



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AGROINDUSTRIAL

Dissertação

**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS FRENTE A  
PATÓGENOS E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE  
AMOSTRAS DE LEITE *IN NATURA* E QUEIJOS COLONIAIS DA REGIÃO  
FRONTEIRA NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

**Graciele Daiana Funck**

Pelotas, 2012.

**GRACIELE DAIANA FUNCK**

**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS FRENTE A  
PATÓGENOS E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE  
AMOSTRAS DE LEITE *IN NATURA* E QUEIJOS COLONIAIS DA REGIÃO  
FRONTEIRA NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Maria Fiorentini

Pelotas, 2012.

**Dados de catalogação na fonte:**  
( Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744 )

F981a Funck, Graciele Daiana

Atividade antagonista de bactérias ácido lácticas frente a patógenos e caracterização microbiológica e físico-química de amostras de leite in natura e queijos coloniais da região fronteira noroeste do estado do Rio Grande do Sul / Graciele Daiana Funck ; orientador Wladimir Padilha da Silva; co-orientador Ângela Maria Fiorentini. - Pelotas,2012.-80f. : il..- Dissertação(Mestrado).Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Leite. 2.Queijo 3.Bactérias ácido lácticas 4.Antogonismo láctico 5.Caracterização microbiológica 6. Caracterização físico-químico I.Silva, Wladimir Padilha da(orientador) II .Título.

CDD 637.133

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva – UFPel (Orientador)**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Maria Fiorentini – UFPel (Presidente/Co-orientadora)**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maristela Cortez Sawitzki – UNIPAMPA**

**Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra – UFPel**

*Dedico,*

*Aos meus pais João Gilberto e Terezinha e  
aos meus irmãos Cíntia e João Guilherme,  
com amor e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por sempre abrir novas portas e proteger a minha vida.

Aos meus pais e meus irmãos pelo incentivo, compreensão e paciência, que souberam dispensar nesta caminhada. Sem eles nada seria possível. Em especial, a minha mãe, exemplo de vida.

Ao meu orientador Wladimir Padilha da Silva, pela orientação e oportunidade.

A minha co-orientadora, Ângela Maria Fiorentini, em especial, pela orientação, oportunidade, amizade e diversas acolhidas.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pela oportunidade de realizar o curso.

A todos os professores do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial que contribuíram na minha formação.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e correção deste trabalho.

À Universidade Regional do Noroeste do estado do RS (UNIJUÍ), pela confiança e cedência dos laboratórios para a realização das análises.

A Secretaria de Ciência, Inovação e Desenvolvimento Tecnológico do RS pelo financiamento que permitiu a realização deste projeto de mestrado.

Em especial, as amigas e irmãs de coração, Gislaine e Leidi, pelo ombro amigo em todas as situações, pelo incentivo, força e por toda a experiência e ensinamentos compartilhados.

A minha bolsista de Iniciação Científica, Jéssica e as estagiárias do Núcleo de Alimentos/UNIJUÍ – Campus Santa Rosa pela ajuda na execução das análises.

Aos colegas da Central Analítica, Alessandro, Lediane, Ivanice e Maysa, que “seguraram as pontas” quando precisei me ausentar do trabalho, pela amizade e momentos de descontração.

Aos amigos Paula, Éder, Joyce e Scharlise pelas diversas estadias em Pelotas.

Ao meu cunhado pelas diversas caronas.

A todos que de alguma forma colaboraram para a conclusão desta etapa de minha jornada.

*“Ter problemas na vida é inevitável, ser derrotado por eles é uma questão de opção.”*

## RESUMO

**FUNCK, Graciele Daiana.** Isolamento de bactérias ácido lácticas com atividade antagonista frente a patógenos e caracterização microbiológica e físico-química de amostras de leite *in natura* e queijos coloniais da região Fronteira Noroeste do estado do RS. 2012. 80f. **Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.**

O leite é um alimento básico, rico em nutrientes. O queijo, produto derivado do leite, é também um concentrado proteico-gorduroso de alto valor nutritivo. As bactérias ácido lácticas, naturalmente presentes no leite, são de fundamental importância para produção de queijos, pois são responsáveis pelo processo fermentativo que confere sabor e odor característico. O objetivo deste estudo foi isolar bactérias ácido lácticas com atividade antagonista em relação à *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, caracterizar a qualidade microbiológica e físico-química de amostras de leite *in natura* e queijos coloniais provenientes da região Fronteira Noroeste do RS e verificar a influência nestas características de dois dos períodos de coleta que caracterizam verão e inverno. Para isto foram selecionados dez unidades de sistema familiar agrícola que fabricavam queijo colonial a partir de leite cru e sem adição de fermento lácteo. Realizaram-se duas coletas (janeiro/julho) de amostras de leite e queijos. Procedeu-se, então, o isolamento, a detecção da atividade antagonista e a verificação das características homo e heterofermentativas das bactérias ácido lácticas nativas, bem como a caracterização microbiológica e físico-química do leite e queijos da região. Considerando os testes realizados, das bactérias ácido lácticas isoladas, 37,49% pressupõe-se que sejam do gênero *Lactococcus/Enterococcus* e que 25,89% sejam *Lactobacillus*. Destes, 33,87% apresentaram atividade antagonista contra todos os patógenos testados e estes possuem característica homofermentativa. Em geral, as amostras de leite e queijos analisadas possuem qualidade microbiológica deficitária devido apresentarem contagens de micro-organismos indicadores de higiene. Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* nas amostras de leite e queijos. Os desvios padrões acima de um nos parâmetros analisados como umidade, proteína, gordura e teor de sal nos mostram que não há uma padronização para produção dos queijos coloniais da região Fronteira Noroeste. A composição do leite utilizado para fabricação dos queijos foi variada sendo esta observada também nos queijos. O período do ano ocasionou diversificação na microbiota dos leites e queijos, bem como variação nos teores de umidade, atividade de água e teor de sal dos queijos e do extrato seco total do leite. Os isolados devem passar por testes futuros para identificação das espécies.

**Palavras chave:** Bactérias ácido lácticas, leite, queijo, antagonismo láctico, caracterização microbiológica, caracterização físico-química.



## ABSTRACT

**FUNCK, Graciele Daiana.** Isolamento de bactérias ácido lácticas com atividade antagonista frente a patógenos e caracterização microbiológica e físico-química de amostras de leite *in natura* e queijos coloniais da região Fronteira Noroeste do estado do RS. 2012. 80f. **Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.**

Milk is an essential food, rich in nutrients. The cheese, a product derived from milk is protein-fat concentrate also a high nutritional value. The lactic acid bacteria, naturally present in milk, are fundamental for the production of cheeses, because they are responsible for the fermentation process that gives flavor typical. The aim of this study was to isolate lactic acid bacteria with antagonistic activity in relation to *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus*, characterization the microbiological and physico-chemical of raw milk and cheeses from the northwestern region of Rio Grande do Sul state and the influence of the seasons in these characteristics was studied. For this, were selected ten farmers who manufactured artisan cheese from raw cow milk and without addition of starter cultures. There were two collections (summer/winter) of samples of milk and cheese. The procedure was then the isolation, detection and checking of the antagonistic activity of the fermentation profile of native lactic acid bacteria as well as the microbiological and physic-chemical characterization of milk and cheeses regional. Considering the testes, of lactic acid bacteria isolated, 37,49% premise to be of the genus *Lactococcus/Enterococcus* and *Lactobacillus* are 25.89%. The activity antagonist against all tested pathogens was showed for 33,87% isolates and these have homofermentative profile. In general, the samples of milk and cheeses analyzed have low microbiological quality due to high numbers of microorganism hygiene indicator. Was not detected the presence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in samples of milk and cheese. The high standard deviations for moisture, protein, fat and salt content show that there is a rule for artisanal cheese production in the northwestern region of Rio Grande do Sul state. The composition of milk used for cheese production was varied and this is also observed in the cheeses. The season resulted in microbial diversification milks and cheeses, as well as variation in moisture, water activity and salt content of cheese and the total solids of milk. Bacterial isolates should be further tests for confirmation and species identification.

Keywords: Lactic acid bacteria, milk, cheese, lactic antagonism, microbiological, physico-chemical characterization.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Principais agentes etiológicos envolvidos em surtos notificados de origem alimentar no Brasil.....20
- Figura 2 - Árvore filogenética dos gêneros de bactérias ácido lácticas baseada na comparação de análise de sequencia 16S rRNA.....27
- Figura 3: Evolução da microbiota durante os meses de janeiro/julho. CF – coliformes termotolerantes (fecais); CT – coliformes totais; SCP – Estafilococos coagulase positiva; CPP – contagem de mesófilos aeróbios; BAL – bactérias ácido lácticas. ...53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição físico-química de leite cru e pasteurizado consumido em Queimadas/PB. ....	22
Tabela 2: Composição físico-química de leite cru proveniente do município de Alfenas/MG.....	23
Tabela 3: Mudanças nas características microbiológicas de queijo Serrano durante processamento e maturação no verão <sup>1</sup> e inverno <sup>1</sup> .....	24
Tabela 4: Mudanças nas características físico-químicas de queijo Serrano durante processamento e maturação no verão <sup>1</sup> e inverno <sup>1</sup> .....	24
Tabela 5: Codificação das amostras de leite e queijo da região Fronteira Noroeste do RS. ....	33
Tabela 6: Morfologia celular, coloração de GRAM e teste de catalase de bactérias isoladas de amostras de leite e queijos coloniais produzidos na região Fronteira Noroeste do RS.....	41
Tabela 7: Diâmetros dos halos de inibição apresentados no teste da gota utilizando o sobrenadante da cultura de bactérias ácido lácticas nativas isoladas de amostras de leite e queijos coloniais da região Fronteira Noroeste do RS frente a patógenos de referência. ....	44
Tabela 8: Caracterização microbiológica de leite <sup>1</sup> e queijos em dois tempos de maturação <sup>1</sup> da região Fronteira Noroeste do estado do RS durante os meses de janeiro <sup>1</sup> e julho <sup>1</sup> .....	49
Tabela 9: Caracterização físico-química de amostras de leite <sup>1</sup> e queijos em dois períodos de maturação <sup>1</sup> da região Fronteira Noroeste do estado do RS durante os meses de janeiro <sup>1</sup> e julho <sup>1</sup> . ....	59

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Composição química e contagem de células somáticas de leite a granel usado para produção de queijos da Fontina provenientes de fazendas orgânicas (verão/inverno) e convencionais (verão).....23

Quadro 2: Composição química de queijos da Fontina produzidos por fazendas convencionais e orgânicas.....25

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE QUADROS .....	11
OBJETIVOS .....	17
1.1 Objetivo geral.....	17
1.2 Objetivos específicos .....	17
REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1 Produção de Leite e queijos no Brasil.....	18
2.2 Condições microbiológicas e físico-químicas do leite e queijos no Brasil e no mundo.....	19
2.3 Bactérias ácido lácticas (BAL) .....	26
2.3.1 Bactérias ácido lácticas em leite e queijos .....	29
MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.1 Amostras.....	33
3.2 Isolamento de BAL .....	34
3.3 Detecção da atividade antagonista de BAL .....	34
3.4 Caracterização homo ou heterofermentativa dos isolados de BAL .....	35
3.5 Caracterização da qualidade microbiológica e físico-química das amostras de leite in natura e queijos coloniais utilizados no isolamento de BAL .....	36
3.5.1 Caracterização microbiológica .....	36
3.5.2 Caracterização físico-química .....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Isolamento de BAL .....	41
4.2 Detecção da atividade antagonista dos isolados de BAL .....	43
4.3 Caracterização homo ou heterofermentativa dos isolados de BAL .....	47
4.4 Caracterização da qualidade microbiológica e físico-química amostras de leite in natura e queijos coloniais.....	48
4.4.1 Caracterização microbiológica .....	48
4.4.2 Caracterização físico-química .....	58
CONCLUSÕES .....	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	67

## INTRODUÇÃO

Desde o princípio da civilização humana, o leite tem sido considerado um alimento básico para crianças e um suplemento indispensável na dieta dos adultos (BEHMER, 1999). Com o uso do leite na alimentação do homem, surgiram, em função de sua perecibilidade, os diversos tipos de leite fermentados como resultantes da fermentação natural do mesmo, por ação das bactérias nativas, em condições ambientais de armazenamento, temperaturas em torno de 20-40°C num período de 10 a 24 horas (BRUNO e CARVALHO, 2009). A partir da fermentação e formação do coágulo, deu-se a dessora, promovida por agitação ou quebra do coágulo o que originou um decantado constituído de caseína e principalmente de gordura, surgindo assim um concentrado proteico-gorduroso de alto valor alimentício, o qual se denomina queijo (BEHMER, 1999).

Segundo a IN nº 62 de 29/12/11 do Ministério da Agricultura, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 1996). Ainda, a Portaria do Ministério da Agricultura nº 146 de 07/03/1996, define queijo por o 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 calho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido 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. Entende-se por queijo fresco o que está pronto para consumo logo após sua fabricação. Entende-se por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do

queijo. A denominação queijo está reservada aos produtos em que a base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de origem não láctea.

O Rio Grande do Sul (RS) é o segundo estado produtor de leite do Brasil, sendo a região Fronteira Noroeste do RS responsável por produzir 9,4% do leite *in natura* do estado (EMBRAPA, 2011). A região Fronteira Noroeste pertence à mesorregião do Noroeste Rio-Grandense, distante 500 Km da capital Porto Alegre e faz fronteira com a Argentina a Oeste (DALLABRIDA e BÜTTENBENDER, 2007). É composta por 20 municípios, abrangendo uma área total de 4.689 km<sup>2</sup>, com uma população estimada em torno de 203 mil habitantes em 2010 (FEE RS, 2012). A região tem no agronegócio o ponto central de sua matriz de geração de renda, com atividades voltadas para a agricultura e a pecuária (DALLABRIDA e BÜTTENBENDER, 2007).

Segundo dados da Emater Regional de Santa Rosa/RS (2012), a economia da região é caracterizada basicamente pela cultura da soja. São mais de 644 mil hectares destinados a ela. Paralelamente, cresce também a cultura do milho (163 mil ha), trigo e alfafa (3 mil e quinhentos ha), mandioca (16 mil ha), cana-de-açúcar (9 mil ha), bovinocultura de leite com (1,5 milhões de litros diários) e bovinos de corte. Destacam-se ainda, as agroindústrias que hoje somam 633 e agregam valor na renda mensal de 1999 famílias em área de transformação de carne, cana-de-açúcar, mandioca, panificação, derivados de leite, hortigranjeiros, frutas, mel entre outras. Hoje, na região Fronteira Noroeste do RS, 30% das famílias rurais vivem da atividade leiteira (MILKNET, 2010).

A cadeia agroalimentar da região Fronteira Noroeste do RS é caracterizada pela produção primária, agroindustrial e comercial, que produz, processa e comercializa produtos oriundos do setor primário. Entre inúmeras agroindústrias da região destacam-se os complexos agroindustriais como: moinhos de farinhas, cerealistas, frigoríficos e abatedouros (de aves, suínos e bovinos); agroindústrias de derivados de leite (beneficiamento e industrialização); agroindústrias de conservas (doces, geléias, condimentos e picles); agroindústrias de vinhos, sucos, aguardente e derivados de cana-de-açúcar (EVANGELISTA et al, 2006). A área da agroindústria familiar tem destaque neste quadro, agregando valor aos produtos produzidos nesta região. O leite produzido na região Fronteira Noroeste do RS é processado em grandes laticínios, bem como em pequenas agroindústrias, sendo transformado em diversos tipos diferentes de produtos, o que acrescenta valor à matéria-prima.

Dentre os produtos resultantes da agroindustrialização do leite podemos citar a produção de queijos, que além de agregar valor, também se destaca por seu maior tempo de conservação (LOPES et al, 2006).

Na região Fronteira Noroeste do RS são produzidos queijos artesanais, popularmente denominados queijos coloniais, cujo conhecimento das suas técnicas de fabricação tem sido transferido verbalmente ao longo das gerações. Por ser fabricado, na grande maioria dos casos, com leite cru e sem a adição de fermentos lácteos, possui uma diversificada população microbiana indesejada, proveniente do próprio leite e também das condições higiênico-sanitárias às quais é submetido. Este produto pode se caracterizar como risco aos consumidores, já que além de micro-organismos deteriorantes pode servir de veículo para micro-organismos patogênicos, como coliformes termotolerantes, *Listeria monocytogenes*, Estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* spp (ORTOLANI, 2009).

