas iniciadoras de queijos e em sua maturação. Tendo essa afirmação em vista, deve ser adicionada quantidade suficiente e determinada do microrganismo, no início do processamento do produto, a fim de que se tenha contagem adequada, na ordem de 10^8 UFC/g ou superior, ao final da fabricação. Essa contagem deve ser feita utilizando-se meios de cultura seletivos para isolamento do microrganismo do qual se espera efeito benéfico.

2.2.4. Benefícios

2.2.4.1. Benefícios para o hospedeiro

Os microrganismos probióticos mostram alto potencial para gerar inúmeros benefícios para humanos. O poder de inibição de crescimento de bactérias

indesejáveis, freqüentemente presentes no trato intestinal humano, foi observado em pesquisa com *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* (Cunha *et al.*, 2008). Essas espécies apresentaram efeito antagonista, inibindo o crescimento, *in vitro*, de *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Em estudo semelhante, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus* foram testados, além das espécies anteriores, frente aos mesmos microrganismos patogênicos, apresentando inibição de crescimento de todas as espécies, incluindo *Staphylococcus cohnii* e *Staphylococcus intermedius* (Guedes Neto, 2004).

Controle de infecções intestinais

Observou-se redução de diarreias associadas a antibióticos em crianças de seis a 36 meses de idade que ingeriram continuamente fórmulas comerciais com *Bifidobacterium lactis* e *Streptococcus thermophilus* (Correa *et al.* 2005). Observou-se também a redução da incidência de diarreia de viajantes em grupo que havia ingerido, de forma preventiva cápsulas com *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* (Black, 1989). A inibição de crescimento de bactérias indesejáveis ocorre, não somente por produção de ácidos graxos de cadeia curta (Silva *et al.* 1987 *apud* Gilliland, 2001),

mas, também, por ação de substâncias semelhantes a antimicrobianos. Essas substâncias foram denominadas de bacteriocinas que, segundo Tagg *et al.* em 1976 *apud* Gilliland, 2001, são proteínas bacterianas ativas contra microorganismos diretamente relacionados a elas.

Imunidade frente a infecções intestinais

O aumento da imunidade contra infecções intestinais, associado à ingestão de amostras do gênero *Lactobacillus*, foi registrado por Lessard e Brisson (1987), Sato *et al.* (1988) e Perdigon *et al.* (1990). O microrganismo mais citado foi *Lactobacillus casei* e Romond (1997) registrou esse aumento na imunidade contra *E. coli*, *in vivo*, após ingestão de *Bifidobacterium longum*. O uso desse mesmo microrganismo em crianças se mostrou promissor na prevenção de infecções intestinais por *Candida albicans* (Gibson, 1997).

A imunomodulação promovida por *Bifidobacterium* spp. ocorre por produção de compostos como lipopolissacarídeos endotóxicos, peptidoglicanos e ácidos lipoteicóicos. Esses ácidos estimulam a produção de interleucinas e têm alta afinidade por antígenos, impedindo que estes se alojem no tecido do hospedeiro, causando reação inflamatória (Standiford, 1994)

Redução da intolerância à lactose

A intolerância à lactose é causada pela produção restrita de β -galactosidase, enzima que digere a lactose, pelo processo da fermentação, em humanos. Esses indivíduos, momentos após ingestão de produtos lácteos não fermentados, apresentam lactose não digerida em grandes quantidades no intestino. Essa condição leva, por gradiente de osmolaridade, à diarreia e à flatulência. O desconforto dessas pessoas pode ser reduzido com o uso de microrganismos presentes em culturas iniciadoras de iogurtes, que possuem a β -galactosidase no interior da célula bacteriana. Essa condição protege a enzima até sua chegada ao intestino, pois esta não é resistente às enzimas digestivas do estômago (Gilliland e Kim, 1984). Ao chegar ao intestino delgado, a célula bacteriana sofre ação da bile, o que a torna permeável à lactose presente no meio para sua hidrólise (Noh e Gilliland, 1993). Essa é a razão de a cultura iniciadora de iogurte, apesar de não resistente à bile e de sua incapacidade de crescer no intestino, ser também chamada de cultura probiótica.

Inibição de formações carcinogênicas

Alguns microrganismos probióticos também apresentam indícios de serem úteis na prevenção de formações carcinogênicas ou mutagênicas, segundo Oda *et al.* (1983). Apesar de o mecanismo de inibição das mutações celulares não estar ainda

elucidado, Reddy *et al.*(1993) observaram redução de 100% na incidência de carcinogênese induzida pela adição de 2-amino-3-metilimidazol[4,5-f]quinolina, agente resultante de fritura de carnes e peixes, na dieta de ratos que recebiam *Bifidobacterium longum*, também pela dieta. Em seu estudo, sugeriu-se que a ação do microrganismo deve ocorrer na luz do intestino, onde deve se ligar à substância de conhecido poder mutagênico, impedindo que ela atue no tecido do hospedeiro. Outra hipótese é a de metabolização hepática e liberação de metabólitos pela bile. Esses metabólitos podem então ser hidrolizados por enzimas bacterianas ou ainda aderidos às membranas celulares bacterianas e eliminados nas fezes (Zhang *et al.*, 1991).

Controle de hipercolesterolemia

Outra grande capacidade demonstrada pelos microrganismos probióticos é a de reduzir o nível de colesterol (LDL) no plasma sanguíneo (Mann e Spoerry, 1974 *apud* Gilliland, 2001). Nesse estudo, o microrganismo associado a esse benefício é o *Lactobacillus acidophilus*. Com o intuito de esclarecer o mecanismo pelo qual o microrganismo reduz os níveis de colesterol plasmático, Gilliland *et al.* (1985) e Gopal *et al.* (1996) demonstraram que as moléculas de colesterol são absorvidas pelo *Lactobacillus acidophilus*, que as usam para seu crescimento *in vitro*. Isso sugere que essa absorção pelas bactérias possa ocorrer antes que as moléculas de colesterol

possam ser absorvidas pela parede intestinal e alcançar a circulação sanguínea. Outras espécies foram estudadas, apresentando potencial similar ao do *Lactobacillus acidophilus*, como o *Lactobacillus casei*, estudado por Brashears *et al.* (1998), *Bifidobacterium longum*, estudado por Gopal *et al.* (1996) e *Bifidobacterium bifidum*, por Rajpal e Kansal (2009).

2.2.4.2. Segurança alimentar

Os benefícios do uso de microrganismos probióticos, até então citados, dizem respeito ao benefício direto ao hospedeiro, ou consumidor do alimento. Há, porém, as vantagens indiretas do seu uso, como a melhoria das características organolépticas e de segurança microbiológica do alimento no qual foi adicionada cultura de conhecido poder probiótico. Esses efeitos, entretanto, variam de acordo com a matriz do alimento estudado e da microbiota originalmente encontrada no alimento.

Apesar de os microrganismos probióticos virem sendo avaliados em leites fermentados, Fuller (1989) salientou o potencial de seu uso em vários tipos de alimento, não mais apenas em leites fermentados. O autor sugeriu então vários outros produtos derivados lácteos como queijos, sorvetes e alimentos para crianças como possíveis carreadores de microrganismos probióticos. Seguindo essa linha de pesquisa, o queijo passou a ser estudado com esse intuito.

Existem algumas culturas, atualmente utilizadas na fabricação de queijos, que apresentam propriedades probióticas, como *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Propionibacterium arabinosum* e *Staphylococcus sciuri* (IDF, 1997). A mesma fonte apresenta, ainda, várias outras espécies de bactérias acidoláticas ou não, que apresentam efeitos benéficos, sendo denominadas como probióticas, que têm seus efeitos e comportamentos estudados em queijos, tanto no processo de fabricação, como na estocagem e maturação.

Queijos elaborados utilizando-se algumas espécies consideradas probióticas apresentaram boas características sensoriais além de melhor qualidade sanitária. Em diversos ensaios mostrados a seguir observa-se o controle do crescimento de microrganismos indesejados nos queijos, quando da presença de microrganismos probióticos.

No trabalho de Nayra *et al.* (2002), microrganismos considerados probióticos pela IDF (1997), como *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium bifidum* foram testados em queijo mole, por um período de maturação de quatro meses, sob refrigeração entre 5 e 7°C. Em seu estudo, os autores observaram um aumento na contagem de bactéria acidoláticas nos dois primeiros meses e posterior decréscimo, e *Lactobacillus*

acidophilus e *Bifidobacterium bifidum* aumentaram sua contagem no primeiro mês e decresceram nos seguintes. Dos microrganismos testados, os autores registraram, após dois meses, contagem adequada, de todos, para promoverem efeitos benéficos, havendo potencial para ação probiótica no produto final com maturação de até dois meses. Comportamento semelhante foi observado por Vinderola *et al.* (2000), quando a contagem de *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* foi satisfatória para funcionar como probiótico no queijo fresco argentino.

Além das capacidades probióticas dos microrganismos estudados, Ross *et al.* (2000) enfatizaram a importância dessa tecnologia para o controle da microbiota em queijos, sendo o uso de microrganismos probióticos um aliado, não apenas da saúde humana, mas do controle da qualidade do produto final, em termos sanitários e sensoriais. Segundo Abd Alla (2008), a presença de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus reuteri* previne e reduz o crescimento de fungos e a produção de aflatoxinas, bem como do número de coliformes. Esse autor afirma, ainda, que a contagem dos microrganismos probióticos utilizados nos queijos foi de $1,6 \times 10^7$ ao final do período de maturação de 90 dias, sendo essa contagem satisfatória para que os microrganismos exerçam seus efeitos benéficos no consumidor até o período analisado. Dabiza (2008) compara queijos

elaborados com *Lactobacillus acidophilus* e com o grupo controle, fabricado com *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Como resultado, o estudo apresentou características sensoriais equiparadas após 28 dias de maturação dos dois grupos e melhor qualidade microbiológica do grupo fabricado com o microrganismo probiótico. Observa-se boa qualidade sensorial de queijos elaborados com microrganismos probióticos, após variados períodos de maturação (Cichoski *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2008).

Lactobacillus gasseri mostrou comportamento semelhante aos outros microrganismos probióticos estudados, sendo viável em contagem acima de 10^6 UFC/g de queijo (Zehntner, 2008). Esse microrganismo ainda controla o crescimento de coliformes, *Staphylococcus* e fungos e exerce efeitos benéficos em indivíduos intolerantes à lactose (Dabiza, 2007). Os queijos com adição desse microrganismo, juntamente com *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus casei*, apresentaram propriedades sensoriais agradáveis, equivalentes aos produtos controle, apresentando algumas amostras com características sensoriais ainda mais desejáveis (Dabiza, 2006). Tais características sensoriais dos queijos produzidos com *Lactobacillus gasseri* devem-se ao fato de esse microrganismo inibir o crescimento de *Clostridium tyrobutyricum*, reduzindo os riscos de formação de compostos de sabor

desagradável no queijo (Matjasic *et al.*, 2007). Atividade antifúngica foi observada em queijos Edam produzidos com *Lactobacillus paracasei* (Tuma *et al.*, 2008). Outro efeito observado foi a capacidade antioxidativa apresentada por *Lactobacillus fermentum*, quando em queijos com diferentes níveis de gordura (Järvenpä, 2007).

2.2.5. Riscos do uso de microrganismos probióticos

Os benefícios para a saúde, que se esperam obter pelo uso de microrganismos probióticos, só ocorrerão se estes forem reconhecidos como seguros para a saúde humana (GRAS). Porém, alguns gêneros considerados pela IDF (1997) como probióticos merecem atenção pelo risco de seu uso. Nem todas as espécies do gênero *Enterococcus* ou *Staphylococcus* podem ser classificadas como seguras, ou GRAS, sendo, em muitos casos, de alta patogenicidade.