No entanto, além dos micro-organismos indesejáveis em leite e derivados, estão presentes também, as bactérias ácido lácticas (BAL). Essas bactérias são inerentes da matéria-prima leite, e desempenham um papel primordial no processo de fermentação do mesmo, além de produzir substâncias capazes de combater naturalmente patógenos contaminantes, sendo sua utilização um dos métodos mais antigos de preservação (ORTOLANI, 2009).

A população microbiana de cada produto lácteo varia de acordo com a região geográfica onde este é produzido, podendo se atribuir variações em razão do leite utilizado, do clima predominante e dos métodos empregados no processamento (FRANCIOSI et al, 2009).

Existe um paradoxo quando se estuda a microbiota nativa de produtos lácteos, que leva a crer que as bactérias ácido lácticas presentes são responsáveis pelo antagonismo a patógenos. Vários trabalhos tem evidenciado a contaminação de leites e derivados por micro-organismo indicadores de higiene, mas não evidenciam contagens de micro-organismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. (NERO et al, 2008; DHANASHREE et al, 2003; JAY, 1995). Outros pesquisadores afirmam que quando a qualidade microbiológica melhora, os patógenos que estão presentes são facilmente detectados (ORTOLANI, 2009; OLIVER et al, 2005). Isto sugere que a microbiota natural interfere no desenvolvimento de patógenos, pois estes são maus competidores e sensíveis às variações do meio, possivelmente provocada pela acidificação deste por ação das



BAL nativas presentes e ainda, de outros interferentes, como compostos antimicrobianos produzidos por elas mesmas (ORTOLANI, 2009).

Embora haja diversos estudos demonstrando que BAL, além de conferir características peculiares a diversos tipos de alimentos em diversas regiões do mundo, também promovem antagonismo a vários patógenos, como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* (LIMA et al., 2009; NESPOLO, 2009; ORTOLANI, 2009; OLIVEIRA et al., 2008; CHIODA et al., 2007; PEREIRA; GOMEZ, 2007; VELJOVIC et al., 2007; HERNANDEZ; CARDEL; ZÁRATE, 2005; JAY, 2005; NETO et al., 2005; ORTIGOSA et al., 2006; HERREROS, 2005; MACEDO et al., 2004; MARTINIS et al., 2001; REQUE et al., 2000), ainda não existem dados referentes às BAL nativas do leite *in natura* e dos queijos coloniais produzidos na região Fronteira Noroeste do RS, e consequentemente é desconhecida sua atividade antagonista.

A falta de conhecimento sobre as espécies de BAL que estão presentes naturalmente e que conferem identidade ao leite e aos queijos coloniais produzidos na região Fronteira Noroeste, bem como a falta de conhecimento das substâncias que promovem o antagonismo a patógenos provenientes das condições higiênicas sanitárias deficientes durante a fabricação destes, são os principais motivos para a realização deste estudo.

Como não existe padronização no processo de fabricação quanto ao tempo de coagulação, tipo de coalho utilizado, prensagem, salga e teor de umidade do produto final, além da grande diversidade da microbiota natural, pode-se encontrar no mercado, uma variedade de queijos coloniais que não obedecem a qualquer padrão de identidade e qualidade. Devido a isto, fica clara a importância de conhecer a composição físico-química e microbiológica do leite e queijos produzidos e comercializados na região Fronteira Noroeste do RS para estabelecer identidade e qualidade para os mesmos.

## OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Determinar atividade antagonista de bactérias ácido lácticas em relação à *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus* e caracterizar a qualidade microbiológica e físico-química de amostras de leite *in natura* e queijos coloniais provenientes da região Fronteira Noroeste do RS.

### 1.2 Objetivos específicos

1. Detectar a atividade antagonista das bactérias ácido lácticas isoladas de leite *in natura* e queijos coloniais produzidos na região Fronteira Noroeste do RS frente à *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus*;

2. Analisar a qualidade microbiológica e físico-química das amostras de leite *in natura* e queijos coloniais utilizadas para isolamento das bactérias ácido lácticas;

4. Verificar uma possível influência nas características microbiológicas e físico-químicas ocasionadas pelo período de coleta, mês de janeiro, característico de verão e mês de julho, característico de inverno nesta região.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Produção de Leite e queijos no Brasil

No Brasil, anualmente são produzidos aproximadamente 30,5 milhões de litros de leite. O estado do RS é atualmente o segundo maior produtor de leite do Brasil, com uma produção anual superior a 3,6 bilhões de litros, o que representa 12% da produção nacional (EMBRAPA, 2011). A produção de leite neste estado vem crescendo em escala e produtividade nos últimos anos, principalmente nas bacias leiteiras organizadas em sistemas de cooperativas, responsáveis pela maioria da captação. As regiões<sup>1</sup> com maior produção são: Noroeste Colonial com 11,3%, Produção com 11%, Fronteira Noroeste com 9,4% e Serra com 8,1% do leite produzido no Estado (IBGE, 2010).

A produção de leite no Estado do RS vem crescendo nos últimos anos (ZOCCAL, 2012). A maior parte dos produtores entrega o leite que produz na forma *in natura*, para as indústrias beneficiarem este alimento. Porém, como alternativa e incremento na renda de pequenos produtores rurais, o leite vem sendo transformado no interior de suas propriedades.

Como um método para agregar valor a este produto, os produtores têm se utilizado da tecnologia de fabricação de queijos, por ser um alimento de grande aceitação, altamente nutritivo e de vida útil maior que do leite *in natura*. Segundo o Censo Agropecuário de 2006 (IBGE, 2010), no Brasil, são produzidas 97.058 toneladas/ano de queijos e requeijão proveniente de matéria-prima própria, sendo o RS o responsável por 7.423 toneladas/ano.

---

<sup>1</sup> Classificação dos Conselhos Regionais de Desenvolvimento – COREDES – RS.

## 2.2 Condições microbiológicas e físico-químicas do leite e queijos no Brasil e no mundo

Apenas 69% do leite produzido no Brasil provem de fontes inspecionadas (EMBRAPA, 2011). Esta estatística mostra que há deficiência no sistema de fiscalização da produção leiteira. Associado a isto, a comercialização informal leva ao consumidor um alimento de má qualidade microbiológica refletindo assim as condições precárias de higiene que se encontra a produção leiteira no país.

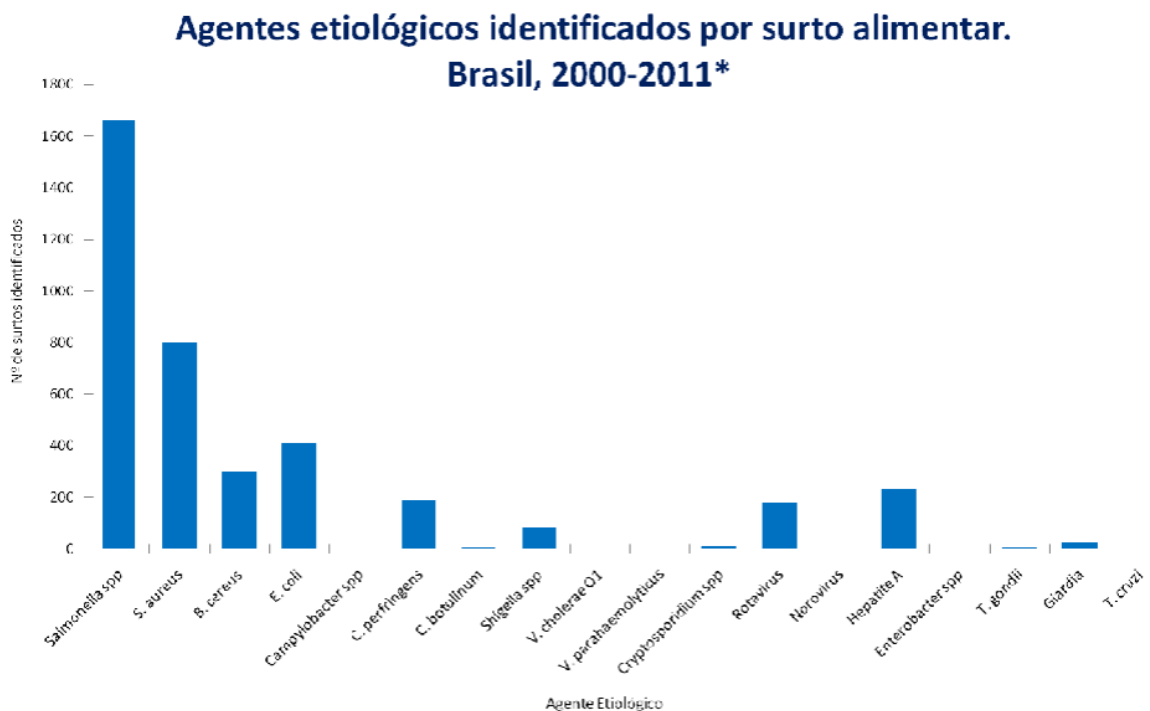
Na região Fronteira Noroeste do RS é produzido um queijo artesanal, popularmente denominado queijo colonial, cujo conhecimento das suas técnicas de fabricação tem sido transferido verbalmente ao longo das gerações. Tal produto é apreciado e consumido pela população local motivado por hábitos alimentares sedimentados, pois se acredita que estes produtos são saudáveis, possuem alto valor nutricional e preços mais acessíveis. Estes queijos são produzidos de forma artesanal, sem pasteurização do leite e sem práticas higiênico-sanitárias adequadas, as quais são imprescindíveis para obtenção de produtos de qualidade e sem risco a saúde do consumidor (CAVALCANTE et al., 2007). Estes são vendidos de maneira informal, sem fiscalização de órgãos competentes, nas redondezas de seu local de produção.

De acordo com a legislação vigente (BRASIL, 1996), os queijos em geral devem ser obtidos a partir do leite pasteurizado, integral ou padronizado, é permitido o uso de leite cru para processamento de queijos somente se este for maturado a uma temperatura superior a 5°C e por mais de 60 dias, porém é frequente a comercialização de queijos coloniais feitos com leite cru com tempo de maturação menor a 15 dias. O emprego do leite cru e sem a adição de fermentos lácteos, na grande maioria dos processos de produção artesanal, fornece a este produto uma diversificada população microbiana indesejada, proveniente do próprio leite e também das condições higiênico-sanitárias às quais é submetido. Este aspecto se caracteriza como um risco aos consumidores, já que além de micro-organismos deteriorantes pode também servir como veículo de micro-organismos patogênicos, como coliformes termotolerantes, *Listeria monocytogenes*, Estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* spp (ORTOLANI, 2009).

Além dos micro-organismos indesejáveis, a microbiota é composta também de bactérias ácido lácticas (BAL). Essas bactérias são inerentes da matéria-prima

leite, e desempenham um papel primordial no processo de fermentação do mesmo, sendo sua utilização um dos métodos mais antigos de preservação (ORTOLANI, 2009).

O consumo de alimentos contaminados por patógenos pode representar um risco a saúde da população, principalmente de pessoas imunocomprometidas, crianças e idosos. Na maioria das vezes, as enfermidades envolvendo doenças de origem alimentar não são diagnosticadas ou são subnotificadas pela demora ou pela dificuldade em identificar os surtos (BRASIL, 2010). Na figura 1, é possível observar os micro-organismos mais envolvidos em surtos de origem alimentar no Brasil. Muitas vezes, leite e queijos são envolvidos em surtos e casos de toxinfecções alimentares.



\* O gráfico representa apenas os agentes com maior frequência de ocorrência nos surtos alimentares identificados no período. O que não implica na não ocorrência de outros agentes causais.

Figura 1: Principais agentes etiológicos envolvidos em surtos notificados de origem alimentar no Brasil.

Fonte: BRASIL, 2010.

Existe um paradoxo quando se estuda a microbiota nativa de produtos lácteos, que leva a crer que as bactérias ácido lácticas presentes são responsáveis pelo antagonismo a patógenos. Vários trabalhos tem evidenciado a contaminação de

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

Diversos trabalhos científicos publicados no Brasil apresentados no decorrer deste texto, têm revelado a baixa qualidade microbiológica do leite e queijos comercializados, caracterizados pela frequente contaminação por coliformes totais, termotolerantes, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp.. Catão e Ceballos (2001) pesquisaram a qualidade microbiológica de leite cru e pasteurizado em uma indústria no estado da Paraíba e observaram que todas as amostras apresentaram incidência de coliformes totais e termotolerantes e *E. coli*, nas amostras coletadas nos meses de março/abril de 1998, inclusive as amostras de leite pasteurizado, apresentaram-se fora dos padrões microbiológicos para o leite tipo C, que conforme legislação vigente na época, estabelecia valor máximo de CT de 10 NMP/mL e de CF de 2 NMP/mL. Os resultados sugerem contaminação pós-pasteurização no ensacamento ou pasteurização deficiente. O trabalho também demonstrou que de 75 amostras coletadas, 42 (56%) estavam contaminadas com *Listeria* spp. Ao analisar queijos minas frescal na cidade de Cuiabá/MT, Loguercio e Aleixo (2001) observaram que 93,33% das amostras apresentaram valores acima dos padrões legais aceitáveis na época para coliformes termotolerantes e 96,67% para *Staphylococcus aureus*.

Salotti et al. (2006) reportaram que na cidade de Jaboticabal/SP os queijos artesanais comercializados em supermercados, padarias, açougues e feiras livres, encontravam-se contaminadas. Das amostras analisadas, 83,3% apresentaram níveis acima do permitido pela legislação para coliformes termotolerantes e 20% para Estafilococos coagulase positiva. Porém, os resultados para pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. foram considerados aceitáveis, pois houve ausência deste micro-organismo em todas as amostras. Enquanto que, em Aracaju/SE,

Santanna et al. (2008) observaram que em 26,7% das amostras de queijo-coalho estavam contaminadas por *Salmonella* spp. Por ser um micro-organismo potencialmente patogênico, estas amostras foram consideradas impróprias para o consumo. Ainda, 93,3% dos queijos apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes e contagem superiores a  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> de *Staphylococcus aureus*. Andrade (2009) foi um dos poucos pesquisadores que relatou a baixa incidência de contaminação microbiana em queijos Minas da Serra da Canastra feitos de forma artesanal. O autor observou que todas as amostras estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação para coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. E apenas 7,4% apresentaram-se contaminadas com valores acima de  $10^3$  por Estafilococos coagulase positiva sendo este o máximo estabelecido pela RDC 12 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001).

A incidência de micro-organismos patogênicos acima dos valores máximos determinados por órgãos fiscalizadores nos queijos estudados revela a falta de condições higiênico-sanitárias em queijos artesanais produzidos em todo país. A legislação brasileira proíbe a venda de queijos feitos a partir de leite cru com menos de 30 dias de maturação. Mesmo assim, até hoje, ainda são comercializados queijos elaborados de forma artesanal e sem nenhuma fiscalização.

Outros trabalhos têm publicado as características físico-químicas de leite e queijos de diversas regiões do Brasil e do mundo. Barbosa et al. (2007) analisaram leite cru e pasteurizado provenientes do município de Queimadas/PB e obtiveram os dados apresentados na tab. 1. Almeida et al. (1999) também estudaram a composição de leite cru proveniente do município de Alfenas/MG. Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na tab. 2.

Tabela 1: Composição físico-química de leite cru e pasteurizado consumido em Queimadas/PB.

Amostras	I.C <sup>(1)</sup>	% Ág. <sup>(2)</sup>	Acid. <sup>(3)</sup>	Gord. <sup>(5)</sup>	Dens. <sup>(6)</sup>	EST <sup>(7)</sup>	ESD <sup>(8)</sup>
Leite Pasteurizado (A)	-0,547	-	15,0	3,36	1031,5	12,16	8,80
Leite cru (B)	-0,507	5,4	14,0	2,43	1028,8	10,37	7,94

1 – Índice crioscópico; 2 -% de água adicionada; 3 – Acidez; 5 – Gordura; 6 – Densidade; 7 – Extrato seco total; 8 – Extrato seco desengordurado.

Fonte: BARBOSA et al. (2007).

Tabela 2: Composição físico-química de leite cru proveniente do município de Alfenas/MG.

Amostra	I.C <sup>(1)</sup>	% Ág. <sup>(2)</sup>	Acid. <sup>(3)</sup>	Gord. <sup>(5)</sup>	Dens. <sup>(6)</sup>	EST <sup>(7)</sup>	ESD <sup>(8)</sup>
01	-0,474	10,9	12,66	2,9	1028,1	10,77	7,87
02	-0,507	5,4	13,83	3,36	1028,8	11,49	8,12
03	-0,547	-	14,33	2,73	1031,6	11,45	8,72
04	-0,550	-	15,5	2,33	1033,3	11,39	9,06
05	-0,547	-	15,16	2,43	1031,5	11,07	8,63
06	-0,499	6,7	13,33	3,33	1027,8	11,20	7,87
07	-0,467	12,0	12,33	2,83	1027,7	10,57	7,74

1 – Índice crioscópico; 2 -% de água adicionada; 3 – Acidez; 4 – Gordura; 5 – Densidade; 6 – Extrato seco total; 7 – Extrato seco desengordurado.

Fonte: ALMEIDA et al. (1999).

Nuch et al. (2004) analisaram dois lotes de queijos coloniais provenientes de dois produtores do município de Viamão/RS, quanto as suas características físico-químicas e obtiveram aproximadamente teores de umidade de 57%, extrato seco total (EST) de 42,5%, cloreto de sódio de 0,9%, proteína total de 17% e acidez 0,63 g de ácido láctico/100g de amostra. Em 2007, Cavalcanti et al., analisaram queijos coalhos artesanais em Minas Gerais e observaram 42% de umidade, 28% de gordura, 23% de proteína, 1,73% de cloreto de sódio, pH de 5,23 e 0,77 g de ácido láctico/100g de produto de acidez.

Renna et al. (2009), estudaram o leite produzido na região da Fontina na Itália, e verificaram influência das estações do ano e do tipo de produção nas suas características físico-químicas deste. Os resultados estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1: Composição química e contagem de células somáticas de leite a granel usado para produção de queijos da Fontina provenientes de fazendas orgânicas (verão/inverno) e convencionais (verão).

	Orgânico (inverno/primavera) n = 6	Orgânico (verão) n = 6	Convencional (verão) n = 6	Valor P
Gordura (%)	3,47 ± 0,14 b	3,70 ± 0,06 a	3,83 ± 0,09 a	0,004
Proteína (%)	3,17 ± 0,08 b	3,36 ± 0,09 a	3,39 ± 0,04 a	0,004
Lactose (%)	4,89 ± 0,03 a	4,82 ± 0,02 b	4,78 ± 0,03 b	0,001
Uréia	20,65 ± 2,06	21,35 ± 3,22	21,45 ± 4,66	0,916
SCC (nº 10 <sup>3</sup> mL <sup>-1</sup> )	162 ± 34 b	265 ± 45 a	318 ± 56 a	0,001

Os valores são expressos como ± o desvio padrão médio.  
Diferentes letras em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras de leite.  
SCC = Contagem de células somáticas

Fonte: Adaptado de RENNA et al. (2009).



Alguns estudos demonstraram que a estação do ano no qual o queijo é produzido também tem influencia nas características físico-químicas e microbiológicas dos queijos artesanais, tanto para os produzidos no Brasil como em outros países do mundo. Nas tab. 3 e 4, podemos verificar a influência das estações do ano na composição microbiológica e físico-química do queijo Serrano proveniente da Serra Gaúcha em estudo realizado por Souza et al. (2003).

Tabela 3: Mudanças nas características microbiológicas de queijo Serrano durante processamento e maturação no verão<sup>1</sup> e inverno<sup>1</sup>.

Grupo microbiano (log UFC/g)	Estação do ano	Leite	Massa coalhada	Tempo de maturação (dias)				
				7	14	28	42	60
Contagem total de bactérias	Verão	6,07±0,64a	7,60±0,90b	9,32±0,05c	9,00±0,05bc	8,57±0,11bc	8,36±0,44bc	7,71±0,62b
	Inverno	5,70±0,77a	7,40±1,15ab	9,19±0,36c	9,12±0,24c	8,65±0,28bc	7,98±0,43bc	7,56±0,21bc
Psicrotróficos	Verão	6,00±1,09ab	7,35±0,70ab	8,06±0,09b	7,80±0,39b	6,90±0,78ab	6,72±1,34ab	4,94±1,62a
	Inverno	5,49±0,95a	6,49±0,54ab	8,26±0,52c	8,15±0,51c	8,10±0,34c	7,64±0,34bc	7,02±0,56abc
Proteolíticos	Verão	5,03±0,33a	5,91±0,27ab	7,12±1,40ab	8,09±0,34b	7,50±0,88b	7,17±0,58ab	7,10±1,18ab
	Inverno	4,88±0,72	5,97±0,59	7,09±2,27	9,05±0,34	8,67±0,16	7,82±0,79	7,86±0,75
Lipolíticos	Verão	3,94±0,92a	5,18±0,57a	6,50±0,74a	6,59±1,67a	6,43±0,99a	5,57±0,74a	5,50±0,93a
	Inverno	4,94±0,76a	6,15±0,50a	6,16±0,60a	6,26±0,81 <sup>a</sup>	5,13±0,64a	5,30±0,84a	4,68±1,46a
Lactococos	Verão	5,84±0,66a	7,60±0,84b	9,31±0,03c	8,92±0,10bc	8,42±0,20bc	8,17±0,57bc	8,00±0,31bc
	Inverno	5,63±0,48	7,32±1,31	9,14±0,30	9,07±0,43	8,29±0,14	7,70±0,38	7,68±0,31
Lactobacilos	Verão	4,32±1,43a	5,62±0,89a	8,38±0,63b	8,34±0,63b	8,39±0,21b	8,27±0,27b	8,15±0,04b
	Inverno	3,46±1,11	4,16±1,41	7,24±1,71	7,77±0,95	7,98±0,83	7,91±0,37	7,92±0,21
Halotolerantes	Verão	5,26±0,57ab	6,42±0,56b	6,52±0,56b	5,72±0,01ab	5,24±0,42ab	4,63±0,78a	4,64±0,79a
	Inverno	4,55±0,58a	6,13±0,67b	6,74±0,14b	6,37±0,57b	6,09±0,43b	6,15±0,26b	6,02±0,03b
Bolores	Verão	2,49±0,27a	2,53±0,21ab	4,70±0,30b	3,67±0,06ab	2,93±0,83ab	1,20±2,08a	1,94±1,68a
	Inverno	1,49±1,31a	1,49±1,29a	2,52±0,91a	2,64±0,59a	1,43±1,25a	1,33±1,15a	0,67±1,15a
Leveduras	Verão	3,03±0,77a	4,42±0,76ab	6,04±0,27b	4,81±0,70ab	4,80±0,55ab	4,24±0,70ab	3,72±0,66a
	Inverno	3,37±0,63a	4,59±0,37a	5,51±1,04a	4,59±0,84a	4,63±0,80a	4,08±1,55a	4,07±1,17a
Coliformes totais	Verão	4,03±1,34ab	5,57±0,86b	5,76±1,18b	5,45±1,33b	4,07±2,37ab	3,18±2,37ab	0,57±0,88a
	Inverno	3,54±0,96a	4,84±0,82a	4,98±1,27a	3,65±2,14a	3,13±3,11a	2,74±3,00a	3,01±2,98 <sup>a</sup>
Coliformes termotolerantes	Verão	3,13±1,00ab	4,27±0,54ab	5,59±1,24b	5,29±1,26b	4,00±2,37ab	2,69±2,69ab	<10a
	Inverno	1,75±0,14a	3,09±0,61a	3,92±1,15a	2,44±2,79a	2,34±2,50a	2,08±2,15a	2,18±2,29a

<sup>1</sup> Os dados são os valores das médias ± desvio padrão de três bateladas.

Letras diferentes em uma mesma linha significa que estes diferem significativamente entre si (P < 0,05).

Fonte: Adaptado de SOUZA et al. (2003).

Tabela 4: Mudanças nas características físico-químicas de queijo Serrano durante processamento e maturação no verão<sup>1</sup> e inverno<sup>1</sup>.

Características	Estação do ano	Leite	Massa coalhada	Tempo de maturação (dias)				
				7	14	28	42	60
pH	Verão	6,71±0,05c	6,36±0,19bc	5,33±0,09 <sup>a</sup>	5,52±0,05a	5,80±0,36ab	5,75±0,33ab	5,66±0,23 <sup>a</sup>
	Inverno	6,66±0,04	6,29±0,56	5,10±0,21	5,20±0,25	5,24±0,19	5,30±0,23	5,30±0,19
Acidez titulável <sup>2</sup>	Verão	0,20±0,0a	0,20±0,0a	1,10±0,20b	1,10±0,10b	0,90±0,30ab	1,30±0,50b	1,40±0,40b
	Inverno	0,20±0,0a	0,30±0,2ab	0,90±0,20bc	0,90±0,30c	1,00±0,30c	0,90±0,30bc	1,00±0,20c
Umidade (%)	Verão	-	50,78±1,17d	40,52±4,73c	36,85±2,26bc	36,63±2,82bc	29,56±2,46ab	27,57±0,72 <sup>a</sup>
	Inverno	-	57,30±3,76d	45,37±1,71c	43,34±0,88bc	39,81±0,73bc	36,80±1,06ab	32,98±4,16 <sup>a</sup>
aw	Verão	-	0,987±0,003c	0,97±0,004bc	0,962±0,006b	0,953±0,007ab	0,939±0,010a	0,935±0,007 <sup>a</sup>
	Inverno	-	0,984±0,005b	0,970±0,004ab	0,967±0,003ab	0,966±0,006ab	0,957±0,008a	0,954±0,012 <sup>a</sup>
NaCl em base seca (%)	Verão	-	1,4±0,6a	1,2±0,4 <sup>a</sup>	1,3±0,4a	1,6±1,0a	1,4±0,6a	1,4±0,6 <sup>a</sup>
	Inverno	-	1,3±1,5a	1,6±0,9 <sup>a</sup>	1,3±0,7a	1,5±0,8a	1,7±0,9a	1,5±0,8 <sup>a</sup>
NaCl em base úmida (%)	Verão	-	1,3±1,5a	1,6±0,9 <sup>a</sup>	1,3±0,7a	1,5±0,8a	1,7±0,9a	1,5±0,8 <sup>a</sup>
	Inverno	-	1,4±0,6a	1,9±0,9 <sup>a</sup>	2,3±0,9a	2,6±1,3a	3,1±1,3a	3,4±1,3 <sup>a</sup>
	Inverno	-	0,9±0,9a	1,8±1,0a	1,7±1,0a	2,2±1,1a	2,8±1,6a	3,1±1,8 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Os dados são os valores das médias ± desvio padrão de três bateladas. <sup>2</sup> Expresso em % de ácido láctico.

Letras diferentes em uma mesma linha significa que estes diferem significativamente entre si ( $P < 0,05$ ).

Fonte: Adaptado de SOUZA et al. (2003).

Na Itália, RENNA et al. (2009) também estudaram a influência das estações do ano nas características de queijos tipo Danish produzidos de forma artesanal com emprego de leite cru na sua formulação, os quais possuem selo de identidade e qualidade (PDO – Protected Designation of Origin). Os resultados estão apresentados no quadro 2.

Quadro 2: Composição química de queijos da Fontina produzidos por fazendas convencionais e orgânicas.

	Orgânico (inverno/primavera) n = 6	Orgânico (verão) n = 6	Convencional (verão) n = 6	Valor P
MS (%)	60,90 ± 1,70	60,30 ± 0,36	61,17 ± 0,45	0,698
Cinzas (% MS)	7,45 ± 0,21	7,00 ± 0,76	6,57 ± 0,35	0,281
Proteína (% MS)	38,90 ± 1,84	39,60 ± 0,70	38,63 ± 0,38	0,688
Extrato etéreo (% MS)	46,40 ± 0,71	45,80 ± 1,30	47,20 ± 1,01	0,364
Os valores são expressos como ± o desvio padrão médio.				
MS = Matéria seca				

Fonte: Adaptado de RENNA et al. (2009).

A composição físico-química e microbiana de cada tipo de queijo varia de acordo com a região geográfica onde este é produzido, podendo se atribuir variações em razão do leite utilizado, do clima, das estações do ano e dos métodos empregados no processamento.

Os produtores de queijos coloniais não usam técnicas padronizadas em seu processo de fabricação, quanto ao tempo de coagulação, tipo de coalho utilizado, prensagem, salga e teor de umidade do produto final, além da grande diversidade da microbiota natural, podendo-se então, encontrar no mercado, uma variedade de queijos coloniais que não obedecem aos padrões de identidade e qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura através da Portaria nº 146 de 07/03/1996 (BRASIL, 1996). Devido a isto, fica clara a importância de conhecer a composição físico-química e microbiológica do leite e queijos comercializados na região Fronteira Noroeste do RS para estabelecer um padrão de identidade e qualidade para a mesma.

### 2.3 Bactérias ácido lácticas (BAL)

As bactérias ácido lácticas constituem um grupo heterogêneo de gêneros que compartilham muitas características fisiológicas. Incluem os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Microbacterium*, *Bifidobacterium* e *Propionibacterium* demonstrados através da árvore filogenética dos gêneros de bactérias ácido lácticas baseada na comparação de análise de sequencia 16S rRNA (HOLZAPFEL et al., 2001). BAL devem a sua designação à sua capacidade de fermentar os açúcares principalmente em ácido láctico através de metabolismo homo ou heterofermentativo. Elas se caracterizam por serem Gram positivas, catalase negativas, não formadoras de esporos e anaeróbias facultativas.

Geralmente são organismos imóveis, com exceção *Lactobacillus agilis* e uma espécie de *Lactobacillus* descrita como *ghanensis* e *Lactobacillus capillatus* (SETTANI e MOSCHETTI, 2010). A heterogeneidade deste grupo de bactérias é expressa em suas características morfológicas, uma vez que eles podem aparecer em forma de bacilos ou cocos, em células individuais ou em duplas, tétrades e em cadeias curtas ou longas. Devido à capacidade limitada de biossíntese e suas altas exigências em termos de carbono e fontes de nitrogênio, o habitat natural da BAL são ambientes ricos nutricionalmente. Eles são geralmente associados com plantas e matérias-primas animais, produtos alimentícios fermentados, pele de animais, mucosas e membranas (SETTANI e MOSCHETTI, 2010).

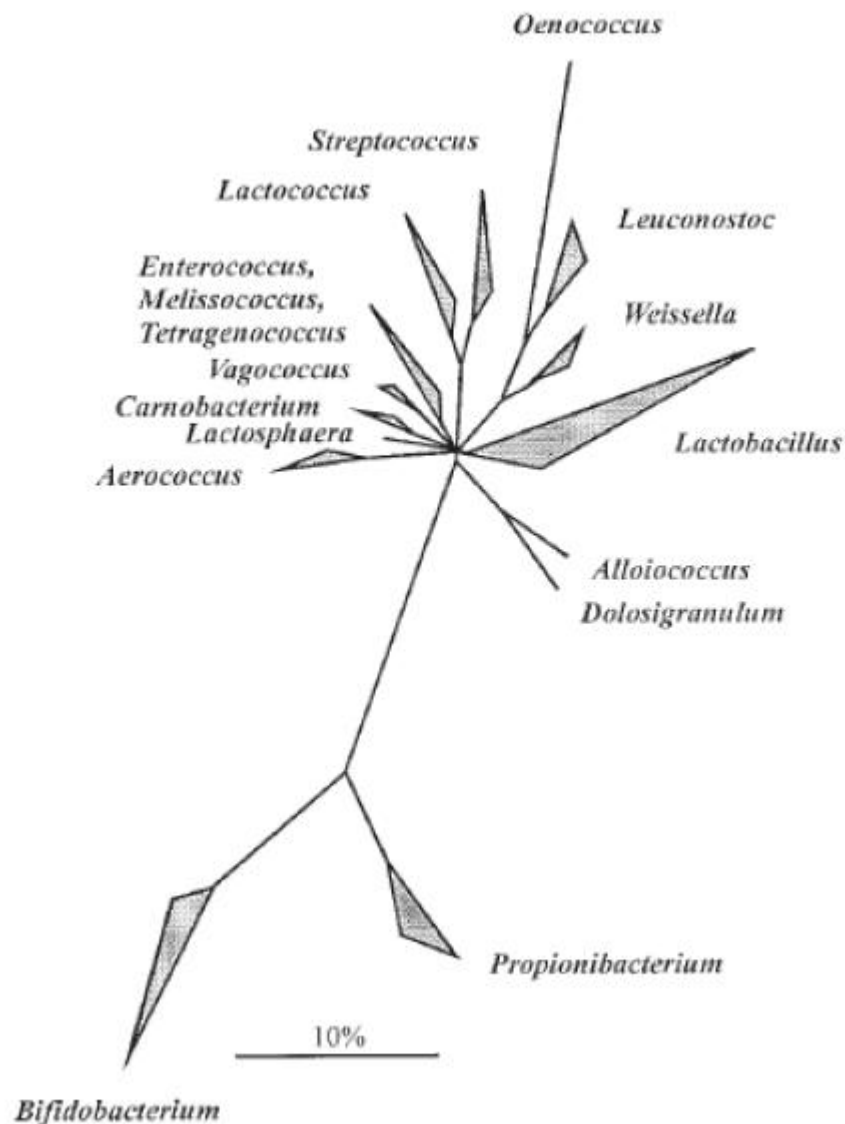


Figura 2 - Árvore filogenética dos gêneros de bactérias ácido lácticas baseada na comparação de análise de sequência de 16S rRNA.