Amostras do gênero *Enterococcus* foram reconhecidas como causadoras de endocardite, bacteremia, infecções nervosas e sistêmicas, infecções neonatais, respiratórias e urinárias, se bem que em pacientes de conhecida susceptibilidade imunológica (Moellering, 1992). Além de fatores de virulência, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* albergam genes de resistência a antibióticos e, segundo Franz (1999), a resistência à vancomicina é

crescente. O fato de essas espécies causarem infecções não tratáveis, segundo Vankerckhoven *et al.* (2008), as inabilita para uso como probióticos, além de a disseminação de genes de resistência por expansão clonal e transmissão horizontal desencorajarem o uso de quaisquer outras espécies do gênero.

Apesar de as bactérias do grupo do ácido láctico não terem sido relatadas como causadoras de infecções em humanos, seu uso deve ser limitado para pessoas com qualquer deficiência imunológica.

As bactérias acidoláticas, apesar de deverem ser utilizadas com cautela até domínio de seu uso, não apresentam potencial patogênico, sendo seu uso seguro em pessoas saudáveis. Outra grande vantagem desse grupo é sua grande importância para a indústria de alimentos, seja por vantagens industriais, seja por sua capacidade de conferir efeitos benéficos para o consumidor ou ainda por melhorar a qualidade sanitária do alimento.

2.3. Bactérias acidoláticas

Bactérias acidoláticas são um grupo de cocos, bastonetes e cocobacilos Gram positivo composto por 11 gêneros que são *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Jay, 1996). Esses gêneros apresentam em

comum uma baixa proporção C:G na estrutura de seu material genético, alta tolerância ao baixo pH, ainda porque têm como principal produto de seu metabolismo o ácido láctico, proveniente da via metabólica estritamente fermentativa. Além disso, não formam esporos, são aerotolerantes, porém não aeróbios. Há outros gêneros que satisfazem as mesmas características citadas; porém, não são relevantes na indústria de alimentos, sendo estes 11 gêneros já enumerados os principais representantes das culturas lácticas utilizadas como iniciadoras do processo fermentativo em derivados do leite e da carne, sobretudo (Broadben, 1996).

2.3.1. *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus é uma espécie do grupo das bactérias acidoláticas, que se caracteriza como bastonetes curtos Gram positivo e de alta capacidade de acidificação do meio por ação de seu metabolismo de fermentação de carboidratos e produção de ácido láctico. São incapazes de formar esporos e são anaeróbios facultativos, podendo ser mais sensíveis ao oxigênio, exigindo menor tensão deste para melhorar seu crescimento, que tem maior taxa entre 30 e 40°C (Garrity, 2005).

Seu uso industrial é restrito à produção de alimentos, porém sua presença em derivados de leite é observada, sobretudo, em queijos artesanais, ou produzidos com leite sem tratamento térmico (Sena, 2001;

Guedes Neto, 2004). Sua presença foi também descrita em trato gastrointestinal e microbiota vaginal de mamíferos. Esta espécie é considerada GRAS e apresenta potencial probiótico, segundo IDF (1997), inclusive com demonstrada atividade de prevenção contra H1N1 em ratos (Harata *et al.* 2010).

2.3.2. *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis é uma bactéria ácido-láctica que se apresenta na forma de cocos Gram positivo em fileiras ou em duplas, frequentemente utilizado na produção industrial e artesanal de derivados lácteos.

São microrganismos não móveis, anaeróbios facultativos e catalase positivo, que atinge maior taxa de crescimento em temperaturas próximas de 30°C, podendo crescer a 10°C. Seu metabolismo fermentativo produz ácido láctico, porém não forma gás, o que faz dessa espécie um potencial auxiliador em processos industriais (Holt *et al.*, 1993).

Seu uso industrial é consolidado na forma de culturas liofilizadas para produção de leites fermentados, manteiga e queijos, com o intuito, sobretudo, de acidificação do meio através da produção de ácido láctico.

Este microrganismo é também encontrado em leite fresco, além de derivados lácteos produzidos a partir de leite sem tratamento térmico prévio.

Apesar de a presença desse microrganismo estar intimamente ligada aos derivados do leite, sua utilização ultrapassa tais barreiras, sendo associado à modulação imunológica (Marinho *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010) e à tecnologia de alimentos funcionais (Mercade *et al.*, 2000).

2.4. *Staphylococcus spp.*

As bactérias do gênero *Staphylococcus*, pertencentes à família Micrococaceae, compõem um numeroso grupo de 27 espécies e sete subespécies (Baird-Parker, 1974). Suas características genéticas, fisiológicas e bioquímicas são diversas e, morfologicamente, *Staphylococcus spp.* são caracterizados como cocos Gram positivos imóveis, não esporulados, que se agrupam em cachos. Essa formação, semelhante a cachos de uva, foi responsável por nomear esse gênero, sendo *staphyle*, cachos de uva em grego, e *coccus*, grãos (Baird-Parker, 1990). Bioquimicamente, cada espécie se comporta de maneira diferente, podendo ser positiva ou negativa para as provas de coagulase, catalase e termonuclease. São anaeróbios facultativos, medindo cerca de 0,5 a 1 µm de diâmetro (Baird-Parker, 1974).

Esses microrganismos são habitantes naturais de pele e mucosa de mamíferos, mãos, leito subungueal, fossas nasais e garganta de humanos saudáveis. Estão ainda, frequentemente envolvidos em inflamações intramamárias de fêmeas em

lactação, sendo o principal agente causador da mastite em bovinos (Nader Filho, 2007).

2.4.1. *Staphylococcus aureus*

Sendo a mastite uma enfermidade frequente no rebanho brasileiro, e *Staphylococcus* spp. um microrganismo frequentemente envolvido, compreende-se que boa parte do leite cru produzido no país apresenta certos níveis de contaminação, principalmente de *Staphylococcus aureus*, apesar de *Staphylococcus intermedius* também estar presente em produtos derivados de leite (Sena, 2000; Nader Filho, 2007).

Os queijos produzidos com leite cru são facilmente atingidos por contaminações com *Staphylococcus* spp. em virtude de não passarem por processamento térmico. As contaminações podem atingir contagens altas, como registrada por Guedes Neto (2004) em queijo de coalho, com 10⁶ UFC/g de *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxinas, principalmente SEB.

2.4.2. Enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* spp. são proteínas globulares de cadeia simples, solúveis em água e termoestáveis, resistindo a tratamentos térmicos com temperaturas superiores a 100°C (Carmo, 2001), como a utilizada na pasteurização do leite. As enterotoxinas são resistentes também a enzimas proteolíticas como tripsina, pepsina, quimosina e papaína, mantendo-a

ativa após passagem pelo aparelho digestivo e também após passagem pelo processamento de fabricação do queijo.

Há diferentes tipos de enterotoxinas, tendo sido identificados 16. Desses, os nomeados SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃ SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ foram identificados por reações imunológicas, possibilitando sua detecção. Os outros tipos foram detectados por seqüenciamento de genes capazes de transcrevê-los, mas ainda não foram purificados, inviabilizando a detecção imunológica (Carmo, 2002).

2.4.2.1. Enterotoxinas mais frequentes em alimentos

As análises de alimentos e a detecção de toxinas apontam a toxina SEA como a mais frequentemente encontrada associada a surtos de intoxicação alimentar no mundo (Sena, 2000; Carmo, 2002).

2.4.2.2. Enterotoxinas mais frequentes em queijos artesanais

Queijos artesanais brasileiros foram analisados e, em Minas Gerais e em Pernambuco, a toxina encontrada em maior frequência foi SEB, seguida por SEA, ainda que diversas outras tenham sido encontradas em menor frequência e em menor quantidade (Sena, 2000; Carmo 2002).

2.4.3. Intoxicações alimentares

Há relato de intoxicação alimentar associada à presença de *Staphylococcus* spp. desde 1884, quando um grande surto de toxinfecção alimentar foi documentado por Vaughan, envolvendo queijo, em Michigan, Estados Unidos (Baird-Parker, 1990). O microrganismo foi isolado com sucesso, pela primeira vez por Rosembach, em 1884 (Baird-Parker, 1990).

O fator de maior importância nas toxinfecções são as enterotoxinas produzidas por estes microrganismos, capazes de provocar quadro de infecções graves, em que o indivíduo desenvolve os sintomas entre 15 minutos e seis horas após a ingestão do alimento (Carmo, 2001). Os sintomas mais comumente apresentados são náusea, dor de cabeça, enjoo, cólica abdominal, vômito, diarreia, prostração, hipotensão sanguínea e, em casos extremos, óbito (Carmo, 2001).

3. Hipóteses

- *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* seriam viáveis em queijos frescos até 14 dias após produção, em contagens suficientes para promover efeitos benéficos na luz intestinal do consumidor do produto.
- *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*, em contagens

10^7 e 10^8 UFC/g, respectivamente, teriam atividade antagonista frente a *Staphylococcus aureus* em contagem de 10^6 , reduzindo sua viabilidade em queijos frescos. e sua produção de enterotoxinas.

- *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*, em contagens de 10^7 e 10^8 UFC/g, respectivamente, seriam capazes de reduzir a produção de enterotoxina por *Staphylococcus aureus*, em queijos frescos.

4. Objetivos

- Avaliar a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* e de *Lactococcus lactis* em queijos frescos produzidos com adição dessas culturas.
- Estudar as atividades antagonistas de *Lactobacillus rhamnosus* e de *Lactococcus lactis* frente a *Staphylococcus aureus*, em queijos frescos.
- Verificar a possível inibição de produção de enterotoxinas estafilocócicas em queijos frescos produzidos com adição de culturas de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* e *Staphylococcus aureus*, em

contagens semelhantes às aquelas encontradas em queijo de coalho.

5. Material e métodos

5.1. Delineamento experimental

Foram elaborados 30 queijos frescos de 200g a partir de cinco lotes distintos de leite em pó desnatado Molico reconstituído a 10%. Para inoculação no leite, duas culturas de bactérias acidoláticas, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*, bem como *Staphylococcus aureus*, foram combinados de cinco formas diferentes, compondo queijos distintos. Além dessas combinações, foi elaborado um queijo controle em que não houve adição de qualquer inoculo. Os queijos elaborados foram armazenados sob refrigeração, em temperaturas entre 4 e 8°C, e analisados no 1º, no 4º, no 7 e no 15º dia pós produção. Portanto, esse experimento foi realizado em um fatorial de 5x6x4.

A atividade antagonista das bactérias acidoláticas frente a *Staphylococcus aureus* foi determinada por um delineamento em blocos, representados pelos diferentes lotes de leite, com parcela subdividida. Representando as parcelas estavam os seis tipos de queijo e a subdivisão foi representada pelos diferentes tempos de análise.

5.2. Análises do leite em pó

5.2.1. Teste de inibidores de crescimento microbiano

Cada lote de leite em pó utilizado para produção de uma repetição de queijos foi analisado pelo método T (TTC) (Neal e Calbert, 1955), a fim de se confirmar a ausência de inibidores de crescimento bacteriano, para que esse leite pudesse ser utilizado adequadamente para produção de queijos com inoculação de culturas conhecidas, objetos deste estudo.

Reconstituição do leite em pó

O leite em pó desnatado foi reconstituído de acordo com a recomendação do fabricante. Para tanto, foram dissolvidos 10g do pó em 90mL de água destilada estéril e foram deixados em repouso por 30 minutos, produzindo 100 mL de leite fluido.

Eliminação de inibidores naturais e microbiota

Dez mL do leite reconstituído foram colocados, em duplicata, em tubos de ensaio. Assim, foram deixados por 10 minutos em banho-Maria a 80°C. Em seguida, as amostras foram resfriadas a 45°C.

Determinação de presença de inibidor

Cultura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* foi inoculada às amostras, na proporção 1:1, e estas foram incubadas em estufa por duas horas a 45 °C. Após essa incubação, 0,3 mL do reagente 2, 3, 5 – trifeniltetrazolium (TTC), em diluição 1:25 foi adicionado ao tubo, que foi novamente incubado na estufa a 45°C, por mais 30 minutos. O metabolismo bacteriano foi observado a partir da mudança de cor dos tubos, sendo róseo indicativo de crescimento bacteriano.

5.2.2. Teste de enterotoxinas estafilocócicas

O leite em pó foi analisado pela técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) tipo ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) para detecção de enterotoxinas estafilocócicas do tipo SEB (Biomérieux, 2008).

Preparo do extrato da amostra

Foram reconstituídos 2,5g de leite em pó, formando 25mL de leite fluido. Este volume de leite teve seu pH ajustado para 3,5 a 4,0 com auxílio de HCl 5N. As amostras foram centrifugadas, em tubos Falcon 50mL a 4000G (6000RPM) em centrífuga refrigerada Jouan (*Azé Bellitourne, Château-Gontier, França*) a 20°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e seu volume mensurado.

Foi feita rápida adição de 5% deste volume de solução aquosa de ácido tricloroacético 90%. Os tubos foram agitados e, em seguida, deixados em repouso por 30 minutos a 20°C para que ocorresse a precipitação das proteínas presentes. Após formação de suspensão, foi feita outra centrifugação, utilizando-se os mesmos parâmetros da primeira. O sobrenadante, dessa vez foi desprezado e o colóide protéico foi redissolvido com o auxílio de tampão TRIS 0,3 mol/L e pH 8 no volume de um décimo do volume do sobrenadante mensurado e tratado com TCA. O pH desta nova solução foi ajustado entre 7,5 e 8,0, quando a solução se tornou límpida.

Essa solução teve 500µL transferidos para o orifício correspondente do kit VIDAS® (*Lyon, Marcy-L'Étoile, França*) Staph Enterotoxin II (SET2).

Realização do teste

Os kits com as amostras foram introduzidos no equipamento VIDAS®, onde as lavagens foram realizadas de forma automática e a leitura do último orifício da placa foi feita, revelando o resultado impresso e quantificado em absorbância acima de 0,13.

O leite reconstituído para análise pelo método TTC foi diluído em escala decimal até 10⁻³ e as três diluições foram plaqueadas em meios Baird Parker, MRS e M17 (*Difco, Franklin Lakes, USA*), a fim de se verificar se havia presença de microrganismos em contagem suficiente para interferir nas

contagens posteriores e também se havia presença de *Staphylococcus* spp, capaz de alterar a detecção de enterotoxinas, posteriormente.

A presença de colônias nas placas foi anotada e caracterizada, e foi feita a coloração pelo método de Gram para identificação pela morfologia. O resultado foi expresso multiplicando-se o número de colônias presente pelo inverso da diluição e por 10, em unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro de leite (Lancette & Tatini, 1992).

5.3. Produção de queijos

Foram produzidos trinta queijos frescos de 200g cada, a partir de leite em pó desnatado Molico, de cinco lotes distintos, reconstituído após análise e confirmação de ausência de inibidores de crescimento microbiano, de *Staphylococcus* spp. e enterotoxinas estafilocócicas. Nesses queijos foram inoculadas culturas de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* isolados de queijo coalho produzidos em Pernambuco e identificados ao nível molecular por PCR ARDRA 16s-23s (Guedes Neto, 2004). Foi utilizado também *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina tipo B (SEB), gentilmente cedido pelo Professor Luiz Simeão do Carmo. Essas culturas foram inoculadas ao leite, em diferentes combinações, no momento da fabricação, anteriormente à formação do coágulo, em contagens

específicas e determinadas, de acordo com os dados obtidos por Guedes Neto (2004) em queijo Coalho de Pernambuco.

Nesse estudo, foram avaliadas as contagens de bactérias acidoláticas e patogênicas encontradas naturalmente neste queijo. As contagens inoculadas foram baseadas neste estudo e visando a proximidade com a realidade. Devido ao baixo rendimento do leite na produção de queijo, de aproximadamente 10% do volume de leite utilizado e de acordo com experimento piloto, para que houvesse a contagem esperada no queijo, essas cepas foram inoculadas em contagem de 2 unidades logarítmicas superiores ao encontrado por Guedes Neto (2004).

As contagens encontradas nos queijos coalho de Pernambuco foram de 10^7 UFC/g de *Lactobacillus rhamnosus*, 10^8 UFC/g de *Lactococcus lactis* e 10^6 UFC/g *Staphylococcus aureus*. Então, os inóculos foram preparados nas contagens de 10^9 UFC/mL de *Lactobacillus rhamnosus*, 10^{10} UFC/mL de *Lactococcus lactis* e 10^8 UFC/mL de *Staphylococcus aureus*.

As cepas de bactérias lácticas utilizadas nesse trabalho, após isolamento do queijo coalho, apresentaram maiores halos de inibição frente a *Staphylococcus aureus* em ensaio *in vitro* e foram denominadas AQ1 - *Lactobacillus rhamnosus* e CM2 - *Lactococcus lactis*. A cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada foi FRI S-

6, Isolada no *Food Research Institute*, gentilmente cedida pelo Dr. Luiz Simeão do Carmo e de capacidade conhecida e comprovada de produção de toxina B (SEB). Esta cepa foi escolhida para este trabalho devido à alta frequência desta enterotoxina estafilocócica em queijos artesanais no Brasil, segundo Sena (2001).

As contagens dos inóculos foram padronizadas por enumeração do cultivo após 24h de incubação dos inóculos em caldo MRS, M17 e BHI respectivamente. A enumeração apontou crescimento na ordem de 10^9 UFC/mL no cultivo após 24 horas de incubação. Considerando que o inóculo de AQ1 deve conter 10^9 UFC/mL, este não demandou preparação prévia, havendo no crescimento após 24 horas 10^9 UFC/mL. O inóculo de CM2 foi obtido após centrifugação do cultivo a 2000RPM por 5

minutos em centrífuga, descarte dos cinco mL de caldo M17 sobrenadante e posterior ressuspensão em 0,5mL de salina tamponada, obtendo-se 10^{10} UFC/mL. O inóculo de FRI S-6 foi preparado por diluição do cultivo em volume dez vezes maior que o inicial, obtendo-se contagem final de 10^8 UFC/mL.

Dessa forma, os queijos foram preparados seguindo o esquema apresentado pela figura 1, a partir das soluções previamente preparadas de acordo com a Tabela 4.

Após inoculação e preparo dos queijos, estes foram armazenados em vasilhas plásticas com tampas higienizadas por imersão em hipoclorito a 400ppm durante 15 minutos e em câmara fria em temperatura entre 4 e 8°C, durante os 15 dias de enumerações.

Tabela 4: Tratamentos – queijos e seus inóculos.

Queijo	Inóculo	Volume
1	Salina tamponada estéril	1mL
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1mL
3	<i>Lactococcus lactis</i>	1mL
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	1mL
5	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	1mL cada
6	<i>Lactococcus lactis</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	1mL cada

Reconstituição do leite em pó desnatado Molico em água destilada estéril – 30 minutos; 45°C



Adição dos inóculos conforme Tabela 4 – Repouso por 15 minutos; 32°C



Formação do coágulo



Coalho Ah La (Christian Hansen) – Quimosina 0,9%

Repouso por 45 minutos; 32°C



Corte da massa com uso de espátula estéril



Mexedura lenta com uso de espátula estéril – 5 minutos



Descanso de 15 minutos



Enformagem



Estocagem a 4-8°C pelo período de análise

15 dias

Figura 1. Fluxograma de produção dos queijos

5.4. Análises dos queijos

5.4.1. Enumeração de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* e *Staphylococcus aureus* (Mac Faddin, 1980; IDF, 1983)

Nos dias 1º, 4º, 7º e 15º após a elaboração dos queijos, 25g de cada amostra foram pesados, triturados e diluídos em 250 mL de solução salina tamponada (0,85%), correspondendo à diluição 10^{-1} . Em seguida foram preparadas diluições decimais até

10⁻⁷ utilizando-se o mesmo diluente descrito acima.

Inoculação nos meios de cultura

A partir de cada uma das diluições realizadas, uma alíquota de 0,1 mL foi semeada na superfície de placas de Petri contendo os meios de cultura ágar MRS (Man - Rogosa - Sorbitol) (*Difco, Detroit, USA*) e ágar M17 (*Difco*) e Agar Baird Parker (*Difco*). Em seguida, os inóculos foram espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski.

Incubação

As placas com ágar MRS (*Difco*) foram incubadas a 37°C, durante 48 horas, em câmara de anaerobiose (*Forma Scientific Company, Marietta, USA*), em atmosfera de N₂ a 85%, H₂ a 10% e CO₂ a 5%, enquanto as placas com ágar M17 (*Difco*) e ágar Baird Parker (*Difco*) foram incubadas a 37°C, durante 48 horas, sob aerobiose, em estufa bacteriológica.

Enumeração dos microrganismos

Após a incubação, foi realizada a enumeração das UFC sendo consideradas para enumeração placas contendo de 20 a 200 UFC. Em placas onde houve a presença de mais de um morfotipo, estes foram selecionados e corados pelo método de Gram para identificação de bastonetes Gram positivo e cocos Gram positivo,

sendo enumerados apenas os morfotipos condizentes com o inóculo.

No ágar Baird Parker, foram consideradas típicas as colônias negras brilhantes, de forma arredondada, convexa, com bordos regulares, puntiformes, circundados por um halo branco de lipase e outro externo, maior e transparente, devido à ação da lecitinase. As colônias que se apresentaram sem halo, ou com apenas um, negras ou cinza, mucosas com ou sem brilho foram consideradas como atípicas e não foram enumeradas. Em seguida, foi realizado o cálculo de UFC/g, multiplicando-se o número de colônias formadas por 10 e pelo inverso da diluição, resultando em UFC por grama de queijo (Lancette & Tatini, 1992; Carmo, 2001).

5.4.2. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas (Lancette and Tatini, 1992; Brasil, 1996)

As amostras dos dias 4^o, 7^o e 15^o após a fabricação foram congeladas, liofilizadas e, posteriormente, analisadas pela técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) tipo ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) para detecção de enterotoxinas estafilocócicas do tipo SEB (Biomérieux, 2008).

Preparo do extrato da amostra

Foram pesados 25g de queijo. Esse material foi macerado e a ele foram

adicionados 40 mL de água destilada estéril. Após agitação a suspensão foi deixada em contato por 30 minutos. Essa suspensão teve seu pH ajustado para 3,5 a 4,0 com auxílio de HCl 5N. As amostras foram centrifugadas em tubos Falcon 50mL a 4000G (6000RPM) em centrífuga refrigerada (Juan) a 20°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e seu volume mensurado. Foi feita rápida adição de 5% deste volume de solução aquosa de ácido tricloroacético 90%. Os tubos foram agitados e, em seguida, deixados em repouso por 30 minutos a 20°C para que ocorresse a precipitação das proteínas presentes. Após formação de suspensão foi feita outra centrifugação, utilizando-se os mesmos parâmetros da primeira. O sobrenadante, dessa vez, foi desprezado e o colóide protéico foi dissolvido com o auxílio de tampão TRIS 0,3 mol/L e pH 8 no volume de um décimo do volume do sobrenadante mensurado e tratado com TCA. O pH desta nova solução foi ajustado entre 7,5 e 8,0, quando a solução se tornou límpida.

Essa solução teve 500µL transferidos para o orifício correspondente do kit VIDAS® Staph Enterotoxin II (SET2).