Fonte: HOLZAPFEL et al. (2001).

As BAL estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser encontradas no solo, água, esterco, esgoto e silagem (NASCIMENTO, 2007; NETO et al., 2005). Elas são também habitantes dos tratos digestório, respiratório superior e urogenital inferior dos animais. A maioria delas é inativada a temperaturas superiores a 70°C (NETO et al., 2005). Ainda, essas bactérias produzem determinados compostos antagônicos formados em pequenas quantidades a partir do catabolismo celular, dentre os quais podemos citar ácidos orgânicos (como ácido

lático), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza proteica, denominadas bacteriocinas (NAIDU et al., 1999).

Muitas bactérias ácido lácticas apresentaram poder de inibição frente a patógenos e deteriorantes como *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., e bactérias do grupo coliforme (CHIODA et al., 2007; GLORIA, 2008; HERNANDEZ et al., 2005; HERREROS, 2005; JAY, 2005; LIMA et al., 2009; MACEDO et al., 2004; MARTINIS et al., 2001; NESPOLO, 2009; NETO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; ORTOLANI, 2009; ORTIGOSA, et al., 2006; REQUE et al., 2000; VELJOVIC et al., 2007).

A atividade antagonista das BAL ocorre devido ao crescimento competitivo com outros micro-organismos, potencializado pelos efeitos inibitórios dos seus metabólitos. O principal é o ácido láctico, além de peróxido de hidrogênio, CO<sub>2</sub>, diacetil e as bacteriocinas. Dentre estas, as bacteriocinas são as mais estudadas pela importância na aplicação em indústrias de alimentos como bioconservantes (ORTOLANI, 2009). Além disso, as BAL vêm sendo utilizadas também como probióticos (NESPOLO, 2009).

A bioconservação é uma técnica utilizada para estender a vida útil e aumentar a segurança dos alimentos por meio do emprego de microbiota protetora e/ou seus peptídeos antimicrobianos como ácidos orgânicos e bacteriocinas. Um exemplo desta técnica é a fermentação láctica que apesar de ser antiga é, até hoje, amplamente empregada na indústria de alimentos. A redução do pH devido à produção de ácidos orgânicos, especialmente ácido láctico, a partir da fermentação de carboidratos disponíveis nos alimentos é responsável pelo principal efeito antagonista contra diferentes micro-organismos. Contudo, a competição por nutrientes e a produção de outras substâncias com efeito inibitório (peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas) são importantes mecanismos antimicrobianos exercidos pelas bactérias lácticas (CORBO et al., 2009; NASCIMENTO, 2007).

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

inibição com diferentes enzimas, podem ser utilizados para caracterizar as bacteriocinas produzidas por BAL (ORTOLANI, 2009).

### 2.3.1 Bactérias ácido lácticas em leite e queijos

As bactérias ácido lácticas são inerentes da matéria-prima leite, e desempenham um papel primordial no processo de fermentação do mesmo, além de produzir substâncias capazes de combater patógenos contaminantes naturalmente, sendo sua utilização um dos métodos mais antigos de preservação. A população microbiana de cada produto lácteo varia de acordo com a região geográfica onde este é produzido, podendo se atribuir variações em razão do leite utilizado, do clima predominante e dos métodos empregados no processamento. Várias espécies pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* são muitas vezes obtidos a partir de leite cru (FRANCIOSI et al., 2009; LIMA et al., 2009; MORAES et al., 2009; ORTOLANI, 2009).

Por fazerem parte da matéria-prima leite, as BAL também fazem parte da microbiota do produto queijo e podem desempenhar papéis diferentes na fabricação destes. Algumas espécies participam no processo de fermentação, enquanto outros são envolvidos na maturação do queijo. No primeiro caso, BAL rapidamente fermentam a lactose produzindo ácido láctico e são designados como BAL iniciadoras, enquanto as responsáveis pelo processo de maturação são conhecidas como BAL não iniciadoras. O grupo de BAL iniciadoras inclui principalmente *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc* spp. entre as espécies mesófilas e *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus* entre as espécies termofílicas. O grupo de BAL não iniciadoras é particularmente heterogêneo com lactobacilos sendo principalmente representados: *Lactobacillus farciminis* entre as espécies obrigatoriamente homofermentativas, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus rhamnosus* entre as espécies facultativamente heterofermentativas e *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus parabuchneri* e *Lactobacillus brevis* entre as espécies obrigatoriamente heterofermentativa. As espécies de *Lactobacillus* iniciadoras comumente isoladas durante a maturação de

queijo são *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e também *Leuconostoc* spp., as mesmas que atuam como iniciadoras (SETTANNI e MOSCHETTI, 2010).

O desenvolvimento de BAL iniciadoras ou não em queijo de leite cru segue uma dinâmica geral. BAL iniciadoras são encontradas em grande número (cerca de  $10^8$  e  $10^9$  ufc.g<sup>-1</sup>) no início de maturação e diminuem regularmente por dois ou mais ciclos logarítmicos durante o envelhecimento. Pelo contrário, BAL não iniciadoras estão presentes em baixas concentrações após a prensagem e podem aumentar cerca de quatro e cinco ciclos logarítmicos em poucos meses (SETTANNI e MOSCHETTI, 2010).

As bactérias lácticas são os micro-organismos predominantes durante a produção e maturação de queijos, desenvolvendo um papel essencial nas características organolépticas dos queijos. O estudo da diversidade das bactérias lácticas envolvidas no processamento de queijos pode ser útil para: diferenciar os queijos; estabelecer os efeitos dos parâmetros tecnológicos sobre a especificidade da microbiota; desenvolver um sistema para estudo da dinâmica microbiana nas fermentações mistas; avaliar a contribuição real das diferentes espécies para a maturação dos queijos; obter informações sobre a diversidade. Tais informações poderiam permitir a seleção das linhagens adequadas para serem introduzidas como culturas iniciadoras em queijos com leite pasteurizado, de forma a reproduzir o sabor obtido em queijo fabricado com leite cru ou a acelerar a maturação do queijo (NESPOLO, 2009).

Um dos critérios que devem ser observados para seleção de culturas iniciadoras é o conhecimento do metabolismo fermentativo das BAL. O uso de culturas homofermentativas é mais adequado, pois BAL heterofermentativas produzem grandes quantidades de dióxido de carbono o que leva formação de furos de tamanhos diferentes no produto. Além disso, essas BAL podem produzir ácido acético que causam um sabor amargo nos produtos (AMMOR e MAYO, 2007).

O processo de maturação, o qual confere aos produtos fermentados, fatiabilidade, firmeza, textura, qualidade nutricional, cor e sabor, é caracterizado por um complexo de reações bioquímicas e físicas e mudanças microbiológicas e sensoriais associadas com o desenvolvimento e atividade metabólica da microbiota nativa. O processo espontâneo fermentativo envolve a participação de BAL. Estes

micro-organismos afetam a qualidade, segurança e formam compostos que conferem aroma e sabor (BONOMO et al., 2011).

Para fins industriais, o Brasil importa as culturas iniciadoras, os quais têm origem em habitats diferentes das condições ambientais de produção brasileira e do substrato, o que pode interferir na adaptação e desenvolvimento do micro-organismo. Por exemplo, culturas iniciadoras comerciais na Europa, principalmente produzidos em países do Norte Europeu, nem sempre são capazes de competir com a microbiota nativa presente em planta de processamento de embutidos cárneos no Sul da Europa, de forma que seu uso frequentemente resulta em perdas de características sensoriais desejáveis (SAMELIS et al., 1998).

O isolamento de BAL nativas e sua possível utilização para elaboração de fermentos lácteos para aplicação na produção de queijos pode constituir um diferencial para caracterização da identidade e qualidade de um produto de determinada região. Sabe-se que vários queijos artesanais têm sido premiados com o selo PDO (Protected Designation of Origin) e são considerados como marcadores culturais da sociedade, como produtos de arte, de acordo com o Regulamento 510/06 da União Europeia (FONTAN et al, 2001; RANDAZZO et al., 2009; RENNA et al., 2009). A denominação de queijo PDO assume que existe esta relação entre a área de origem, as técnicas tradicionais de processamento e os micro-organismos nativos presentes nas características específicas do produto final (RANDAZZO et al., 2009).

As bactérias lácticas produzem grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (LIMA et al., 2009). Além de serem apreciados por seu sabor e valor nutritivo, estes alimentos fermentados, representam um importante fator de desenvolvimento para as economias regionais no que diz respeito à agroindustrialização.

Determinadas bactérias lácticas utilizam, preferencialmente, a lactose como fonte de carbono, tendo como produtos de seu metabolismo, diversas substâncias antimicrobianas como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas, que atuam favoravelmente no produto alimentício ao qual foram adicionados, fazendo parte dos micro-organismos capazes de exercer efeitos benéficos ao hospedeiro. São denominados micro-organismos



probióticos, apresentando um amplo espectro de ação contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes (LIMA et al., 2009).

A capacidade de conservação, por parte das bactérias, que ocorrem naturalmente nos alimentos tem ganhado grandes aliados últimos anos, devido à demanda dos consumidores para o uso reduzido de conservantes químicos (VOULGARI et al., 2010). Bactérias ácido lácticas com atividade bacteriocinogênica são encontradas normalmente em leite e queijos ou adicionadas com intenção de bioconservação. Além das culturas propriamente ditas, as bacteriocinas purificadas podem ser adicionadas também a alimentos com os mesmos objetivos, mas para isso, tanto estas quanto aquelas, devem atingir o *status* GRAS (generally recognized as safe – usualmente reconhecido com seguro) (ORTOLANI, 2009).

Segundo de Martinis et al. (2001), a nisina é uma bacteriocina, usada em alimentos, em aproximadamente 50 países. É a bacteriocina mais estudada, pois é a única que possui GRAS *status* e aplicação na indústria alimentícia, principalmente na produção de queijos, contra o *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes* e *innocua* e várias outras bactérias Gram positivas (NESPOLO, 2009; ORTOLANI, 2009). Mas ainda, seu uso é limitado em derivados do leite, embora já se esteja explorando comercialmente esta substância.

A pesquisa de BAL bacteriocinogênicas se justifica pela importância em uma futura aplicação como bioconservadoras na indústria alimentícia, além de estarem naturalmente presentes em leite e derivados e apresentarem facilidade de adaptação a diversas condições ambientais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Amostras

Foram inicialmente, selecionados dez unidades de sistema familiar agrícola com produção mensal de leite em torno de 1500 a 3000 litros, de sete municípios da região Fronteira Noroeste. Estes foram indicados pela EMATER, por se tratarem de produtores que fabricam queijos com leite cru e sem adição de fermentos lácteos. A codificação das amostras pode ser visualizada na tab. 5.

Tabela 5: Codificação das amostras de leite e queijo da região Fronteira Noroeste do RS.

Produtor	Identificação
1	TP1
2	TP2
3	TC1
4	H1
5	MC1
6	MC2
7	TM1
8	N1
9	SR1
10	SR2

De cada unidade foram coletadas: 01 amostra de leite *in natura* e dois queijos do mesmo lote, pesando aproximadamente 500 g, com 01 dia de fabricação. Um dos queijos foi analisado imediatamente, caracterizando o Tempo 01 (T1). O outro queijo foi maturado, por sete dias, sob refrigeração a 7°C, caracterizando o Tempo 07 (T7). A escolha deste tempo de maturação foi determinada a partir de

entrevista com os produtores que informaram ser este o período no qual o queijo é maturado antes do consumo/comercialização, aproximadamente uma semana. De cada unidade de produção foram realizadas duas coletas, uma em janeiro de 2011, caracterizando o verão, com temperatura ambiente variando entre 25 e 40°C e outra em julho de 2011, caracterizando o inverno, com temperatura ambiente entre 2 a 15°C. No total, foram coletadas 20 amostras de leite e 40 amostras de queijo.

### **3.2 Isolamento de BAL**

Cada unidade amostral de 25 g para os queijos e 25 mL para o leite foi homogeneizada com 225 mL de peptona de caseína 0,1% (Acumedia) e as diluições decimais seriadas foram semeadas na superfície do ágar De Man, Rogosa e Sharpe - MRS (Oxoid). As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 35°C por 72h. Após este período, foram selecionadas cinco colônias de cada amostra pequenas, opacas e arredondadas, pois são características de bactérias ácido lácticas. Estas passaram por dois ciclos de purificação em ágar MRS em incubadora a 35°C por 72h em jarra de anaerobiose. Da placa contendo o isolado purificado, selecionou-se uma colônia isolada e cultivou-se em caldo MRS em incubadora a 35°C por 24h. O cultivo foi acrescentado de 20% de glicerol (v/v) e armazenado em ultrafreezer a temperatura de - 80°C para testes posteriores de coloração de GRAM, catalase e atividade antagônica. O isolamento das BAL foi realizado conforme descrito por Neto et al., 2005.

### **3.3 Detecção da atividade antagonista de BAL**

As BAL foram isoladas em ágar MRS sob atmosfera anaeróbica. Destas, foram coletadas cinco colônias de cada amostra aleatoriamente as quais foram purificadas em ágar MRS e avaliadas quanto à morfologia, coloração de GRAM e catalase. Posteriormente, estes isolados purificados, identificados como GRAM positivos e catalase negativa, foram transferidos para caldo MRS (Oxoid), onde foram cultivadas por 18 – 24h e, ainda com a cultura fresca, foi realizada a determinação da atividade antagonista.

A atividade antagonista das bactérias ácido lácticas isoladas foi realizada frente a linhagens de referência de *E. coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes*

ATCC 7466, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13076 e como controle positivo a linhagem de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. O teste de antagonismo e a leitura dos halos de inibição foram realizados de acordo com o teste da gota (*spot on the law*) proposto por Jacobsen et al. (1999). Para isto, retirou-se 5 µL do cultivo em caldo MRS e gotejou-se em placas contendo ágar MRS (Oxoid). Após absorção das gotas, as placas foram incubadas a 35°C em jarra de anaerobiose por 24h. Decorrido este período, cada placa recebeu uma sobre camada de 10 mL de ágar BHI (Oxoid) semissólido (0,8%) contendo aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/mL de cultura de referência previamente cultivada em caldo BHI por 24h e previamente quantificada por contagem em placas contendo ágar BHI. Após solidificar o meio, as placas foram incubadas a 35°C por 24h. O resultado positivo para atividade antagônica em relação à cultura de referência e controle positivo foi observado pela formação de halo de inibição (zonas de transparência ao redor das colônias de BAL). O diâmetro dos halos foi medido utilizando um paquímetro digital 200 MM-8” (Marca Marberg – China).

Para excluir o efeito do antagonismo gerado apenas pela produção do ácido láctico e iniciar a busca por BAL produtoras de bacteriocinas, realizou-se o teste da gota utilizando o sobrenadante da cultura bacteriana centrifugado por 15 min a 10.000 rpm a 4°C e neutralizado com hidróxido de sódio 3M ao invés da cultura propriamente dita. As placas foram incubadas aerobicamente por um período de 24 h e então se verificaram as zonas de transparência em torno dos isolados e mediram-se os diâmetros dos halos produzidos (SCHILLINGER e LUCKE, 1989).