Realização do teste

Os kits com as amostras foram introduzidos no equipamento VIDAS®, onde as lavagens foram realizadas de forma automática e a leitura do último orifício da placa foi feita, revelando o resultado impresso e

quantificado em absorbância a partir de 0,13.

5.5. Análise estatística

Os valores obtidos para enumeração foram tratados com estatística não paramétrica e, por essa razão, os dados foram apresentados na forma de valores originais (UFC/g) e não em logaritmo. Para tal avaliação, o teste de Friedman foi utilizado pelo programa Saeg para Windows, a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

6. Resultados e discussão

6.1. Qualidade do leite em pó

6.1.1. Inibidores de crescimento bacteriano

Após reconstituição do leite, crescimento da cultura para iogurte e adição do reagente TTC, as amostras adquiriram coloração rósea, indicando presença de crescimento bacteriano e conseqüente ausência de inibidores no leite. Este resultado já era esperado, pois é conhecida a rigorosa seleção do leite na empresa produtora do leite em pó da marca utilizada, sobretudo quanto ao quesito resíduos de antimicrobianos. Estes lotes de leite foram então considerados adequados para o preparo dos queijos deste experimento.

6.1.2. Teste de enterotoxinas

Os cinco lotes de leite utilizados no ensaio foram analisados pelo teste ELISA/ELFA para testar a presença de enterotoxinas de *Staphylococcus*.

Em todas as amostras testadas, o equipamento VIDAS acusou ausência de qualquer tipo de toxina, resultado este que demonstra alto grau de qualidade do leite recebido pela indústria para beneficiamento. Assim, os lotes de leite analisados considerados foram considerados aptos para serem utilizados na fabricação dos queijos.

6.1.3. Enumeração de unidades formadoras de colônia no leite

Os cinco lotes de leite foram analisados, após diluição, em placas com ágar MRS, M17 e Baird Parker.

Em nenhuma das placas ou diluições houve crescimento de colônias, não havendo interferência nas contagens posteriores dos queijos. Entretanto, houve crescimento de duas colônias em placa onde foram plaqueados 100µL de leite não diluído. Não foi possível determinar a contagem desse espécime no leite em virtude do baixo número de colônias detectado, mas admite-se que a contagem foi inferior a 2×10^2 UFC/mL. À observação ao microscópio do esfregaço submetido à coloração de GRAM, este morfotipo de colônia se

apresentou positivo e na forma de cocos, podendo ser justificada sua presença no leite pela resistência à pasteurização de formas termodúricas como *Streptococcus* spp. Esse resultado não se repetiu no queijo, provavelmente por esse microrganismo se encontrar em baixíssima contagem no leite, contagem esta que não foi identificada pelo método de contagem em placas, bem como pelo fator diluição do processo de produção de queijos. Durante a produção do queijo, houve perda de aproximadamente 90% do volume total em forma de soro, sendo este talvez o responsável por eliminar boa parte da população bacteriana, reduzindo-a em 2 unidades logarítmicas da contagem inicialmente presente no leite. Esse efeito se repetiu para as amostras acidoláticas e para *Staphylococcus aureus* utilizados para a produção dos queijos.

6.2. Análises dos queijos

6.2.1. Enumeração de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* e *Staphylococcus aureus* nos queijos (Mc Faddin, 1980; IDF, 1983)

Os queijos produzidos com os cinco lotes de leite foram analisados e *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* e *Staphylococcus aureus* foram enumerados em ágar MRS, M17 e Baird Parker respectivamente. Os resultados se encontram representados nas Tabelas 5, 6 e 7 a seguir.

Tabela 5. Valores de medianas de enumeração, em UFC/g, de *Staphylococcus aureus* em queijos frescos, durante estocagem por 15 dias à temperatura de 4-8°C

Inóculos	Tempo			
	D1	D4	D7	D15
1 - Nenhum	<2x10 ⁵ b	<2x10 ⁵ b	<2x10 ⁵ b	<2x10 ⁵ b
4 - <i>S. aureus</i>	3,3x10 ⁷ a	1,4x10 ⁷ a	9,8x10 ⁶ a	3,6x10 ⁶ a
5 - <i>S. aureus</i> e <i>L. rhamnosus</i>	2,1x10 ⁷ ab	6,0x10 ⁶ ab	7,6x10 ⁶ ab	5,3x10 ⁶ ab
6 - <i>S. aureus</i> e <i>L. lactis</i>	1,0x10 ⁷ b	9,2x10 ⁶ ab	6,6x10 ⁶ ab	5,4x10 ⁶ ab

*Letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Friedman (p<0,05)

Não foi registrada diferença estatisticamente significativa para contagem de *Staphylococcus aureus* entre os quatro tempos de análise, se bem que houve sutil variação numérica que foi representada nos Gráficos 1 e 2, nas páginas seguintes, onde pode-se observar a progressão descendente da contagem de *Staphylococcus aureus* isoladamente. Esse comportamento pode ter ocorrido em virtude da redução do pH na matriz alimentar no decorrer do tempo pós produção. É interessante salientar, porém, que essa redução foi menor nos queijos em que *Staphylococcus aureus* estava associado a *Lactobacillus rhamnosus* ou a *Lactococcus lactis*. Esse fato é curioso, pois em conjunto com bactérias acidoláticas, é de se esperar que o pH seja menor com o avançar do tempo. Essa observação

confirma o fato de que *Staphylococcus* spp. tem alta resistência a baixo pH, podendo crescer satisfatoriamente em pH entre 4 e 9,8.

Houve diferença estatística entre as contagens de *Staphylococcus aureus* no queijo em que este foi inoculado separadamente e em que foi inoculado juntamente a *Lactococcus lactis*, com a segunda contagem sendo inferior à primeira. A redução ocorrida na presença dessa bactéria acidoláctica ocorreu apenas no 1º dia após a produção, sugerindo que o efeito de antagonismo entre as duas amostras em questão é momentâneo e se apresenta com maior intensidade nas primeiras horas após produção do queijo. Nos momentos subseqüentes esse efeito não

pôde mais ser visualizado, possivelmente pelo perfil de crescimento de *Lactococcus lactis*, que cai bruscamente entre o 4° e o 7° dia após a produção.

Nos dias 1, 4 e 7 após a produção dos queijos, pôde-se observar que a contagem de *Staphylococcus aureus* foi maior no queijo em que esta amostra foi inoculada isoladamente do que nos outros em que foi inoculada em conjunto com *Lactobacillus rhamnosus* ou com *Lactococcus lactis*. Observou-se, ainda, que essa redução em seu crescimento nos queijos em que foi inoculado conjuntamente com *Lactobacillus rhamnosus*, foi de 36,4% no 1° dia, de 57,1% no 4° dia e de 22,5% no 7° dia; enquanto no queijo em que foi inoculado junto de *Lactococcus lactis* foi de 69,7% no 1° dia, de 34,3% no 4° dia e de 32,7% no 7° dia. Estes dados demonstram que *Lactococcus lactis* apresentou maior poder inibitório do que *Lactobacillus rhamnosus* frente a *Staphylococcus aureus* em queijo fresco no 1° e no 7° dia. Todavia, esse efeito não ocorreu no 4° dia, possivelmente, devido ao menor crescimento de *Lactococcus lactis* em relação a *Lactobacillus rhamnosus* nesse dia melhor visualizadas nos Gráficos 1 e 2. Tal inibição não ocorreu no 15° dia após a produção, quando *Staphylococcus aureus* apresentou-se em contagem 47% maior em presença de *Lactobacillus rhamnosus* e 50% maior, quando em presença de *Lactococcus lactis*. Tal efeito ocorreu possivelmente por, nesse período, já ter

decorrido tempo suficiente para que o pH na matriz alimentar tenha diminuído a ponto de prejudicar o crescimento das bactérias lácticas, sobretudo nos queijos em que houve adição de bactérias acidoláticas, potencializando o poder de acidificação.

As contagens encontradas para *Staphylococcus aureus* foram da ordem de 10^6 UFC/g no período de 15 dias após a produção dos queijos. Esse período coincide com o final do prazo de validade, pois a aparência dos queijos, após esse prazo, se tornou desagradável, com superfície pegajosa e odor repugnante. Em queijos de coalho logo após a produção, bem como no mercado varejista, avaliados por Guedes Neto (2004) e por Sena (2000), as contagens encontradas foram semelhantes antes do final do prazo de validade. Nesse último trabalho, foi encontrada a contagem de 10^6 UFC/g em 79% das amostras analisadas. Tal fato demonstra alto grau de semelhança dos resultados com a realidade.

Na Tabela 6, observa-se que não houve contagem significativa de *Lactobacillus rhamnosus* no queijo controle, em que não houve inoculação dessa amostra. Esse dado demonstra que os cuidados para se evitarem contaminações externas foram efetivos.

Tabela 6. Valores de medianas de enumeração, em UFC/g de *Lactobacillus rhamnosus* em queijos frescos, durante estocagem por 15 dias à temperatura de 4-8°C

Inóculos	Tempo			
	D1	D4	D7	D15
1 - Nenhum	<2x10 ⁷ b	<2x10 ⁷ b	<2x10 ⁷ b	<2x10 ⁷ b
2 - <i>L. rhamnosus</i>	3,1x10 ⁷ a	6,4x10 ⁷ ab	7,6x10 ⁷ ab	1,5x10 ⁸ ab
5 - <i>L. rhamnosus</i> e <i>S. aureus</i>	2,6x10 ⁷ a	6,2x10 ⁷ a	4,7 x10 ⁷ a	6,7x10 ⁷ a

*Letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Friedman (p<0,05).

Assim como ocorreu com as contagens de *Staphylococcus aureus*, as contagens de *Lactobacillus rhamnosus* não apresentaram diferença estatística com o decorrer do tempo após produção, conforme apresentado na Tabela 6. Entretanto, houve variações sutis que estão representadas no Gráficos 1. Em ambos os queijos elaborados com culturas contendo *Lactobacillus rhamnosus*, as contagens foram ascendentes, independentemente da presença de *Staphylococcus aureus*. A exceção se apresenta no 7º dia após a produção dos queijos, quando a contagem de *Lactobacillus rhamnosus* foi sutilmente menor do que no dia 4, voltando a crescer no dia 15. Presume-se que esse comportamento da amostra não esteja diretamente ligado à presença de *Staphylococcus aureus*, pois a

desaceleração no crescimento ocorreu tanto na sua presença quanto na sua ausência, sugerindo ser esse um padrão do seu comportamento, com maior probabilidade de estar associado à matriz alimentar do que à amostra de *Staphylococcus aureus* introduzida no meio.

Em nenhum dos momentos em que foi feita a enumeração de *Lactobacillus rhamnosus* houve redução no crescimento dessa amostra, sugerindo que *Staphylococcus aureus* não foi capaz de inibir a amostra acidoláctica em queijo fresco. Esse resultado está em conformidade com a literatura que apresenta altas contagens de bactérias acidoláticas em alimentos derivados do leite, sobretudo em queijos artesanais (Guedes Neto, 2004; Resende, 2010)

Tabela 7. Valores de medianas de enumeração, em UFC/g de *Lactococcus lactis* em queijos frescos, durante estocagem por 15 dias à temperatura de 4-8°C

Inóculos	Tempo			
	D1	D4	D7	D15
1 - Nenhum	<2x10 ⁶ b	<2x10 ⁶ b	<2x10 ⁶ b	<2x10 ⁶ b
3 - <i>L. lactis</i>	3,7x10 ⁸ a	8,6x10 ⁸ a	1,5x10 ⁹ a	2,5x10 ⁹ a
6 - <i>L. lactis e S. aureus</i>	2,5x10 ⁸ a	7,7x10 ⁸ a	2,2x10 ⁹ ab	2,5x10 ⁹ a

*Letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Friedman (p<0,05).