### **3.4 Caracterização homo ou heterofermentativa dos isolados de BAL**

Os isolados que apresentaram halos de inibição no teste da gota foram submetidos a um teste para verificar característica homo ou heterofermentativa. A capacidade de fermentar glicose com produção de gás foi determinada em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan e caldo MRS suplementado com 3% de glicose. A incubação se deu a 37°C por 48h (LIMA et al., 2009). As culturas de referência, *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 foram usadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Os tubos nos quais os isolados produziram turvação do meio e gás, foram caracterizados como

heterofermentativos e os que turvaram o meio e não produziram gás, foram assinalados como homo fermentativos.

### **3.5 Caracterização da qualidade microbiológica e físico-química das amostras de leite *in natura* e queijos coloniais utilizados no isolamento de BAL**

#### **3.5.1 Caracterização microbiológica**

As análises microbiológicas foram realizadas nas amostras de leite e queijos coletados segundo recomendação da APHA (2002) para coliformes totais, coliformes termotolerantes, Estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, bactérias aeróbias mesófilas e BAL.

##### **3.5.1.1 Coliformes totais e termotolerantes**

A determinação foi realizada utilizando-se a técnica do Número Mais Provável -NMP - utilizando séries de três tubos. Cada unidade amostral de 25 g ou 25 mL foi homogeneizada com 225 mL de peptona de caseína 0,1% (Acumedia) e as diluições decimais seriadas foram inoculadas em Caldo Lauryl Sulfate Tryptose - LST (Oxoid). As culturas dos tubos com resultados presuntivos positivos (produção de gás) após 24 e 48h a 35°C foram transferidas para caldo Verde Brilhante - VB (Oxoid) e incubados a 35°C em incubadora por 24 e 48h para confirmação da presença de coliformes totais e em caldo *Escherichia coli* - EC (Oxoid) e incubados em banho-maria a 45°C por 24°C para confirmação da presença de coliformes termotolerantes. Os resultados foram expressos como NMP.mL<sup>-1</sup> ou g de amostra.

##### **3.5.1.2 Estafilococos coagulase positiva**

Cada unidade amostral de 25 g ou 25 mL foi homogeneizada com 225 mL de peptona de caseína 0,1% (Acumedia) e as diluições decimais seriadas foram semeadas na superfície do ágar Baird Parker - BP (Oxoid) e as placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48h. As colônias suspeitas de cada amostra que se apresentavam negras com um halo de precipitação e um de transparência ao redor da colônia, foram selecionadas e transferidas para Caldo Infusão Cérebro Coração - BHI (Oxoid), e incubadas a 35°C por 24h para confirmação, através do teste de

produção de coagulase livre. Resultados foram expressos em UFC.mL<sup>-1</sup> ou g de amostra.

### 3.5.1.3 *Salmonella* spp.

Vinte e cinco gramas ou 25 mL de amostra foram transferidas para frascos contendo 225 mL em água peptonada tamponada (Acumedia) e incubados a 35°C durante 18 à 24h. Posteriormente, foi realizado o enriquecimento seletivo em caldo Rappaport Vassiliadis - RV (Oxoid), incubados a 42°C durante 24h. O plaqueamento diferencial foi realizado por transferência com alça de platina do caldo seletivo, para superfície do ágar Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) e ágar Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose – BPLS (Oxoid) e incubados a 35°C/24h. As colônias típicas, incolores ou de coloração rosa translúcido ou ligeiramente opacas em ágar BPLS e vermelhas translúcidas ou com precipitado negro em ágar XLD, foram transferidas para caldo uréia, para ágar Tríplice Açúcar e Ferro - TSI (Oxoid) e ágar Lisina e Ferro - LIA (Oxoid) e incubadas a 35°C por 24 h. As culturas com reações típicas em caldo uréia (não produção de uréia), TSI (amarelo na base, com ou sem produção de gás, vermelho ou inalterado no bisel e com produção de H<sub>2</sub>S) e LIA (violeta na base e no bisel com produção de H<sub>2</sub>S) foram submetidas ao teste sorológico. Os resultados foram expressos como presença/ausência de *Salmonella* spp. por 25g ou mL de amostra.

### 3.5.1.4 *Listeria monocytogenes*

As análises foram realizadas utilizando kit de determinação rápida Lateral Flow System *Listeria* (DuPont™). Cada 25 g ou 25 mL de amostra foram homogeneizadas com 225 mL de caldo base enriquecido com suplemento para *Listeria*. As amostras foram incubadas a 30°C por 40h. Após este tempo, foram transferidos 400 µL do cultivo para um tubo de ensaio e ferveu-se por aproximadamente por 15 minutos. Então, inseriu-se a fita indicadora e após 10 minutos observaram-se as marcas indicadoras. Uma marca indica teste negativo, duas marcas indicam presença de *Listeria* spp. As amostras que apresentaram indicativo de *Listeria* spp. foram submetidas a testes bioquímicos através do kit API *Listeria* para confirmar a presença de *Listeria monocytogenes*. Os resultados foram

expressos como presença/ausência de *Listeria monocytogenes* por 25g ou mL de amostra.

#### **3.5.1.5 Bactérias mesófilas aeróbias**

Cada unidade amostral de 25 g ou 25 mL foi homogeneizada com 225 mL de peptona de caseína 0,1% (Acumedia) e as diluições decimais seriadas foram semeadas na superfície do ágar Padrão para Contagem - PCA (Oxoid) e as placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48h. Após este período realizou-se a contagem de todas as colônias presentes nas placas e os resultados foram expressos em UFC.mL<sup>-1</sup> ou g de amostra.

#### **3.5.1.6 Bactérias ácido lácticas**

Cada unidade amostral de 25 g ou 25 mL foi homogeneizada com 225 mL de peptona de caseína 0,1% (Acumedia) e as diluições decimais seriadas foram semeadas na superfície do ágar De Man, Rogosa e Sharpe - MRS (Oxoid). As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 35°C por 72h. Após este período realizou-se a contagem de todas as colônias obtidas nas placas. Os resultados foram expressos em UFC.mL<sup>-1</sup> ou g de amostra.

### **3.5.2 Caracterização físico-química**

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com AOAC (2002) para pH, acidez total, umidade, gordura total, proteína bruta, teor de sal (NaCl) e atividade de água.

#### **3.5.2.1 pH**

Utilizou-se um equipamento eletrônico, medidor de pH da marca Digimed, previamente calibrado.

### **3.5.2.2 Acidez total**

Fundamenta-se na neutralização, até o ponto de equivalência, com solução padrão de hidróxido de sódio, utilizando indicador fenolftaleína para verificação do ponto final da titulação. Os resultados forma expressos em g de ácido láctico por 100 g/mL de amostra.

### **3.5.2.3 Umidade**

O método recomendado se baseia na perda de água e substâncias voláteis a temperatura de 105°C em estufa controlada até peso constante. A porcentagem de umidade foi calculada por diferença de peso.

### **3.5.2.4 Gorduras totais**

Para determinação de gorduras totais no leite foi utilizado o método de Gerber. Este se fundamenta no ataque seletivo da matéria orgânica por meio do ácido sulfúrico, com exceção da gordura, que é separada por centrifugação, auxiliada pelo álcool amílico que modifica a tensão superficial. Utilizou-se o butirômetro de Gerber para esta determinação. A leitura foi realizada diretamente na escala do butirômetro e o resultado expresso em porcentagem.

O método para determinação de gorduras totais em queijos consistiu inicialmente em uma hidrólise ácida da amostra, a fim de minimizar interferentes como proteínas e minerais. Em seguida transferiu-se para tubos de Monjonier juntando éter etílico e éter de petróleo. Esta mistura de solventes arrastou a gordura presente na amostra. A seguir, a mistura de solvente e gordura foi transferida para um béquer previamente tarado, o solvente evaporado em estufa e o teor de gordura calculada por diferença de peso.

### **3.5.2.5 Proteína bruta**

O método de Kjeldahl baseou-se na extração do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio por digestão ácida em aparelho digestor e em nitrogênio amoniacal por destilação em meio básico em aparelho destilador. A amônia residual



foi titulada com solução de HCl padronizada. A conversão do nitrogênio para conteúdo de proteína foi realizada através do fator de conversão 6,38 para proteínas lácteas.

#### **3.5.2.6 Teor de sal (NaCl)**

A técnica foi baseada no método de Mohr, no qual a amostra previamente carbonizada em mufla a 550°C e dissolvida em ácido nítrico a quente, é titulada com nitrato de prata, usando indicador cromato de potássio até formação de um precipitado vermelho pouco solúvel (cromato de prata). Os resultados foram expressos em porcentagem de NaCl.

#### **3.5.2.7 Atividade de água**

A determinação da atividade de água ( $a_w$ ) foi realizada através de equipamento medidor de atividade de água marca TESTO modelo 650.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento de BAL

Durante os dois períodos de coleta de amostras de leite *in natura* e queijos coloniais (janeiro e julho), foram selecionadas cento e doze colônias características de BAL das placas de MRS utilizadas para o isolamento. Estas foram submetidas à caracterização morfológica e teste da catalase. Após realização destes testes, 54,46% (62) dos isolados foram positivos para coloração de GRAM e negativos para catalase. Observou-se então, que destes, 25,89% (20) apresentaram morfologia de bacilos e 37,49% (42) de cocos. Os 44,64% (50) restantes dos isolados não se caracterizaram como BAL por não apresentarem coloração de GRAM positiva ou catalase negativa (tab. 6).

Tabela 6: Morfologia celular, coloração de GRAM e teste de catalase de bactérias isoladas de amostras de leite e queijos coloniais produzidos na região Fronteira Noroeste do RS.

BAL	Morfologia	GRAM	Catalase	BAL	Morfologia	GRAM	Catalase	BAL	Morfologia	GRAM	Catalase
1	Coco	+	-	39	Coco	-	-	76	Coco	+	-
2	Coco	+	-	40	Coco	+	-	77	coco	-	-
3	Bacilo	-	-	41	Coco	+	-	78	coco	+	-
4	Bacilo	-	-	42	Coco	-	-	79	Coco	+	-
5	Bacilo	+	-	43	Coco	-	-	80	Coco	+	-
6	Coco	+	-	44	Coco	-	-	81	coco	-	-
7	Bacilo	-	-	45	Coco	+	-	82	coco	+	-
8	Bacilo	+	-	46	Coco	-	-	83	Bacilo	+	-
9	Bacilo	+	-	47	Coco	+	-	84	Bacilo	+	-
10	Bacilo	+	-	48	Coco	-	-	85	coco	+	-
11	Bacilo	+	-	49	Coco	-	-	86	coco	-	-
12	Bacilo	-	-	50	Coco	-	-	87	coco	-	-
13	Bacilo	+	-	51	Coco	+	-	88	coco	+	-
14	Bacilo	-	-	52	Coco	+	-	89	coco	-	-

BAL	Morfologia	GRAM	Catalase	BAL	Morfologia	GRAM	Catalase	BAL	Morfologia	GRAM	Catalase
15	Bacilo	+	-	53	Coco	-	-	90	coco	+	-
16	Coco	+	-	54	Bacilo	-	-	91	coco bacilo	+	-
17	Bacilo	-	-	155	Coco bacilo	+	-	92	coco	-	-
18	Bacilo	+	-	56	Coco bacilo	+	-	93	coco	-	-
19	Bacilo	+	-	57	Coco	+	-	94	coco	+	-
20	Bacilo	-	-	58	Coco	-	-	95	coco	+	-
21	Bacilo	+	-	59	Coco bacilo	-	-	96	coco bacilo	+	-
22	Coco	+	-	60	Coco	-	-	97	coco	+	-
23	Bacilo	-	-	61	Coco	-	-	98	coco bacilo	+	-
24	Bacilo	+	-	62	Coco	-	-	99	coco bacilo	+	-
25	Bacilo	+	-	63	Coco	-	-	100	coco	+	-
26	Coco bacilo	+	-	64	Coco bacilo	-	-	101	coco	-	-
27	Bacilo	+	-	65	Coco	+	-	102	coco	+	-
28	Bacilo	+	-	66	Coco bacilo	+	-	103	coco	+	-
29	Bacilo	+	-	67	Coco	-	-	104	coco bacilo	+	-
30	Bacilo	+	-	68	Coco	-	-	105	coco	-	-
31	Bacilo	+	-	69	Bacilo	-	-	106	coco	-	-
32	Coco	+	-	70	Coco	-	-	107	Bacilo	+	+
33	Bacilo	+	-	71	Coco	+	-	108	Coco bacilo	+	+
34	Coco	+	-	72	Coco	-	-	109	Coco bacilo	+	+
35	Coco	+	-	73	Coco	-	-	110	Bacilo	-	+
36	Coco	+	-	74	Coco	+	-	111	Coco	+	+
37	Coco	-	+	75	Coco	+	+	112	coco	-	+
38	Coco	+	+								

A microbiota nativa encontrada em produtos provenientes de fermentação natural de alimentos de origem animal é bastante diversificada. Os pesquisadores citados a seguir demonstram que diferentes gêneros de BAL podem habitar certas regiões.

Ao estudar leite cru e queijos elaborados a partir deste, provenientes da região de Viçosa/MG, Moraes et al. (2010) isolaram culturas características de BAL e obtiveram predominantemente cocos GRAM positivos e catalase negativa de suas amostras. Lima et al. (2009) avaliaram a presença de BAL em queijos Minas artesanais e as espécies mais encontradas em sua pesquisa foram *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae*. Andrade (2009) estudou amostras do queijo da Serra da Canastra e isolou bactérias do gênero enterococos constituintes daquela microbiota e de um total de 181 isolados com características de enterococos, 81,2% (147/181) foram confirmados para o gênero através dos testes: coloração de GRAM, catalase, crescimento em pH 9,6 e em temperatura 45°C e 10°C e crescimento na presença de bile com hidrólise da esculina. Em queijos artesanais da Serra Gaúcha, analisados por Souza et al.

(2003), de 484 isolados, 431 foram caracterizados como BAL. *Lactobacillus* foi o gênero mais abundante, seguidos de *Enterococcus* e *Lactococcus*.

Outros autores retratam isolamento de BAL nativas de diversos produtos fermentados. Oliveira et al. (2008) analisaram amostras de carne embalada a vácuo de diferentes mercados de Belo Horizonte/MG e observaram que todos isolados obtidos a partir do ágar MRS foram considerados BAL, pois apresentaram reação GRAM positiva, ausência de motilidade, catalase negativa e não formação de esporos. Ainda, encontraram tanto bacilos como cocos em seus isolados. Castro et al. (2011) pesquisaram a presença de BAL em produtos secos fermentados originários da província de Chaco na Argentina e isolou 141 linhagens, todas GRAM positivas, catalase e oxidase negativas e em geral na forma de bacilos. O autor sugeriu a partir destas características que os isolados são grupos de BAL.

Sawitzki et al. (2007) encontraram *Lactobacillus* como espécies dominantes da microbiota de linguiças fermentadas produzidas artesanalmente na região Fronteira Noroeste do RS. Estes também encontraram em suas amostras *Lactococcus lactis*, espécie não característica neste tipo de produto e sim de derivados lácteos. Isto indica que possa ter havido uma contaminação cruzada na planta de processamento, por ser a mesma usada para produção de derivados lácteos. Podemos visualizar através dos dados demonstrados na tab. 6, que a maioria dos isolados analisados neste estudo, pertence aos gêneros *Lactococcus/Enterococcus*, caracterizando mais uma vez a diversidade de BAL presentes em cada região.

## **4.2 Detecção da atividade antagonista dos isolados de BAL**

Dos isolados, 54,46% (62) foram submetidos ao teste de antagonismo. Destes, 33,87% (21) desenvolveram halos de inibição contra todos os patogênicos testados. Os diâmetros dos halos podem ser observados na tab. 7.

Tabela 7: Diâmetros dos halos de inibição apresentados no teste da gota utilizando o sobrenadante da cultura de bactérias ácido lácticas nativas isoladas de amostras de leite e queijos coloniais da região Fronteira Noroeste do RS frente a patógenos de referência.

<b>Isolado</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>S. Typhimurium</i></b>	<b><i>L.monocytogenes</i></b>
AC4	18,18 mm	15,83 mm	15,12 mm	30,13 mm
J4	22,77 mm	19,80 mm	19,50 mm	26,88 mm
R4	21,81 mm	20,41 mm	18,81 mm	29,37 mm
R1	20,19 mm	17,92 mm	16,52 mm	23,64 mm
R3	23,83 mm	19,01 mm	20,26 mm	21,76 mm
Y5	28,23 mm	26,70 mm	26,06 mm	29,57 mm
F4	22,70 mm	16,86 mm	21,94 mm	25,36 mm
E4	25,79 mm	22,17 mm	27,17 mm	29,68 mm
R2	21,72 mm	16,48 mm	20,83 mm	24,15 mm
U4	23,13 mm	20,10 mm	20,74 mm	24,49 mm
P2	23,45 mm	19,89 mm	20,77 mm	21,97 mm
S4	22,32 mm	17,08 mm	18,17 mm	21,49 mm
C4	18,75 mm	18,07 mm	17,54 mm	21,85 mm
U3	21,58 mm	22,24 mm	20,28 mm	27,45 mm
O4	22,94 mm	26,15 mm	29,17 mm	28,39 mm
U5	22,40 mm	20,87 mm	19,66 mm	22,75 mm
B6	28,47 mm	30,62 mm	36,98 mm	20,40 mm
I6	20,97 mm	24,12 mm	25,23 mm	22,72 mm
R7	22,58 mm	19,75 mm	24,70 mm	22,20 mm
AB7	34,88 mm	26,78 mm	29,03 mm	18,50 mm
BB9	28,68 mm	29,46 mm	28,53 mm	20,57 mm

A ação antagonista de BAL nativas já foi descrita por diversos autores (JONES et al., 2008; NERO et al., 2008; ORTOLANI, 2009; SAWITZKI et al., 2009; SCHILLINGER e LUCKE, 1989), principalmente em relação a patógenos GRAM positivos. A presença da dupla camada lipídica (membrana externa) de bactérias GRAM negativas impede a interação das substâncias antagonistas específicas, como bacteriocinas, com a parede e a membrana plasmática. Porém, outros trabalhos demonstram a existência de BAL nativas com potencial antagônico também contra patógenos GRAM negativos (MEIRA et al, 2010; NERO et al, 2008). No presente estudo, obteve-se atividade antagônica por parte dos isolados de BAL tanto para patógenos GRAM positivos como negativos, resultado considerado satisfatório já que atingiu um dos objetivos desta pesquisa.

Um isolado com atividade antagonista foi proveniente da amostra de leite coletada em janeiro do produtor 1. Dos isolados provenientes de queijos T1 das amostras de janeiro, quatro são do produtor 5, três do produtor 6, um do produtor 2 e um do produtor 8. No total, seis isolados (uma de cada produtor - 1, 2, 5, 7, 8 e 9) obtidos do queijo T7 em janeiro possuem atividade antagonista. Os isolados

antagonistas das amostras coletadas em julho são provenientes dos queijos T1 e T7. Do queijo T1, os produtores 1, 5, 9 e 10 contribuíram com um isolado cada um. Os isolados do queijo T7 foram obtidos dos produtores 2 e 3, um de cada.

O maior número de isolados com atividade antagonista foi encontrado nas amostras de queijos T1 (13 isolados). Possivelmente pelas condições ambientais serem mais favoráveis ao desenvolvimento destas. Isto pode ter ocorrido porque houve uma retenção e concentração de nutrientes e bactérias pela expulsão do soro da coalhada e esta massa ainda manteve a aw desejada para o desenvolvimento e multiplicação destas. No leite a quantidade de nutrientes é menor e no queijo T7 a aw é mais baixa em relação ao queijo T1, isto pode ser um dos motivos pelos quais se obteve um número menor de BAL com atividade antagonista nestas amostras. Ortolani (2009), diferentemente deste estudo, encontrou um número maior de BAL antagonistas em amostras de leite cru e não em queijos elaborados com o próprio.

Obteve-se um número maior de isolados antagonistas (16) nas amostras coletadas no mês de janeiro (verão). Isto possivelmente ocorreu, pois a aw destas foi maior neste período em relação ao mês de julho (inverno) e a concentração de sal foi menor, favorecendo o desenvolvimento das BAL. Podemos considerar o número total de isolados com atividade antagonista encontrado como um bom resultado, pois a maioria dos autores citados a seguir encontraram percentuais semelhantes ou menores do que os observados neste estudo.

Diversos pesquisadores observaram atividade antagonista de BAL nativas procedentes de diversos produtos fermentados no Brasil e no mundo. Ortolani (2009) empregou metodologia para determinação de atividade antagônica que permitiu a identificação de BAL nativas de leite cru e queijo minas frescal com capacidade de produzir diversas substâncias antimicrobianas. Foram observadas altas frequências de BAL com potencial antagonista principalmente frente à *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus sakei*. A autora não verificou antagonismo contra *Salmonella* Tiphymurium. Associados as altas contagens de BAL no leite e queijos analisados, esses resultados indicam a capacidade de interferência das BAL nativas sobre micro-organismos GRAM positivos analisados.

Nero et al. (2008) verificaram o potencial antagônico de 360 colônias de BAL isoladas de leite cru e observaram que 25,3% mostraram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e apenas 9,2% demonstraram antagonismo contra *Salmonella* Enteritidis. Os autores sugerem que alimentos com altas populações

microbianas nativas interferem diretamente no crescimento e desenvolvimento de patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., pois estes precisam de condições específicas para crescer.

Neto et al. (2005) estudaram quatro linhagens de *Lactobacillus* spp. e duas linhagens de *Lactococcus* spp. isoladas de queijos-coalho artesanal e industrial e as testou quanto à atividade antimicrobiana. Observaram atividade antagonista dessas bactérias ácido lácticas frente a elas, a outras bactérias ácido lácticas isoladas de queijo-coalho, aos patógenos isolados dos mesmos queijos e a cepas de patógenos de referência, verificando diferença ( $P < 0,05$ ) entre as atividades antagonistas, exceto quando as próprias bactérias ácido lácticas foram utilizadas como reveladoras. As linhagens de *Lactobacillus* spp. estudadas por aqueles apresentaram as atividades antagonistas com maiores halos de inibição.

Hajikhani et al. (2007) selecionaram doze linhagens de enterococos de amostras de queijo branco obtido a partir de diversas regiões da Turquia para determinar a sua atividade antimicrobiana contra alguns patógenos de origem alimentar GRAM positivos e GRAM negativos e bactérias contaminantes, e testá-las também contra si e contra BAL, incluindo algumas espécies de *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. A atividade antimicrobiana foi confirmada para as 12 linhagens, sendo seis *Enterococcus faecium*, dois *Enterococcus faecalis* e quatro *Enterococcus durans*. Agentes antimicrobianos produzidos por estes enterococos apresentaram um espectro de atividade, que é principalmente dirigida contra patógenos, especialmente *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, alguns outros *Bacillus* spp. e também alguns enterococos.

Meira et al. (2010) avaliaram seis isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite e queijo de ovelha e testaram em relação à atividade antagonística contra seis bactérias patogênicas – *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium – e também contra a bactéria láctica *Lactobacillus fermentum*. Os resultados da atividade antagonística pelo método *spot on the lawn*, evidenciam que todas as linhagens de BAL exibiram zonas de inibição frente às bactérias indicadoras. Quando os autores testaram o caráter antagonístico dos sobrenadantes das culturas, estes não foram capazes de inibir nenhum dos patógenos testados tanto pelo método *spot on the lawn* quanto pelo método de difusão em ágar. Somente quando empregado o método em placa de micro titulação os

sobrenadantes ácidos das linhagens apresentaram atividade antimicrobiana contra os micro-organismos patogênicos. Esses resultados, diferentemente dos encontrados neste trabalho, sugerem que a atividade antagonística dos *Lactobacillus* é principalmente devido ao ácido láctico produzido pelas bactérias ácido lácticas juntamente com baixo pH (em torno de 4) alcançado pelas linhagens no meio de cultura.

Sawitzki et al. (2009) testaram linhagens de *Lactobacillus plantarum* isoladas de linguiças artesanais fermentadas e verificaram que sete cepas exibiram atividade antagonística contra *Listeria monocytogenes* NTC 098630, quatro contra *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 e *Staphylococcus xilosus* ATCC 29971, três inibiram apenas *Staphylococcus xilosus* ATCC 29971 e nenhuma inibiu *E. coli* ATCC 25922. Jones et al. (2008) isolaram de carnes provenientes da Nova Zelândia 181 colônias presuntivas de BAL e submeteram-nas aos teste de GRAM e catalase. Destes, 75 isolados foram capazes de produzir atividade antagonística sobre uma ou mais estirpes de patógenos testados. Castro et al. (2011) isolaram BAL de linguiças artesanais secas provenientes da região norte-oriental do Chaco, Argentina. Entre 141 isolados, 27 (19,15%) apresentaram atividade antimicrobiana contra *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* ou *Brochothrix* spp. Um isolado, identificado como *L. curvatus / sakei*, produziu substâncias semelhantes à bacteriocinas.

#### **4.3 Caracterização homo ou heterofermentativa dos isolados de BAL**

Os 33,87% (21) dos isolados de BAL provenientes de leite e queijos coloniais da região Fronteira Noroeste do RS, os quais apresentaram atividade antagonista frente a patógenos de referência, foram submetidos ao teste de fermentação da glicose para determinação de seu perfil fermentativo. Este teste é importante quando se deseja selecionar BAL para uso como culturas iniciadoras.

Dos isolados testados, 100% de BAL não produziram gás a partir da glicose, o que nos leva a classificá-las como homofermentativas. Esse resultado é positivo visto que BAL homofermentativas são desejáveis para utilização como culturas iniciadoras quando o objetivo é a produção somente de ácido láctico evitando



problemas de *flavor* decorrentes da formação de ácido acético e características indesejáveis nos queijos como cavidades causadas pela produção de CO<sub>2</sub>.

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

#### **4.4 Caracterização da qualidade microbiológica e físico-química amostras de leite *in natura* e queijos coloniais**

##### **4.4.1 Caracterização microbiológica**

Os resultados das análises da caracterização microbiológica do leite *in natura*, queijo com um dia (T1) de produção e queijo com sete (T7) dias de maturação podem ser observados na tab. 8.

Tabela 8: Caracterização microbiológica de leite<sup>1</sup> e queijos em dois tempos de maturação<sup>1</sup> da região Fronteira Noroeste do estado do RS durante os meses de janeiro<sup>1</sup> e julho<sup>1</sup>.

Micro-organismo	Período de coleta			
		Leite	Queijo T1*	Queijo T7**
Coliformes totais (log NMP.mL <sup>-1</sup> ou g)	Janeiro	2,65 ± 0,67 <sup>bB</sup>	2,93 ± 0,22 <sup>aB</sup>	2,94 ± 0,19 <sup>aB</sup>
	Julho	2,96 ± 0,11 <sup>bA</sup>	> 3,0 <sup>aA</sup>	> 3,0 <sup>aA</sup>
Coliformes termotolerantes (log NMP.mL <sup>-1</sup> ou g)	Janeiro	1,4 ± 1,11 <sup>cA</sup>	2,44 ± 0,75 <sup>aA</sup>	2,21 ± 0,86 <sup>bA</sup>
	Julho	0,33 ± 0,51 <sup>cB</sup>	2,43 ± 0,86 <sup>aA</sup>	2,11 ± 0,91 <sup>bB</sup>
Estafilococos coagulase positiva (log UFC.mL <sup>-1</sup> ou g)	Janeiro	1,6 ± 2,08 <sup>cA</sup>	2,19 ± 2,94 <sup>bA</sup>	1,72 ± 2,84 <sup>aA</sup>
	Julho	ND <sup>bB</sup>	ND <sup>bB</sup>	1,18 ± 2,04 <sup>aB</sup>
Contagem total de mesófilos aeróbios (log UFC.mL <sup>-1</sup> ou g)	Janeiro	6,16 ± 0,59 <sup>cB</sup>	7,3 ± 0,43 <sup>aB</sup>	7,13 ± 0,81 <sup>bB</sup>
	Julho	6,51 ± 1,05 <sup>cA</sup>	7,53 ± 0,65 <sup>bA</sup>	7,95 ± 0,67 <sup>aA</sup>
<i>Escherichia coli</i> (log UFC.mL <sup>-1</sup> ou g)	Janeiro	2,66 ± 1,68 <sup>cA</sup>	3,26 ± 2,94 <sup>aB</sup>	3 ± 2,73 <sup>bB</sup>
	Julho	3,63 ± 1,73 <sup>cB</sup>	4,67 ± 1,97 <sup>bA</sup>	5,82 ± 1,55 <sup>aA</sup>
Contagem de bactérias ácido lácticas (log UFC.mL <sup>-1</sup> ou g)	Janeiro	5,93 ± 0,76 <sup>cB</sup>	8,14 ± 0,6 <sup>bA</sup>	8,33 ± 0,45 <sup>aA</sup>
	Julho	5,98 ± 1,52 <sup>cA</sup>	7,44 ± 0,74 <sup>bB</sup>	7,92 ± 0,82 <sup>aB</sup>
<i>Salmonella</i> spp. (por 25g)	Janeiro	Ausência	Ausência	Ausência
	Julho	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Listeria monocytogenes</i> (por 25g)	Janeiro	Ausência	Ausência	Ausência
	Julho	Ausência	Ausência	Ausência

<sup>1</sup> Os dados são as médias e desvios-padrões das amostras durante as duas coletas;

<sup>a-c</sup> As médias seguidas de uma mesma letra na linha, para cada variável, não diferem entre si a P < 0,05 de significância pelo Teste de Tukey;

<sup>A-B</sup> As médias seguidas de uma mesma letra na coluna, para cada variável, não diferem entre si a P < 0,05 de significância pelo Teste de Tukey;

\* T1: Queijo com um dia de maturação;

\*\* T7: Queijo com sete dias de maturação;

ND: Não detectado.

A qualidade microbiológica de leite e derivados é usualmente determinada pela população estimada de micro-organismos mesófilos aeróbios. Quando presentes em quantidades maiores que 5 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup> indicam deficiências higiênicas na produção enquanto concentrações menores que 4 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup> indicam boas práticas de higiene (ORTOLANI, 2009). Observando a tab. 8, podemos verificar a deficitária condição higiênico-sanitária das amostras de leite e queijos coletados. Isso fica evidente observando que a população estimada de micro-organismos mesófilos aeróbios (CPP) do leite em relação aos queijos nos dois tempos de maturação aumentou significativamente tanto nas amostras coletadas em janeiro como em julho. As contagens variaram entre os produtores de 5,1 a 7,2 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup> para o leite em janeiro e de 3,8 a 7,4 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup> em julho.

Para o queijo T1, as populações de CPP encontradas variaram de 6,6 a 8,1  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> em janeiro e de 6,4 a 8,41  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> em julho. No queijo T7 a população microbiana se alternou entre 5,4 e 7,8  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> em janeiro e de 6,5 a 8,7  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> em julho. Observou-se, também, que houve diferença significativa na média de CPP entre os dois períodos de coleta. De acordo com a IN n<sup>o</sup> 62, de 2011, do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002), que regulamenta os padrões para o leite cru, destinado à obtenção de leite pasteurizado para consumo humano direto ou para transformação em derivados lácteos deve apresentar CPP de no máximo 6  $\log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>, os resultados obtidos evidenciam um leite em condições inadequadas de higiene, pois a média demonstra que o leite utilizado para produção dos queijos estão fora do valor estipulado pela legislação brasileira. Em julho, apenas 10% das amostras de leite estavam dentro do padrão para CPP e janeiro, 30%.