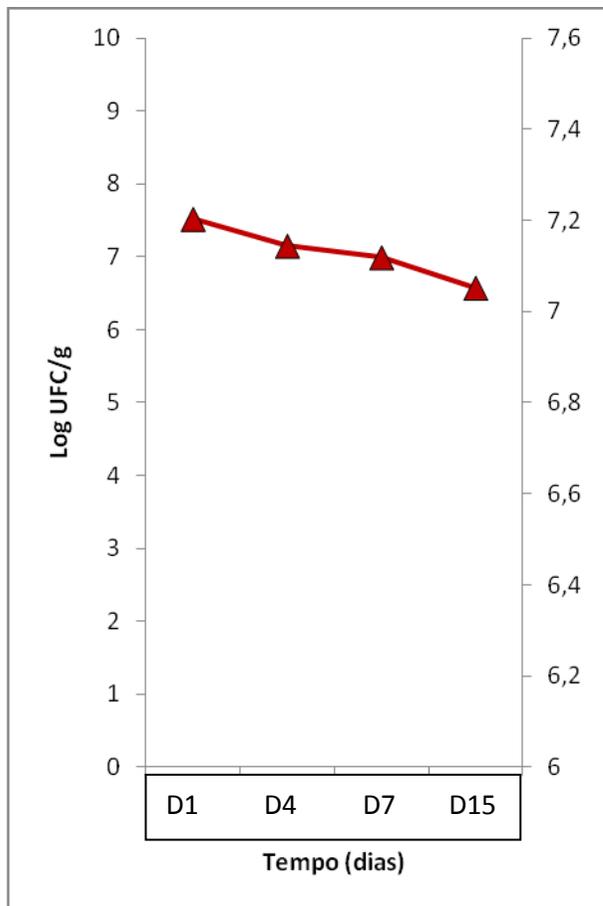
Diferentemente dos dados obtidos para crescimento de *Lactobacillus rhamnosus*, as contagens de *Lactococcus lactis* foram crescentes no decorrer do tempo no queijo 3 em que houve inoculação apenas de *Lactococcus lactis* e no queijo 4, em que houve inoculação da cultura mista com *Staphylococcus aureus*, apesar de não ter sido representativa do ponto de vista estatístico. Observou-se, entretanto, que os valores são ligeiramente menores no queijo em que a cultura inoculada foi mista. Esse

resultado ocorreu em todos os queijos com culturas mistas, e em todos os períodos de análise. Ele pode sugerir que, apesar de não ter ocorrido um antagonismo de forma claramente observada, houve uma adaptação à outra amostra introduzida na mesma cultura, sem efeitos estatisticamente aparentes.

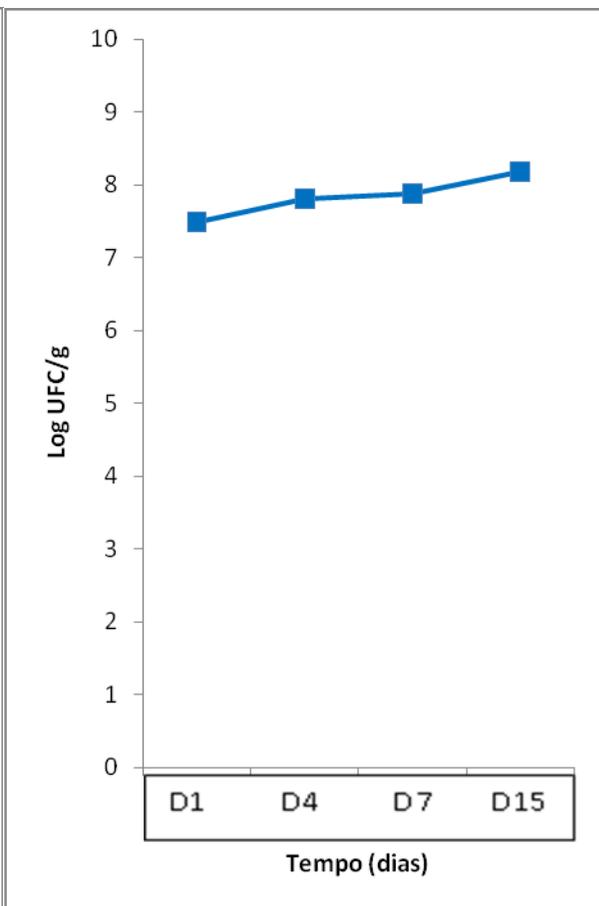
O que pôde ser observado foi o comportamento isolado de cada cepa, de forma progressiva com o tempo, de acordo com os Gráficos 1 e 2 a seguir.

Gráfico 1. Enumerações de *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus rhamnosus* em queijos frescos em relação ao tempo de estocagem por 15 dias a 4-8°C

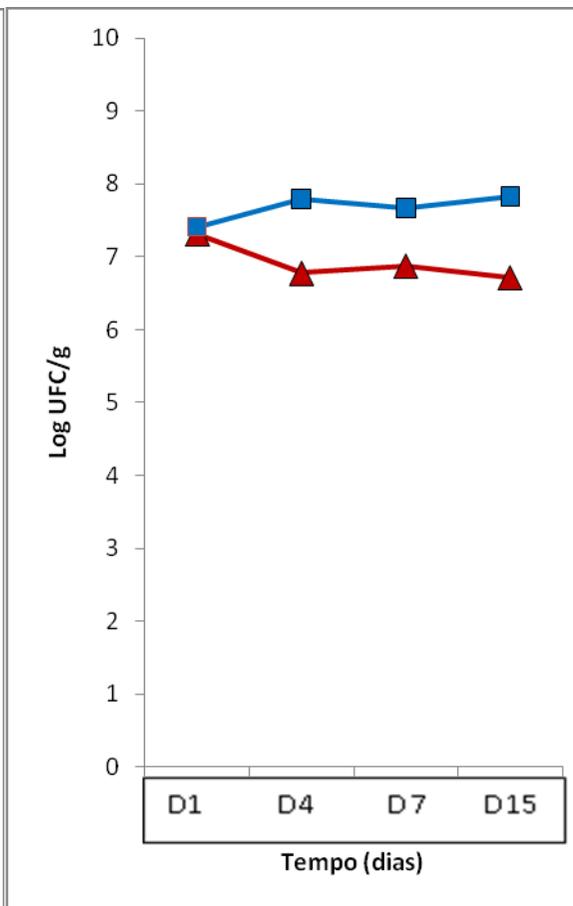
1a. Queijo 4 *Staphylococcus aureus*



1b. Queijo 2 *Lactobacillus rhamnosus*



1c. Queijo 6 *S. aureus* + *L. rhamnosus*



O Gráfico 1 permite a visualização do efeito da presença de *Lactobacillus rhamnosus* no comportamento relativo ao crescimento de *Staphylococcus aureus*. Nesse Gráfico, observa-se que, apesar de descendente, a curva de crescimento do contaminante do queijo sofre pequenas alterações em presença da amostra acidoláctica. No dia 1, o comportamento de *Staphylococcus aureus* manteve-se igual em ambos. Entretanto, no 4º dia, a queda, que ocorreu em ambos, é ligeiramente mais acentuada no queijo com cultura mista, o que sugere a presença, nesse momento, de fatores antagonistas do crescimento de *Staphylococcus aureus*, provenientes de *Lactobacillus rhamnosus*. Observa-se, porém, que a contagem inicial foi ligeiramente menor no queijo elaborado com cultura mista. Efeito ainda mais interessante é observado no 7º dia após a produção, quando houve queda na contagem de *Staphylococcus aureus* no queijo em que este foi inoculado na forma de cultura simples, mas há aumento de sua contagem no queijo em que este foi inoculado juntamente com *Lactobacillus rhamnosus*. Essas variações ligeiras nos valores obtidos para contagem podem sugerir que *Lactobacillus rhamnosus* não inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, e também estimulou seu crescimento. Esse dado deve ser analisado com grande cautela, pois há uma tendência de a contagem de *Staphylococcus aureus* se estabilizar na ordem de 10^7 UFC/g no 7º dia, sendo esse aumento em sua contagem

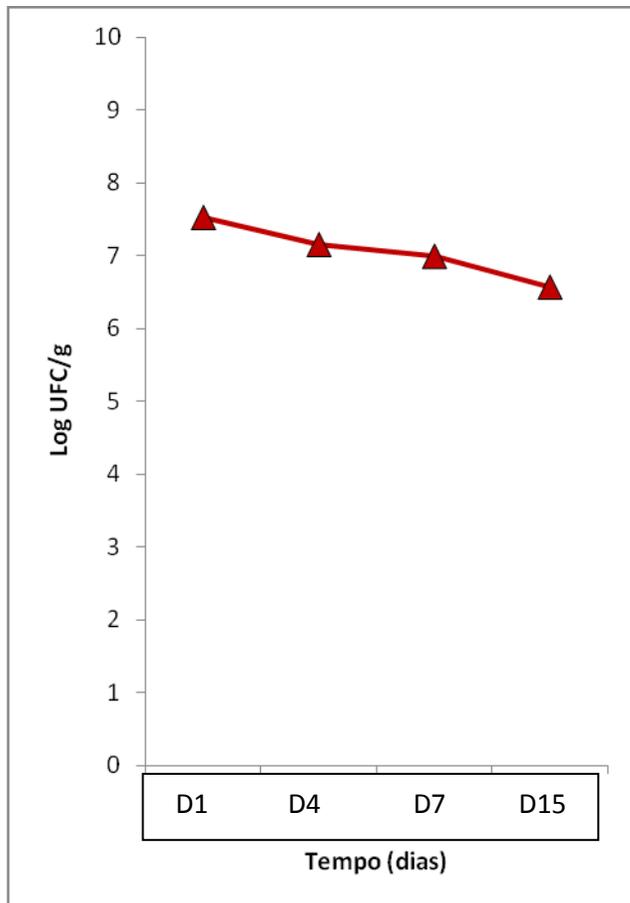
apenas o curso natural de seu crescimento e não um efeito de sua relação com a amostra acidoláctica. Deve-se salientar aqui o fato de essa ser uma análise de dados de observação empírica e não representativos estatisticamente. Essas são suposições que explicam a relação entre essas amostras, porém, sem o respaldo da significância estatística, deve-se considerar que *Lactobacillus rhamnosus* não foi capaz de antagonizar *Staphylococcus aureus*.

Esse efeito se fortalece ao serem observados os valores obtidos no 15º dia, quando a contagem de *Staphylococcus aureus* diminuiu em relação ao dia 7. Entretanto, no queijo produzido com cultura mista, ela se mantém ligeiramente mais elevada do que no queijo elaborado apenas com o contaminante.