O grupo coliforme também é um agente indicativo das condições higiênico-sanitárias dos produtos lácteos. Populações maiores que 2  $\log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> são indicativos de más práticas de higiene e contaminação ambiental (ORTOLANI, 2009). A tab. 8 nos mostra que tanto as amostras de leite como as de queijos apresentaram em média concentrações maiores que 2  $\log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> ou g de coliformes totais e termotolerantes, indicando mais uma vez, as deficitárias condições sanitárias das amostras. Nesta pesquisa, os números de coliformes totais variaram entre os produtores de 1,2 a > 3,0  $\log_{10}$  NMP.mL<sup>-1</sup> para o leite em janeiro e de 2,66 a > 3,0  $\log_{10}$  NMP.mL<sup>-1</sup> em julho. Para o queijo T1, as populações encontradas variaram de 2,3 a > 3,0  $\log_{10}$  NMP.g<sup>-1</sup> em janeiro e em julho todas amostras apresentaram níveis populacionais > 3,0  $\log_{10}$  NMP.g<sup>-1</sup>. No queijo T7 os níveis de coliformes totais se alternaram entre 2,4 a > 3,0  $\log_{10}$  NMP.g<sup>-1</sup> em janeiro e em julho todas amostras apresentaram níveis populacionais > 3,0  $\log_{10}$  NMP.g<sup>-1</sup>. Ainda na tab. 8, visualiza-se que o número de coliformes totais, em média, se alterou significativamente do leite para os queijos, mas não entre os tempos de maturação dos queijos tanto no verão como no inverno. O período do ano influenciou nas contagens das populações de coliformes totais das amostras analisadas, sendo o maior número encontrado em julho.

Neste estudo, os números de coliformes termotolerantes variaram entre os produtores de < 0,3 a > 3,0  $\log_{10}$  NMP.mL<sup>-1</sup> para o leite em janeiro e de < 0,3 a 1,38  $\log_{10}$  NMP.mL<sup>-1</sup> em julho. Para o queijo T1, as populações encontradas variaram de

1,3 a  $> 3,0 \log_{10} \text{NMP.g}^{-1}$  em janeiro e de 0,6 a  $> 3,0 \log_{10} \text{NMP.g}^{-1}$  em julho. No queijo T7 os níveis de coliformes termotolerantes se alternaram entre 0,6 a  $> 3,0 \log_{10} \text{NMP.g}^{-1}$  tanto em janeiro como em julho. Ao observar a tab. 8 referente à média de coliformes termotolerantes, visualiza-se nos dois períodos de coleta que houve um aumento significativo do leite para o queijo T1 nestas populações. Observa-se ainda, uma redução significativa do número de coliformes termotolerantes do queijo T1 para o queijo T7 tanto em janeiro como em julho. O período de coleta apresentou influência significativa no número de coliformes termotolerantes do leite e queijo T7. O mesmo não foi observado para o queijo T1. O número de coliformes, tanto totais com termotolerantes e seu aumento do leite para o queijo T1, denotam ter havido a multiplicação destes micro-organismos ou ainda, contaminação dos queijos durante a sua fabricação, possivelmente por falta de condições higiênico-sanitárias satisfatórias. O Ministério da Saúde, através da RDC 12 de 2001, preconiza um valor máximo de  $3,7 \log_{10} \text{NMP.g}^{-1}$  de coliformes termotolerantes para queijos de alta umidade. Em janeiro, 60% das amostras de queijo do T1 e 90% do T7 estavam fora do padrão estabelecido pela legislação brasileira. Em julho, 60% das amostras de queijo T1 e 20% das amostras de queijo do T7 se encontravam em desacordo com o padrão estabelecido.

A determinação de *Estafilococos* coagulase positiva demonstrou que as contagens deste micro-organismo variaram entre os produtores de  $< 2,0$  a  $4,3 \log_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$  para o leite em janeiro e em julho não foi observada sua presença. Para o queijo T1, as populações encontradas variaram de  $< 2,0$  a  $6,8 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$  em janeiro e em julho não foi observada a presença deste. No queijo T7 os níveis de *Estafilococos* coagulase positiva se alternaram entre  $< 2,0$  a  $7,2 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$  em janeiro e de  $< 2,0$  a  $5,52 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$  em julho. Ainda, na tab. 8, o número de *Estafilococos* coagulase positiva em sua média, sofreu aumento significativo do leite para os dois tempos de maturação dos queijos em janeiro. Em julho, este micro-organismo não foi detectado no leite e no queijo T1, mas ele foi encontrado no queijo T7, indicando contaminação pelo manipulador durante o processo de lavagem e viragem dos queijos no período de maturação. Baixas contagens de *Estafilococos* coagulase positiva não comprometem a qualidade sanitária do alimento. Quando as contagens de *estafilococos* ultrapassam  $5 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$  ou mL, as enterotoxinas *estafilocócicas* são produzidas e são estas as responsáveis pelo processo de intoxicação alimentar causado por *Estafilococos* coagulase positiva. A produção de

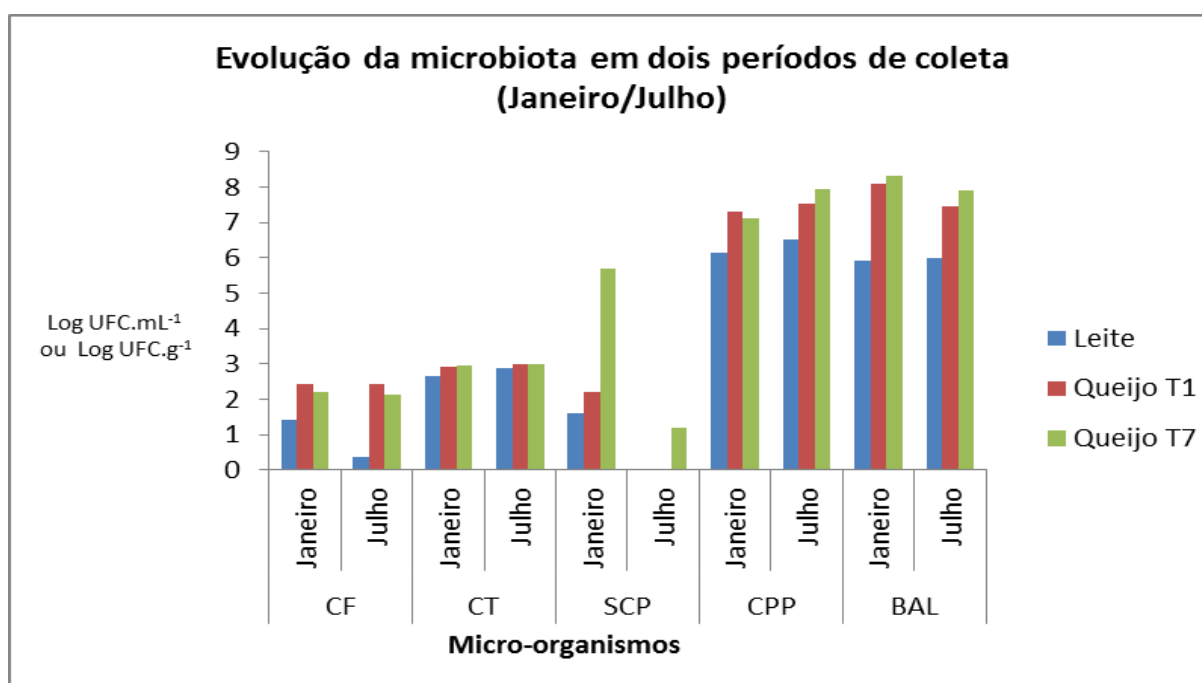
enterotoxinas é influenciada pela temperatura, pH,  $a_w$ , concentração do inóculo, fonte de carbono e nitrogênio, concentração de sal e condições atmosféricas do substrato. Em temperaturas ótimas, as quais dependem do tipo de toxina produzida, a enterotoxina torna-se detectável entre 4 a 6 horas (SANTANA et al., 2010). Das amostras analisadas, 30% dos queijos T1 em janeiro, 20% dos queijos T7 em janeiro e 10% dos queijos T7 em julho estavam com contagens de *Estafilococos* coagulase positiva acima de  $5 \log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>. Estes números indicam que estas amostras continham quantidade de células e condições ambientais propícias para produção de enterotoxinas. A RDC 12 de 2001 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001) determina que o número máximo de *Estafilococos* coagulase positiva presentes em queijos de alta umidade deve ser de  $3 \log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>. Em janeiro, 40% das amostras de queijo T1 e 30% das amostras T7 apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira. Em julho, apenas 20% das amostras de queijo T7 estavam fora dos padrões estabelecidos.

Em nenhuma das amostras analisadas encontraram-se *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, tanto em janeiro como em julho. Aspecto este de grande relevância, por se tratarem de micro-organismos altamente patogênicos. Em uma amostra de leite foi identificada a presença de *Listeria innocua*. Das espécies de *Listeria*, apenas a *L. monocytogenes* é significativa como patógeno em humanos e animais. A *L. innocua* é encontrada em vários ambiente, porém não é considerada uma bactéria patogênica (PERRIN et al., 2003).

As BAL são bactérias altamente relevantes nos produtos lácteos já que estão presentes naturalmente no ambiente de ordenha e processamento e acabam contaminando a matéria-prima e seus produtos de beneficiamento. Nesta pesquisa, observou-se que as contagens de BAL variaram entre os produtores de 5,0 a 7,4  $\log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> para o leite em janeiro e de 2,3 a 7,5  $\log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> em julho. Para o queijo T1, as populações encontradas variaram de 7,0 a 9,2  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> em janeiro e de 6,2 a 8,5  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> em julho. No queijo T7 os níveis de BAL se alternaram entre 7,5 e 9,0  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> em janeiro e de 5,9 a 8,6  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> em julho. De acordo com a tab. 8, as amostras apresentaram contagens médias significativas de BAL com gradativo aumento do leite para os queijos, tanto em janeiro quanto em julho, sofrendo influência significativa do período de coleta em seus níveis populacionais. Esta evolução era esperada, já que são elas as responsáveis pelo processo fermentativo. Observou-se em janeiro um número maior de BAL nos

queijos. Apesar de serem considerados importantes deteriorantes em produtos lácteos, as BAL são capazes de produzir atividade antimicrobiana. Isto pode ser outro motivo pelo qual houve variação nas contagens dos micro-organismos indicadores de higiene nas diferentes amostras.

Os resultados apresentados na tab. 8 demonstraram ter havido aumento do número total de micro-organismos durante a produção do queijo. Podemos visualizar com maior clareza esta evolução da microbiota do leite e queijos em dois tempos de maturação, em duas estações do ano produzidos na região Fronteira Noroeste do RS na Figura 3.



**Figura 3:** Evolução da microbiota durante os meses de janeiro/julho. CF – coliformes termotolerantes (fecais); CT – coliformes totais; SCP – Estafilococos coagulase positiva; CPP – contagem de mesófilos aeróbios; BAL – bactérias ácido lácticas.

Em análise individual das amostras de leite e queijos, observou-se que o leite proveniente do produtor 2 no mês de janeiro foi considerado de boa qualidade, pois não apresentou contaminação por Estafilococos coagulase positiva e os níveis de coliformes totais e termotolerantes estavam dentro dos limites aceitáveis segundo RDC 12 de 2001 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001). Os queijos T1 e T7 em melhores condições higiênicas foram do produtor 6, pois não se observou presença de Estafilococos coagulase positiva e a contaminação por coliformes termotolerantes estava dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira. Durante o mês de

julho, o produtor 5 forneceu o leite de melhor qualidade microbiológica, pois este não apresentou contaminação por *Estafilococos* coagulase positiva e os níveis de coliformes termotolerantes estavam dentro dos limites aceitáveis. Dentre os queijos deste período, podemos dizer ainda que todos apresentaram presença de coliformes termotolerantes, além de altas contagens de mesófilos aeróbios, demonstrando a falta de condições higiênicas destes.

A partir de dados de trabalhos científicos publicados, revela-se a baixa qualidade microbiológica do leite e queijos produzidos/comercializados no Brasil e no mundo, caracterizados pela frequente contaminação por coliformes totais, termotolerantes, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp.. Barbosa et al. (2007) verificaram em seu trabalho que todas as amostras de leite cru consumidos no município de Queimadas na Paraíba se encontravam contaminadas por coliformes totais e termotolerantes em quantidades fora dos padrões desejáveis, porém todas as amostras de leite pasteurizado encontravam-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente no período no qual transcorreu o estudo. Catão e Ceballos (2001) pesquisaram a qualidade microbiológica de leite cru e pasteurizado em uma indústria no estado da Paraíba e observaram que todas as amostras apresentaram incidência de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*, inclusive as amostras de leite pasteurizado. O trabalho também demonstrou que 50% das amostras estavam contaminadas com *Listeria* spp. Han et al. (2007) analisaram leite de búfala produzidos na China e observaram altas contagens microbianas neste. Este número alto é atribuído a práticas inadequadas durante a ordenha, o recolhimento e o transporte. Desta microbiota, grande parte é constituída de BAL, como o número grande destas pode causar acidificação excessiva durante o processo de fermentação, o autor sugere que medidas efetivas devem ser tomadas para evitar este tipo de deterioração. O autor relata ainda, que níveis médios de contaminação por coliformes e *E. coli* foram observados, que nenhuma das amostras se encontrava com contaminação acima do nível aceitável para *Staphylococcus aureus* e que também não foi detectada a presença de *Listeria* spp. Chye et al. (2004) analisaram amostras de leite cru na Malásia e encontrou concentrações acima de 6 log UFC.mL<sup>-1</sup> para contagem de mesófilos aeróbios, limite este determinado pelo Departamento de Veterinária daquele país. As possíveis razões indicadas pelo autor são a contaminação por infecção dos úberes das vacas, das práticas inadequadas de ordenha, da água contaminada utilizada para os processos de higienização dos

equipamentos, bem como a estocagem inadequada do leite. Este observou ainda, contagens acima de  $4 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  para coliformes e  $3 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  para *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados do estudo indicaram claramente que a qualidade microbiológica do leite cru produzido por agricultores locais é deficitária. Alta contagem microbiana e a ocorrência de patógenos afeta a sua conservação e a segurança do leite cru, bem como de seus produtos derivados. A presença de bactérias patogênicas como a *E. coli* 0157:H7, *Salmonella* e *Listeria* spp. neste é um problema de saúde pública já que consumir leite cru ainda é considerado bom para a saúde da população rural daquele país.

Ao pesquisar a qualidade microbiológica do leite cru e queijo minas frescal, Ortolani (2009) encontrou a maioria de suas amostras em condições insatisfatórias de higiene por estarem contaminadas com grandes concentrações de coliformes e mesófilos aeróbios. Ainda, encontrou baixas populações de *E. coli* e Estafilococos coagulase positiva e nenhuma contaminação por *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. A autora sugere que a microbiota autóctone das amostras analisadas pode ter determinado a influência direta no isolamento destes patógenos. A pesquisadora destaca ainda, que 94,4% das amostras de leite apresentaram contagens de BAL acima de  $3 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  e 83,3 % as amostras de queijo minas frescal acima de  $5 \log \text{UFC.g}^{-1}$ . Ainda, quando comparadas as BAL com os indicadores higiênico-sanitários, demonstraram índices positivos e significativos de correlação indicando aumento proporcional destes grupos na microbiota do leite cru para o queijo minas frescal.

Ao analisar queijos minas frescal na cidade de Cuiabá/MT, Loguercio e Aleixo (2001) observaram que 93,33% das amostras apresentaram valores acima dos padrões legais aceitáveis para coliformes termotolerantes e 96,67% para *Staphylococcus aureus* classificando-os como “Produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias”. Ainda, 43,3% das amostras foram consideradas como “Produtos potencialmente capazes de causar enfermidades transmitidas por alimentos” por conterem dez vezes o limite estabelecido por padrões específicos para *S. aureus*. No ano de 2006, Salotti et al. reportaram que na cidade de Jaboticabal/SP os queijos artesanais e inspecionados pelo Serviço de Inspeção Estadual e Federal se encontravam contaminados, indicando má qualidade higiênico-sanitária destes. Das amostras analisadas, 83,3% apresentaram níveis acima do permitido pela legislação para coliformes termotolerantes e 20% para



Estafilococos coagulase positiva. Porém, os resultados para pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. foram considerados aceitáveis, pois houve ausência destes micro-organismos em todas as amostras. Já em Aracaju/SE, Santanna et al. (2008) observaram que dos queijos-coalho comercializados no Mercado Central de Aracaju, dezesseis amostras (26,7%) foram positivas para *Salmonella* spp. e 28 (46,7%) positivas para Estafilococos coagulase positiva. Quanto à contaminação por coliformes totais, 56 (93,3%) das amostras apresentaram valores entre 2,9 e 4,09 log NMP.g<sup>-1</sup>, e de 2,43 a 3,05 log NMP.g<sup>-1</sup> para coliformes termotolerantes. Estes valores não atenderam à legislação brasileira para queijo-coalho e as amostras analisadas foram classificadas como impróprias ao consumo humano. Andrade (2009) foi um dos poucos pesquisadores que relatou a baixa incidência de contaminação microbiana em queijos Minas da Serra da Canastra feitos de forma artesanal. O autor observou que todas as amostras estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação para coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. E apenas 7,5% apresentaram-se contaminadas em nível alto por Estafilococos coagulase positiva. Este relatou que a técnica de fabricação do queijo Minas artesanal foi registrada no Livro dos Saberes, em agosto de 2002, como primeiro patrimônio imaterial de Minas Gerais pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais – IEPHA/MG e a importância dos projetos de apoio técnico que veem sendo desenvolvido pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER/MG), Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), visando à melhoria da qualidade e segurança alimentar desse produto e que já está garantindo ao consumidor queijos com condições higiênico-sanitárias satisfatórias.