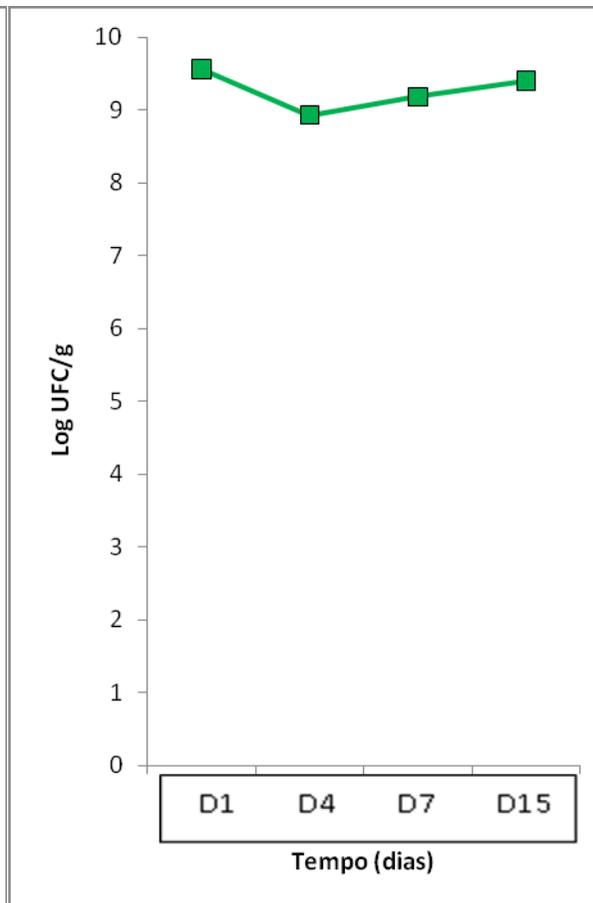
É interessante observar o comportamento de *Lactobacillus rhamnosus*, que, apesar de ter sido inoculado em contagem bastante semelhante nos dois queijos, apresentou-se em menor número no queijo em que foi inoculado em conjunto com *Staphylococcus aureus*. Esse, assim como discutido na Tabela 7, pode ser apenas um efeito de adaptação entre amostras num mesmo ambiente, não representando um antagonismo efetivo pelo contaminante frente à bactéria acidoláctica, mas deixa ainda mais evidente a ausência de efeito antagonizante efetivo da bactéria acidoláctica frente a *Staphylococcus aureus*.

Gráfico 2. Enumerações de *Staphylococcus aureus* e *Lactococcus lactis* em queijos frescos em relação ao tempo de estocagem por 15 dias a 4-8°C

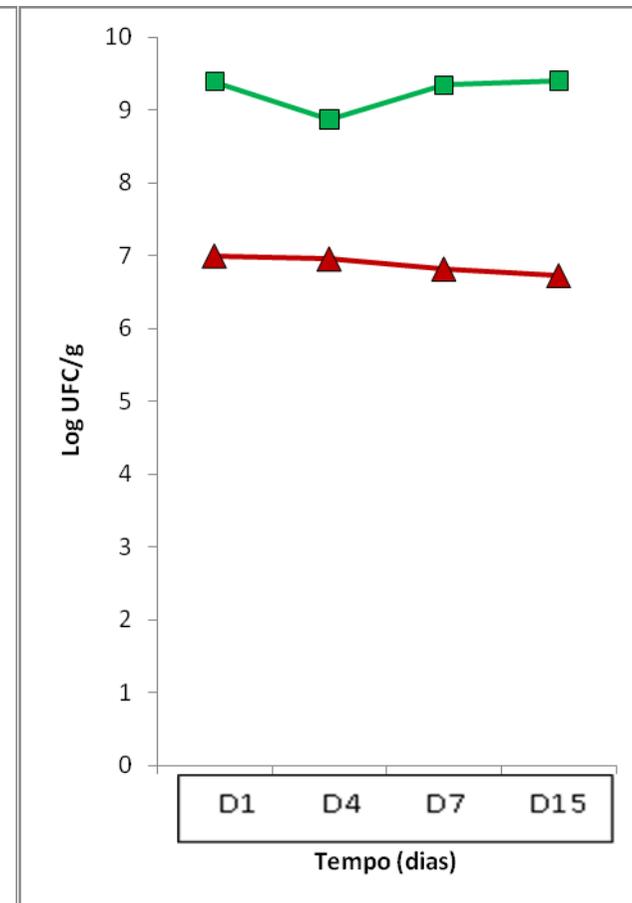
2a. Queijo 4 *Staphylococcus aureus*



2b. Queijo 3 *Lactococcus lactis*



2c. Queijo 6 *S. aureus* + *L. lactis*



No Gráfico 2 observam-se valores para contagens de *Lactococcus lactis* mais elevados que para *Lactobacillus rhamnosus* demonstrados no Gráficos 1, salientando que os inóculos foram elaborados com contagens distintas para cada amostra, sendo superior para *Lactococcus lactis*, pois este é encontrado em maior número em queijos artesanais.

Outro dado que pode ser extraído do Gráfico é que *Lactococcus lactis* apresentou perfil estável no decorrer do tempo, apresentando apenas uma queda em sua contagem no dia 4, voltando em seguida a se estabilizar na ordem de 10^8 UFC/g. Observa-se ainda que esse padrão de comportamento se repetiu no queijo em que foi inoculado na forma de cultura simples, bem como no queijo em que foi inoculado juntamente com *Staphylococcus aureus*. Esse dado mostra com bastante clareza a estabilidade e a resistência dessa amostra frente ao contaminante, sugerindo maior potencial para uso como inibidor do crescimento de *Staphylococcus aureus* quando comparado a *Lactobacillus rhamnosus*.

Ao se observar o comportamento de *Staphylococcus aureus* nos dois queijos, observa-se o mesmo padrão decrescente de suas contagens, com uma ressalva para a inclinação da reta, que se apresenta mais suave no Gráfico 2 que representa o queijo onde essa cultura foi inoculada junto de *Lactococcus lactis*. Essa observação

permite inferir que houve algum antagonismo, sobretudo nos primeiros dias após a produção do queijo. Entre os dias 7 e 15, o efeito antagonista apresentou menor intensidade, possivelmente, devido ao fato de, nesse período, já ter decorrido tempo suficiente para reduzir o pH a níveis próximos de 4,2 a 4,4; que causem injúria a *Lactococcus lactis*. Apesar de o pH mínimo suportado por *Lactococcus lactis* ser próximo do tolerado por *Staphylococcus*, de aproximadamente 4,0; pode-se sugerir que o antagonismo aqui observado foi realmente mais intenso nos primeiros dias, quando não houve produção excessiva de ácido láctico a ponto de prejudicar a amostra acidoláctica, mais sensível a baixo pH.

Apesar de todas as observações extraídas dos Gráficos 1 e 2, elaborado com valores médios de contagens, as diferenças observadas não apresentaram diferença ao nível de significância de 5% no teste de Friedman. Dessa forma, não se pode afirmar ter havido antagonismo entre *Lactococcus lactis* e *Staphylococcus aureus*. Entretanto, sugere-se pesquisa mais aprofundada da relação entre essas duas cepas para melhor compreensão das razões pelas quais observou-se tendência de antagonismo em determinados momentos.

Os dados aqui encontrados corroboram os diversos relatos de altas contagens de *Staphylococcus aureus* em queijos artesanais, ou mesmo industrializados, em

que variam de 10^3 a 10^8 UFC/g (Cerqueira *et al.*, 1994; Sena, 2000; Guedes Neto, 2004). A viabilidade das amostras ácidoláticas também se encontra em concordância com a literatura, que mostra contagens de 10^6 a 10^7 UFC/g de queijos industrializados ou artesanais, mesmo após períodos mais longos de estocagem como 2 a 4 meses (AbdAlla *et al.*; 2008 Zehntner, 2008).

Dados discrepantes aos aqui encontrados foram relatados na literatura, que afirma que amostras ácidoláticas foram capazes de reduzir a formação de toxinas por fungos, bem como a contagem de fungos, coliformes e *Staphylococcus* (Ross *et al.*, 2000; AbdAlla *et al.*, 2008; Dabiza *et al.*, 2007; Dabiza *et al.*, 2008). Essa grande variação do efeito ocorrido pode ter como causa a diferença de origem das amostras utilizadas, assim com a forma de produção do queijo utilizado no experimento, que foi de origem industrial ou artesanal nos estudo citados, diferentemente da produção em laboratório com seleção das cepas inoculadas neste presente estudo.

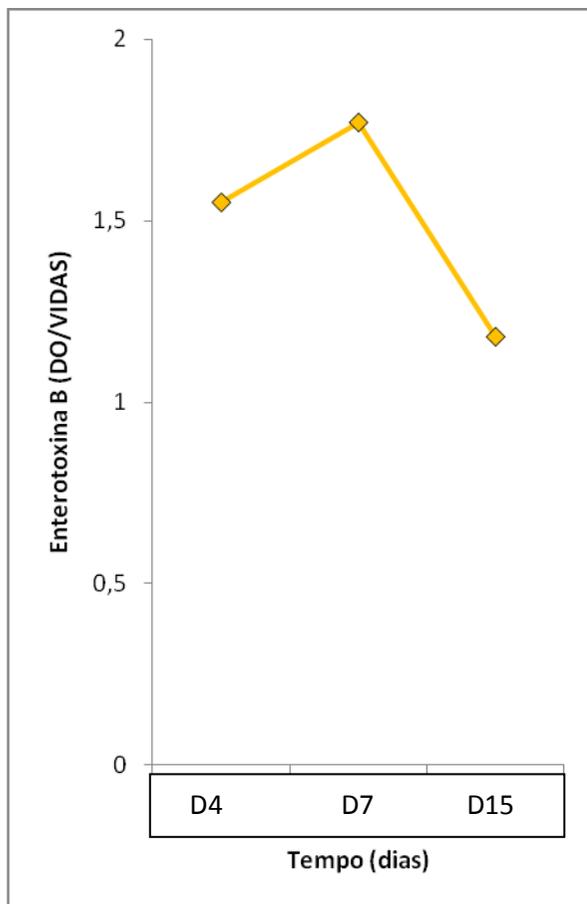
Deve-se atentar aqui para o fato de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* terem apresentado grande poder de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* nos testes “in vitro” realizados por Guedes Neto (2004). Considerando que os resultados obtidos nesse estudo afirmam que não houve inibição, esse fato chama atenção para a enorme diferença entre os efeitos observados “in vitro” e no alimento. Deve-se atentar então para a importância de pesquisas no ambiente em que os microrganismos ocorrem naturalmente antes da utilização generalizada do termo “antagonismo” e “probiótico”.

6.2.2. Detecção de SEB nos queijos

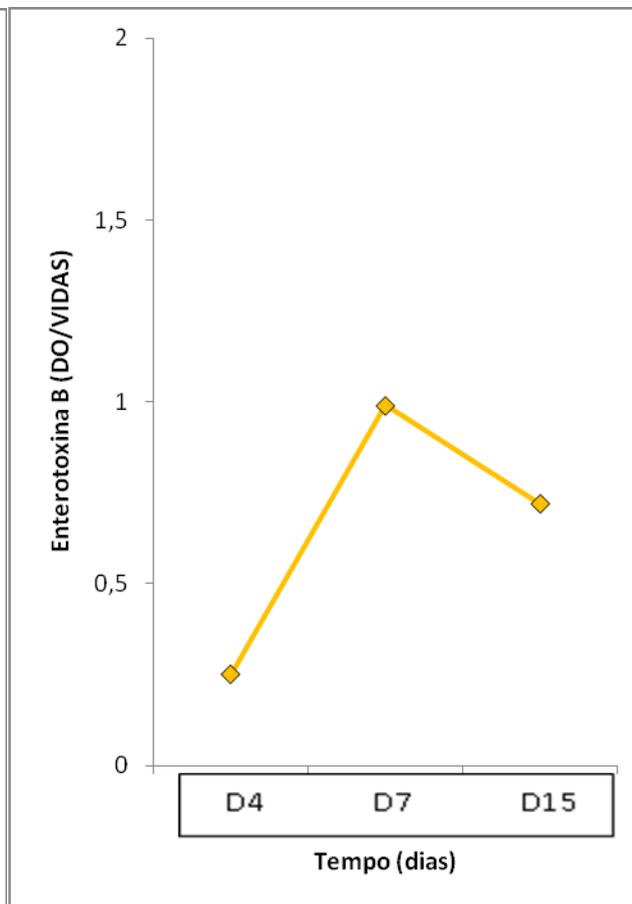
Após a análise de enterotoxinas pelo teste VIDAS, os resultados foram expressos em valor de fluorescência relativa ou densidade óptica, que se dá por cálculo de relação entre absorbância da amostra e absorbância do controle. O limite do teste é 0,13; sendo acima deste valor, considerado positivo, e abaixo dele, negativo. Os resultados foram apresentados no Gráfico 3.

Gráfico 3. Níveis médios de enterotoxina SEB em densidade óptica em queijos frescos ao longo do tempo de estocagem de 15 dias a 4-8°C

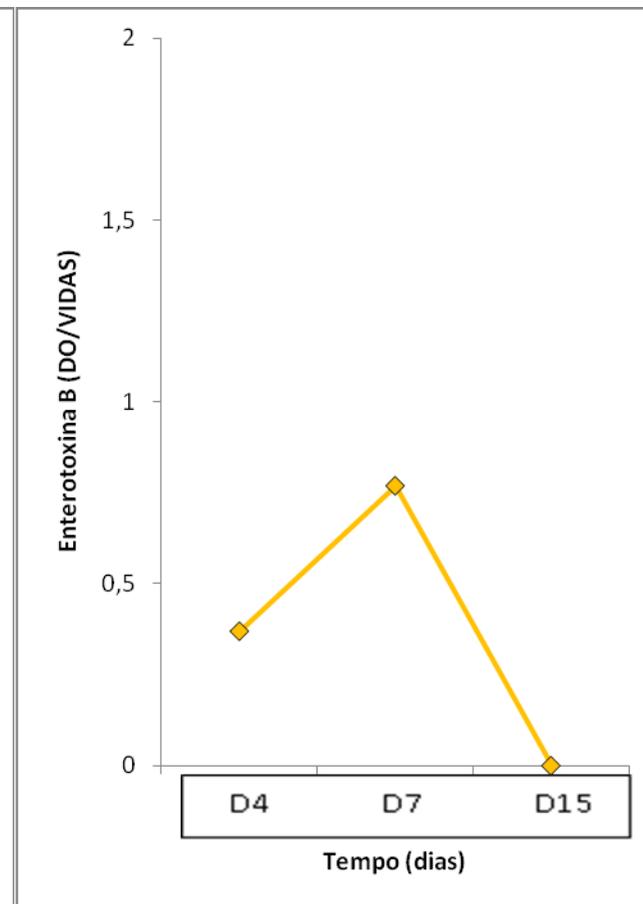
3a. Queijo 4 *Staphylococcus aureus*



3b. Queijo 5 *S. aureus* + *L. rhamnosus*



3c. Queijo 6 *S. aureus* + *L. lactis*



No Gráfico 3, estão representados os valores de densidade óptica referente à presença de enterotoxinas do tipo B (SEB) obtidos a partir das análises do queijo 4, no qual somente *Staphylococcus aureus* foi inoculado. Esse Gráfico reflete, então, o perfil padrão de produção da toxina SEB sem interferência de outra amostra bacteriana. A partir desse perfil, observa-se que houve maior concentração de SEB no dia 7 do que nos dias 4 e 15. O aumento da concentração de SEB entre os dias 4 e 7, apesar de coincidir com um período em que há redução no número de células viáveis de *Staphylococcus aureus* no queijo, pode ser explicado pelo acúmulo de enterotoxina produzida na massa do queijo ou ainda pela maior eficiência das células na fase estacionária da curva logarítmica do crescimento para produção de enterotoxinas. Isso ocorre entre 5 e 6 horas no cultivo a 37°C, mas pode ter demorado mais para se estabelecer no queijo devido à armazenagem sob refrigeração. Todavia, a queda seguinte na concentração de toxina, representada pela menor densidade óptica (DO) no dia 15 é o fato mais curioso, sendo possível que tenha havido presença de fatores capazes de degradar a estrutura da enterotoxina B já formada no queijo. Apesar de as enterotoxinas estafilocócicas serem resistentes à ação da maior parte das enzimas, inclusive à quimosina utilizada na produção do queijo, ao pH do leite, há a possibilidade de sensibilidade a certas enzimas em determinado pH, como é o caso da tripsina a pH 2,0. A produção de enzima

por bactérias lácticas se exclui nesse caso, pois se analisa o perfil ocorrido no queijo 4 somente, no qual não houve inoculação de bactérias acidoláticas. Deve-se lembrar, porém, que o leite utilizado passou pelo processo de pasteurização, não sendo estéril e tendo estado sujeito à ação de psicotróficos em momentos anteriores à pasteurização, que podem ter deixado enzimas proteolíticas no leite, persistentes no queijo. Há ainda a possibilidade de desestabilização da estrutura de SEB ter ocorrido por presença de sais como CaCl ou de inativação por contato com a estrutura anfífilica da miscela de caseína da massa do queijo, o que impediria que essa SEB se ligasse ao anticorpo presente no Kit teste e fosse detectada. Outra suposição para o dado observado é a interação com a gordura presente no leite, pois, apesar de o leite utilizado ser desnatado e conter baixo teor de gordura, esse teor é concentrado no processo de produção de queijos.

Embora seguindo o mesmo padrão do queijo 4, os valores de absorvância foram menores no queijo 6, onde houve adição de *Lactococcus lactis* junto de *Staphylococcus aureus*, seguido pelo queijo 5, onde houve adição de *Lactobacillus rhamnosus* junto a *Staphylococcus aureus*. Ambos os queijos apresentaram menor concentração de enterotoxina B, quando comparados com o queijo 4, onde foi adicionado somente *Staphylococcus aureus* na mesma contagem. No dia 4, observou-se maior inibição à produção de enterotoxinas no

queijo com presença de *Lactobacillus rhamnosus* quando comparado ao queijo produzido com *Lactococcus lactis*. Porém, a diferença entre os dois foi bastante sutil, sendo mais expressiva no dia 7, quando a relação é oposta; a redução no acúmulo de SEB é maior no queijo 6, em que havia presença de *Lactococcus lactis*, sugerindo maior inibição nessa fase por essa amostra de bactéria acidoláctica.

No dia 7, a redução na produção de SEB pode ter ocorrido devido à redução da contagem de *Lactococcus lactis*, além dos outros fatores relativos à matriz alimentar, já discutidos.

Provavelmente, devido ao efeito cumulativo na concentração de toxinas, o efeito da inibição da produção de SEB por *Lactococcus lactis* é ainda melhor visualizado no dia 15, quando, somado ao efeito de inativação da toxina pela estrutura alimentar, atinge densidade óptica igual a zero.

Aqui, excluindo-se o fator limitante da inativação pela matriz do alimento, pode-se inferir que *Lactococcus lactis* tem grande capacidade de inibir a produção de toxina por *Staphylococcus aureus*. Pode-se dizer também que *Lactobacillus rhamnosus* apresentou essa mesma capacidade, porém em intensidade reduzida.

Salienta-se aqui que, no dia 7, a inibição da produção de SEB no queijo 6 foi inferior à

inibição observada no queijo 5. Esse dado pode estar relacionado com o fato de, nesse dia, a contagem de *Lactococcus lactis* ter se elevado, quando a de *Lactobacillus rhamnosus* aumentou. Soma-se a esse o fato de, em ambos os casos, ter ocorrido redução na contagem de *Staphylococcus aureus*. Deve-se atentar, porém, para a redução que foi ínfima, quando comparada ao aumento da bactéria acidoláctica. Neste momento, cabe a discussão dos fatores que levam à produção de enterotoxinas. A produção pode ser bastante afetada pela presença de *Lactococcus lactis* bem como ser afetada por uma redução mínima de *Staphylococcus aureus*.

A presença de bactérias acidoláticas, nos queijos artesanais, bem como o efeito de inativação de enterotoxinas provocado pela matriz alimentar do queijo aqui observados, são fortes argumentos para justificar o baixo índice de intoxicações alimentares por esse alimento no Brasil. Não se descarta aqui o sabido fato de haver subnotificação de casos às unidades públicas de saúde do País, todavia esse perfil de inativação de toxinas no queijo por si só estimula a investigação da compreensão dos fatores observados nesse alimento, em busca de formas mais efetivas de controle dessa intoxicação alimentar. A presença de *Lactococcus lactis* se mostrou uma luz nessa busca, sendo uma possível arma a ser trabalhada e melhor utilizada nos próximos passos.

7. Conclusões

Os dados apresentados mostram que a presença simultânea de outro microrganismo no queijo não alterou o comportamento original de crescimento de *Staphylococcus aureus*, de *Lactobacillus rhamnosus* e de *Lactococcus lactis*. Conclui-se então que não houve antagonismo entre as cepas testadas.

Conclui-se também que as amostras de bactérias acidoláticas não apresentaram efeito de redução ($p < 0,05$) na redução da produção de enterotoxinas. Porém, ambas apresentaram potencial para a inibição, através de discreta redução nos valores de densidade ótica nos queijos, sendo *Lactococcus lactis* a amostra que apresentou maior efeito, quando comparada com *Lactobacillus rhamnosus*.

8. Referências bibliográficas

- ABDALLA, E. A. M.; SOHER, E. A.; SALEH, Y.; MARY, S.; AMAL, S. H.; Probiotic bacteria as a tool to produce high quality and safe Ras cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, Cairo, v. 36, n. 1, p.97-109, 2008.
- BAIRD-PARKER, A. C. 1974 Genus *Staphylococcus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. v. 1. 8 Ed. Ed Buchanan. P. 483-489. Williams & Wilkins, Baltimore.
- BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. *Journal of Applied Bacteriology*. n. 19, v. 69, p. 1s-8s, 1990.
- BIOMÉRIEUX S.A. Manual de utilização do Kit VIDAS® Staph enterotoxin II (SET2). Ref 30 705, 2008.
- BLACK, F. T., ANDERSEN, P. L., ORSKOV, J., ORSKOV, F., GAASLEV, K., LAULUND, S. Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveller's diarrhea. In: STEFFEN, R. Travel Medicine. Conference on International Travel Medicine I. 1989: 333-335.
- BRASHEARS, M. M.; GILLILAND, S. E.; Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 2103, 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Anexo I: Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água*. Brasília: Diário Oficial da União, seção 1, p. 14, 18/09/2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 146, de 07 de março de 1996. Anexo I: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos*. Brasília: Diário Oficial da União, seção 1 p. 3977, 11/03/1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Brasília, DF: Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, 1997. 217 p.
- BROADBEN, J. R. *Genetics of Lactic acid bacteria*. In: MARTH, E. H. e STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology*. Headquarters, 2001, 744p.

- BYLUND, G., *Dairy processing handbook*. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB, 1995. 436 p.
- CARMO, L. S. *Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC₂, SED e toxina TSST – 1 para uso em ensaios imuno-enzimáticos*. 2001. 254f. Tese (doutorado em microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CASSON, L. *O antigo Egito*. Rio de Janeiro: Livraria José Olímpio Editora, 1969. 204 p.
- CASTILHO, A. C. Probióticos – Histórico e conceitos. Disponível em: <http://www.nutricaoclinica.com.br/content/section/1/16/> Acesso em 15 de agosto de 2008.
- CERQUEIRA, M. M. O. P., SOUZA, M. R., FONSECA, L. M. Surto epidêmico de infecção alimentar envolvendo queijo fresco em Pará de Minas. *Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia*. v. 46, n. 6, p.723-728, 1994.
- CICHOSKI, A. J.; CUNICO, C.; LUCCIO, M.; ZITKOSKI, J. L.; CARVALHO, R. T.; Effect of the addition of probiotic on the characteristics of reduced-fat “Prato” cheese manufactured with fibers and potassium lactate. *Ciência e Tecnologia de Alimento*, v. 28, n. 1, p. 214-219, 2008.
- CORREA, N. B. O.; PERET FILHO, L. A.; PENNA, F. J.; LIMA, F. M. L. S.; NICOLI, J. R.; A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* e *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *Journal of Clinical Gastroenterology*. v. 39, n. 5, p. 385-389, 2005.
- CUNHA, E. F., SERIDAN, B., COSTA, H. H. S., DROMMOND, R. M. N., NICOLI, J. R., SOUZA, M. R. Atividade antagonista de bactérias lácticas isoladas de leites fermentados comerciais, frente a microrganismos indicadores. *Anais XVII Semana de Iniciação Científica da UFMG*. 2008.
- DABIZA, N. M. A.; FATHI, F. A.; Characteristics and chemical composition of Ras cheese. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, Stutgard, v. 102, n. 12, p. 561-566, 2006.
- DABIZA, N. M. A.; EL-DEIB, K.; Biochemical evaluation and microbial quality of Ras cheese supplemented with probiotic strains. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, v. 57, n. 3, p. 295-300, 2007.

- DABIZA, N. M. A.; Production of soft cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *Egyptian Journal of Dairy Science*, v. 36, n. 1, p. 63-71, 2008.
- ENEROTH, A.SVENSSON, B., MOLIN, G., CHRISTIANSSON, A. Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the feeling mashine. *Journal of Dairy Research*, v. 68, p. 189/196, 2001.
- FAO/WHO Food and Agricultural Organization/World Health Organization. *Codex Alimentarius*, 2006. Disponível em: [HTTP://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en). Acesso em: 15 de agosto de 2008.
- FAO/WHO Food and Agricultural Organization / World Health Organization. *Gidelines for the evaluation of probiotic in food*. 2002.
- FAPRI Food and Agricultural Policy Research Institute. *World Dairy Products*, 2008.
- FRANZ, C. M., HOLZAPFEL, W. H., STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*. n. 47, p. 1-24, 1999.
- FULLER, R. D. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 6, p. 365-378, 1989.
- FULLER, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, v. 130, n. 2, p. 396-402, 2000.
- FURTADO, M. F., *A arte e a ciência do queijo*. São Paulo: Globo, 1991. 297 p.
- GARRITY, GEORGE, M. *Bergey's Manua of Systematic Bacteriology*. 2 ed. New York, 2005. v. 2, 2816 p.
- GIBSON, G. R., Probiotics and intestinal infections. In: FULLER, R. *Probiotics 2*. 1.ed.Nova York, 1997. P. 10-31.
- GILLILAND, S. E. Probiotic and Prebiotic. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology 2*. Ed. Nova York, 2001. P. 327-344.
- GILLILAND, S. E.; KIM, H, S., Effects of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. *Journal of Dairy Science*, v. 67, p. 1, 1984.

- GILLILAND, S. E.; NELSON, C. R.; MAXWELL, C.; Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, p. 377, 1985.
- GOPAL, A.; SHAH, N. P.; ROGINSKI, H.; Bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Milchwissenschaft*, v. 51, p. 619, 1996.
- GUEDES NETO, L. G. *Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de Staphylococcus spp. e de bactérias acidoláticas e de sua atividade antagonista "in vitro"*. 2004. 93p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- HARATA, G., HE, F. HIRUTA, N., KAWASI, M., KUBOTA, A., HIRAMATSU, M., YAUSI, H. Intranasal administration on *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune response. *Letters in Applied Microbiology*. v. 50, n.6, p.597, 2010.
- HARGROVE, R. E.; ALFORD, J. A.; Growth response of weanling rats to heated, aged fractioned and chemically treated yogurts. *Journal of Dairy Science*, v. 63, p. 1065, 1980.
- IDF INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION Dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB) – Standard of Identity 149A, 1997.
- IDF INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION Yogurt: enumeration of characteristic micro-organisms count technique at 37°C. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n. 117, p. 1-4, 1983.
- JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. Nova York, 9 2d. 1996, 661p.
- JÄRVENPÄÄ, S., TAHVONEN, R. L., OUWEHAND, A. C., SANDELL, M., JÄRVENPÄÄ, E., SALMINENT, S. A probiotic , *Lactobacillus fermentum* ME-3 , has antioxidative capacity in soft cheese Spreads with different fats. *Journal of Dairy Science*. v. 90, p. 3171-3177, 2007.
- KLOSS, W. E. Systematics and the natural history of *Staphylococci*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 70, n. 3, p. 25-37, 1990.

- KOSIKOWSKI, F. *Fermented Milk Foods*. Ithaca, Nova York: Edwards Brothers, Inc. , 1977. 711 p.
- LANCETTE, G. A., TATINI, S. R., *Staphylococcus aureus*. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods*. 3Ed. Washington> APHA, 1992, p. 533-547.
- LEITE, J. L. B., SIQUEIRA, K. B., CARVALHO, G. R., SÁ FORTES, L. R. L., *O comércio internacional de lácteos*. Juiz de Fora: Templo, 2008. 281p.
- LESSARD, M.; BRISSON, G. J.; Effects of *Lactobacillus* fermentation product on growth immune response and fecal enzyme activity in weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 67, p. 509, 1987.
- Mac FADDIN, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimere: Willians e Wilkins, 2Ed., 527p., 1980.
- MANN, G. V.; SPOERRY, A.; Study of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 27, p. 467, 1974. *apud* GILLILAND, S. E. Probiotic and Prebiotic. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology* 2. Ed. Nova York, 2001. P. 327-344.
- MARINHO, F. PACÍFICO, L. G., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., LE LOIR, Y., GUIMARÃES, V. D., LANGELLA, P., CASSALI, G. D., FONSECA, C. T., OLIVEIRA, S. C. An intranasal administration of *Lactococcus lactis* strain expressing recombinant interleukin-10 modulates acute allergic airway inflammation in murine model. *Clinical and experimental allergy*. v. 1, p. 5, 2010.
- MATIJSIC, B. B.; RAJSP, M. K.; PERKO, B.; ROGELJ, I.; Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 157-166, jan. 2007.
- MERCADE, M., COCAIGN-BOUSQUET, M., LINDLEY, N. D., LOUBIÈRE, P. Regulation of glycolysis of *Lactococcus lactis* ssp. cremoris MG1363 at acidic culture conditions. *Food Biotechnology*, v. 1, p. 269, 2000.
- MHLW Ministry of Health, Labour and Welfare. 1993. Disponível em: <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html> Acesso em 20 de agosto de 2008.

MOELLERING Jr, R. C. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clinic of Infectious Disease*. n. 14, p. 1173-1176, 1992.

MOGENSEN, G., SALMINEN, S., O'BRIEN, J., OUEHAND, A., HOLZAPFEL, W., SHORTT, C., FONDÉN, R., MILLER, G. D., DONOHUE, D., PLAYNE, M., CRITTENDEN, R., BIANCHI, B., ZINK, R. Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n. 377, p. 10-19, 2002.

NADER FILHO, A., FERREIRA, L. M., AMARAL, L. A., ROSSI JUNIOR, O. D., OLIVEIRA, R. P. Produção de enterotoxinas da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. n. 5, v. 59, p. 1316-1318, 2007.

NAYRA, S. M.; SHARAF, O. M.; IBRAHIM, G. A.; TAWFIK, N. F.; Incorporation and viability of some probiotic bacteria in functional dairy food. I. Soft cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, v. 30, n. 2, p. 217-229, 2002.

NEAL, C. E., CALBERT, H. E., The use of 2, 3, 5 – triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. *Journal of Food Protection*, v. 38, n. 6, p. 629 – 633, 1955.

NOH, D. O.; GILLILAND, S. E.; Influence of bile on cellular integrity and β -galactosidase of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 1253, 1993.

ODA, M. ; HASEGAWA, H.; KOMATSU, S. KAMBE, M.; TSUCHIYA, F.; Antitumor polysaccharide from *Lactobacillus* species. *Agricultural Biology Chemistry*, v. 47, p. 1623, 1983.

OSTYN, A. BUYSER, M. L., GUILLIER, F., GROULT, J., FÉLIX, B., SALAH, S., DELMAS, G., HENNEKINNE, J. A. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxine type E, France, 2009. *Euro Surveill*. n. 15, v. 13, p. 19528, 2010

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; DEMACIAS, M. E. N.; ROUX, M. E.; HOLGADO, A. P. R.; The oral administration of lactic-acid bacteria increases the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. *Journal of Food Protection*, v. 53, p. 409, 1990.

- RAJPAL, S., KANSAL, V. K. Probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* attenuates diet induced hypercholesterolemia in rats. *Milchwissenschaft*. n. 64, v. 1, p. 21-25, 2009.
- REDDY, B. S., RIVENSON, A. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazol[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Research*. n. 53, p. 3914-3918, 1993.
- REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*. n. 9, v. 65, p. 3763-3766, 1999.
- RESENDE, M. F. S. *Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência d altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas* 2010. 69p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ROBBINS, R., GOULD, S., BERGDOLL, M. S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Applied Microbiology*, v. 28, n. 6, p. 946-950, 1974.
- ROMOND, M. B., HADDOU, Z. MIELCARECK, C., RAMOND, C. *Bifidobacteria* on *E. coli* intestinal colonization. *Anaerobe*. v. 3, p. 131, 1997.
- ROSS, R. P.; STANTON, C.; HILL, C.; FITZGERALD, G. F.; COFFEY, A.; Novels cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science and Technology*, v. 11, n. 3, p. 96-104, 2000.
- SATO, K.; SAITO, H.; TOMIOKA, H.; YOKOKURA, T.; Enhancement of host resistance against *Listeria* infections by *Lactobacillus casei* , *Microbiological Immunology*, v. 32, p. 1189, 1988.
- SENA, M. J. *Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp. Isolados de queijo coalho comercializados em Recife – PE*. 2000. 75 p. Discertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- SILVA, M.; JACOBUS, N. V.; DEENKE, C.; GORBACH, S. L.; Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 31, p. 1231, 1987. *apud* GILLILAND, S. E. Probiotic and Prebiotic. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology 2*. Ed. Nova York, 2001. P. 327-344.
- SOUZA, C. H. B.; BURITI, F. C. A.; BEHRENS, J. H.; SAAD, S. M. I.; Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *International Journal of Food Science and Technology*, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 871-877, 2008.
- STANDIFORD, T. J., AREMBERG, D. A., DANFORTH, J. M., KUNKEL, S. L., VANOTTENREN, G. M., STRIETER, R. M. Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. *Infection and Immunity* n. 1, v. 62, p. 119-125, 1994.
- TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W.; Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriological Review*, v. 40, p. 722, 1976. *apud* GILLILAND, S. E. Probiotic and Prebiotic. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology 2*. Ed. Nova York, 2001. P. 327-344.
- TUMA, S.; VOGELSEN, F. K.; PLOCKOVA, M.; CHUMCHALOVA, J.; Isolation of antifungally activity lactobacilli from Edam cheese. *Acta Alimentaria Budapest*. v. 36, n. 4, p. 405-414, 2008.
- VANKERCKHOVEN, V., HUYS, G., VANCANNEYT, M., SNAUWAERT, C., SWINGS, J., KLARE, I., WITTE, W., AUTGAERDEN, T. V., CHAPELLE, S., LAMMENS, C., GOOSSENS, H. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. n. 14, v. 74, p. 4247-4255, 2008.
- VINDEROLA, C. G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J. A.; Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei*) and no probiotic microflora in argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 9, p. 1905-1911. 2000.

ZHANG, X. B., OHTA, Y. Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria on mutagens. *Journal of Dairy Science*. n. 74, p. 1477-1481, 1991.

ZHANG, Q., ZHONG, J., LIANG, X., LIU, W., HUANG, L. Improvement of human interferon alpha secretion by *Lactococcus lactis*. *Biotechnology Letters*. V. 1, p. 1573, 2010.

ZEHNTNER, U.; Behaviour of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in hard semi-hard cheese. *Agrarforschung*, v. 129, n. 2, p. 24-24, 2008.