Conforme descrito a seguir, estudos têm demonstrado que período do ano no qual o queijo é produzido também influencia nas características microbiológicas dos queijos artesanais tanto brasileiros como de outros países do mundo. Souza et al. (2003) ao estudar o queijo Serrano proveniente da Serra Gaúcha verificou que houve um aumento ao redor de um ciclo logarítmico do leite para a massa coagulada do queijo na investigação dos diferentes grupos microbianos. Este fenômeno foi considerado normal no processamento dos queijos e resulta parcialmente da multiplicação destes durante a coagulação e parcialmente da retenção física quando ocorre a dessoragem. Contagens máximas foram alcançadas depois de uma semana de maturação tanto no inverno como no verão, decaindo

durante o decorrer do período de maturação. Altas contagens de mesófilos aeróbios foram encontradas ( $6,07 \log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> no verão e  $5,7 \log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> no inverno) indicando mais uma vez as condições precárias de ordenha do leite. O número de UFC aumentou durante uma semana de maturação do queijo Serrano. Os coeficientes de correlação encontrados entre pH e CPP no verão ( $r = -0,819$ ) e inverno ( $r = -0,827$ ) sugerem que esta microbiota é formada, em geral por micro-organismos ácido tolerantes, como sugerem outras correlações encontradas entre CPP e acidez total ( $r = 0,607$  e  $r = 0,647$ ). A alta população de micro-organismos encontrados no verão representa um risco potencial de deterioração do produto. Os autores relatam ainda, um grande número de coliformes totais e termotolerantes no leite cru, indicando mais uma vez a má qualidade higiênica deste material usado no processamento do queijo. Estes grupos microbianos não apresentaram variações significativas no inverno ou verão, mas o tempo de maturação teve uma significativa influência nas contagens destas populações. Os pesquisadores destacam ainda, uma importante característica no aspecto higiênico-sanitário, a ausência dos grupos coliformes no fim dos 60 dias de maturação no verão, reforçando a necessidade desta na produção de queijos produzidos a partir de leite que não passaram por processo de pasteurização.

Além dos micro-organismos contaminantes, alguns autores relatam a presença de BAL que também caracterizam os derivados lácteos. Souza et al. (2003) observaram que lactobacilos, principalmente nas etapas finais do processo de maturação foram as BAL predominantes nos queijos Serrano, sugerindo que estes micro-organismos têm papel fundamental na produção deste queijo fazendo parte da sua cultura láctica. Lima et al. (2009) observaram que as concentrações de BAL no leite, pingo (soro de leite fermentado), coalhada e queijo minas artesanal das fazendas do município da Serra do Salitre/MG foram diferenciadas. Houve um aumento significativo das BAL *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis* e *Leuconostoc mesenteroides* durante o processo de fabricação do queijo. As espécies *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae* foram isoladas em todas as amostras coletadas durante a fabricação do queijo. Com relação aos *Enterococcus* spp., apesar das limitações do uso desses micro-organismos, pois são indicadores de contaminação fecal, sua presença nos alimentos, indica práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento a condições que permitiram a multiplicação de micro-organismos

indesejáveis. A presença de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* nas amostras de queijo analisadas é um alerta para as condições higiênicas inadequadas, durante a fabricação de alguns produtos artesanais. Andrade (2009) coletou vinte e sete amostras de queijo Minas Serra da Canastra em estabelecimento varejista na cidade de Araras/SP. Nas amostras de queijo Serra da Canastra foram observadas contagens variando entre 4 a 7 log UFC.g<sup>-1</sup> de bactérias do gênero *Enterococcus* ficando evidenciado que este gênero compõe a microbiota láctica presente na produção deste queijo.

Avaliando a influência das estações do ano na microbiota de leite cru produzido em ilhas Baleares na Espanha, Soler et al. (1995) observou que a contagem de viáveis totais, psicotróficos e coliformes atingiu seus níveis máximos no verão, significativamente maior do que durante o resto do ano. A maioria dos coeficientes foi altamente significativa ( $P < 0,001$ ). Psicotróficos e coliformes estavam estreitamente correlacionados com a contagem total viável. O comportamento concomitante desses grupos seria explicado pelas condições não higiênicas de produção, seguido de má refrigeração do leite. Micro-organismos termodúricos crescem no leite a uma taxa menor do que psicotróficos e coliformes. Seus níveis não foram tão estreitamente correlacionados com a contagem total viável como os níveis de psicotróficos ou coliformes.

#### **4.4.2 Caracterização físico-química**

Na tab. 9 estão apresentados os resultados das análises de caracterização físico-química do leite e queijos coloniais pesquisados.

Tabela 9: Caracterização físico-química de amostras de leite<sup>1</sup> e queijos em dois períodos de maturação<sup>1</sup> da região Fronteira Noroeste do estado do RS durante os meses de janeiro<sup>1</sup> e julho<sup>1</sup>.

Parâmetro	Período de coleta	Leite	Queijo T1	Queijo T7
pH	Janeiro	6,7 ± 0,06 <sup>aA</sup>	6,05 ± 0,41 <sup>bA</sup>	6,02 ± 0,36 <sup>cA</sup>
	Julho	6,68 ± 0,11 <sup>aA</sup>	6,2 ± 0,48 <sup>bA</sup>	6,00 ± 0,41 <sup>bA</sup>
Acidez (%)	Janeiro	0,14 ± 0,01 <sup>bA</sup>	0,30 ± 0,11 <sup>aA</sup>	0,37 ± 0,07 <sup>aA</sup>
	Julho	0,18 ± 0,02 <sup>bA</sup>	0,41 ± 0,18 <sup>aA</sup>	0,42 ± 0,14 <sup>aA</sup>
Extrato Seco Total (%)	Janeiro	11,31 ± 0,41 <sup>A</sup>	-	-
	Julho	11,16 ± 2,58 <sup>B</sup>	-	-
Proteína (%)	Janeiro	3,26 ± 0,35 <sup>bA</sup>	23,09 ± 4,03 <sup>aA</sup>	24,81 ± 4,03 <sup>aA</sup>
	Julho	3,55 ± 0,77 <sup>cA</sup>	19,49 ± 2,83 <sup>bB</sup>	22,98 ± 3,58 <sup>aA</sup>
Gordura (%)	Janeiro	3,95 ± 1,17 <sup>cA</sup>	20,57 ± 3,68 <sup>bA</sup>	22,85 ± 3,06 <sup>aA</sup>
	Julho	3,58 ± 0,64 <sup>cA</sup>	21,5 ± 6,9 <sup>bA</sup>	24,21 ± 5,34 <sup>aA</sup>
aw	Janeiro	-	0,945 ± 0,02 <sup>aA</sup>	0,939 ± 0,02 <sup>aA</sup>
	Julho	-	0,910 ± 0,03 <sup>aA</sup>	0,871 ± 0,03 <sup>bB</sup>
Umidade (%)	Janeiro	-	47,53 ± 5,48 <sup>aB</sup>	41,73 ± 4,04 <sup>bB</sup>
	Julho	-	50,45 ± 3,66 <sup>aA</sup>	49,00 ± 3,14 <sup>aA</sup>
NaCl (%)	Janeiro	-	4,58 ± 2,62 <sup>aB</sup>	4,36 ± 2,87 <sup>bB</sup>
	Julho	-	5,08 ± 2,49 <sup>bA</sup>	6,08 ± 3,58 <sup>aA</sup>

<sup>1</sup> Os dados são as médias e desvios-padrões das amostras durante as duas coletas;

<sup>a-c</sup> As médias seguidas de uma mesma letra na linha, para cada variável, não diferem entre si a P < 0,05 de significância pelo Teste de Tukey;

<sup>A-B</sup> As médias seguidas de uma mesma letra na coluna, para cada variável, não diferem entre si a P < 0,05 de significância pelo Teste de Tukey;

\* T1: Queijo com um dia de maturação;

\*\* T7: Queijo com sete dias de maturação.

Os teores de proteína se alternaram entre 2,69 e 3,77% para o leite em janeiro e 2,39 a 4,81% em julho. De acordo com a IN n<sup>o</sup> 62, de 2011, do Ministério da Agricultura o valor mínimo de proteína que o leite cru deve possuir é 2,9%. Das amostras analisadas, 20% estavam fora dos padrões estabelecidos, tanto em janeiro como em julho. Nos queijos T1 a variação de proteína em janeiro foi entre 14,80 e 28,31% e em julho entre 15,66 e 21,33%. Já valores de proteína dos queijos T7 variaram entre 21,22 e 30,72% em janeiro e 17,68 a 28,56% em julho. A tab. 10 demonstra que a média dos teores de proteína do leite foi de 3,26 e 3,55% em janeiro e julho, respectivamente. Ainda, observa-se que o queijo T1 possui em média valores de 23,09% em janeiro e 19,49% em julho. Os teores de proteína dos queijos T7 em janeiro foram de 24,81% e 22,98% em julho, em média. Pode-se observar que houve diferença significativa entre os valores de proteína do leite para os queijos tanto em janeiro como em julho. As variações sazonais não afetaram significativamente os teores de proteína no leite e queijo T7, percebeu-se apenas diminuição significativa no teor de proteína do queijo T1 durante o mês de julho.

Os teores de gordura variaram entre 2,3 e 6,3% para o leite em janeiro e 2,5 a 4,5% em julho. De acordo com a IN nº 62, de 2011, do Ministério da Agricultura o teor mínimo de gordura que o leite cru deve possuir é 3,0%. Das amostras analisadas, 20% estavam fora dos padrões estabelecidos em janeiro e 10% julho. Nos queijos T1 a variação da gordura em janeiro ocorreu entre 14,48 e 24,04% e em julho entre 9,73 e 32,2%. Já os valores de gordura dos queijos T7 variaram entre 17,61 e 26,85% em janeiro e 16,77 a 31,85% em julho. A tab. 10 demonstra que a média dos teores de gordura do leite foi de 3,95 e 3,58% em janeiro e julho, respectivamente. Ainda, observa-se que o queijo T1 possui, em média, valores de 20,57% em janeiro e 21,5% em julho. Os teores de gordura dos queijos T7 em janeiro foram de 22,85% e 24,21% em julho. Pode-se observar que houve aumento significativo dos valores de gordura do leite para os queijos tanto em janeiro como em julho. Porém, o período de coleta não afetou significativamente os teores de gordura no leite e nos queijos.

A concentração de sal (NaCl) dos queijos T1 variou de 0,43 a 8,77% janeiro e 2,26 a 10,62% em julho. A variação de NaCl no queijo T7 ocorreu entre 0,52 a 9,18% em janeiro e 2,65 a 13,67% em julho. Conforme resultados apresentados na tab. 10, referente às médias das amostras, o queijo T1 apresentou teor de sal de 4,58%, e após os 7 dias de maturação (queijo T7) alcançou o valor de 4,36% em janeiro constatando-se que houve uma redução significativa deste parâmetro no período. Enquanto que durante o mês de julho a concentração de sal aumentou de 5,08% para 6,08%, sendo este considerado, um aumento significativo. Pode-se observar também que o período de coleta influenciou significativamente no teor de NaCl dos queijos. O alto desvio padrão demonstra que as diferenças encontradas entre os queijos se deve ao fato de que a quantidade de sal adicionada não é medida ou pesada.

A umidade dos queijos T1 variou de 40,64 a 59,75% em janeiro e 40,73 a 57,11% em julho. A variação da umidade no queijo T7 ocorreu entre 35,64 a 48,47% em janeiro e 43,52 a 53,34% em julho. Conforme resultados apresentados na tab. 10, referente às médias das amostras, o queijo T1 apresentou umidade de 47,53%, e após os 7 dias de maturação (queijo T7) alcançou o valor de 41,73% em janeiro constatando-se que houve uma redução significativa deste parâmetro no período. Enquanto que durante o mês de julho a umidade diminuiu de 50,45% para 49,00%, porém esta não foi uma redução significativa. Pode-se observar também que o

período de coleta influenciou no teor de umidade dos queijos. Os valores maiores de umidade encontrados em julho se devem as temperaturas mais baixas e pela umidade relativa do ar ser maior neste período dificultando a evaporação da água e a dessoragem.

Os valores de  $a_w$  dos queijos T1 variaram de 0,923 a 0,984 em janeiro e 0,861 a 0,953 em julho. A variação de  $a_w$  no queijo T7 ocorreu entre 0,906 a 0,973 em janeiro e 0,824 a 0,911 em julho. Conforme resultados apresentados na tab. 10, referente às médias das amostras, o queijo T1 apresentou valor de  $a_w$  de 0,945, e após os 7 dias de maturação (queijo T7) alcançou o valor de 0,939 em janeiro constatando-se que não houve uma redução significativa deste parâmetro no período. Enquanto que durante o mês de janeiro a  $a_w$  diminuiu de 0,910 para 0,871, sendo esta considerada, uma redução significativa. Pode-se observar também que o período de coleta influenciou significativamente na  $a_w$  do queijo T1, mas não do T7.

O pH do leite variou entre 6,6 e 6,79 durante o mês de janeiro e 6,57 a 6,94 em julho. Nos queijos T1 a variação em janeiro foi entre 5,43 e 6,87 e em julho entre 5,46 e 6,94. Já valores de pH dos queijos T7 variaram entre 5,61 e 6,77 em janeiro e 5,45 a 6,73 em julho. A tab. 10 demonstra que a média de pH do leite foi de 6,7 e 6,68 em janeiro e julho, respectivamente. Ainda, observa-se que o queijo T1 possui em média valores de 6,05 em janeiro e 6,2 em julho. Os valores de pH dos queijos T7 em janeiro foram de 6,02 e 6,0 em julho em média. Pode-se observar que houve uma diminuição significativa dos valores de pH do leite para os queijos em janeiro e também do leite para o queijo T1 em julho, mas não houve diminuição significativa do pH do queijo T1 para o queijo T7. Observou-se ainda, que o período de coleta não afetou significativamente os valores de pH no leite e nos queijos.

A acidez do leite variou entre 0,12 e 0,15% durante o mês de janeiro e 0,15 a 0,22% em julho. De acordo com a IN nº 62, de 2011, do Ministério da Agricultura a acidez do o leite cru deve estar compreendido entre 0,14 e 0,18%. Das amostras analisadas, 40% estavam fora dos padrões estabelecidos em julho e janeiro todas as amostras encontravam-se dentro dos limites determinados por aquela legislação. Nos queijos T1 a variação em janeiro foi entre 0,14 e 0,52% e em julho entre 0,24 e 0,76%. Já valores de acidez dos queijos T7 variaram entre 0,28 e 0,52% em janeiro e 0,23 a 0,62% em julho. A tab. 10 demonstra que a média da acidez do leite foi de 0,14 e 0,18% em janeiro e julho, respectivamente. Ainda, observa-se que o queijo T1 possui em média valores de 0,30% em janeiro e 0,41% em julho. Os valores de

acidez dos queijos T7 em janeiro foram de 0,37% e 0,42% em julho, em média. Pode-se observar que houve aumento significativo dos valores de acidez do leite para os queijos tanto em janeiro como em julho, mas não houve aumento significativo da acidez do queijo T1 para o queijo T7. Observou-se ainda, que o período de coleta afetou significativamente os valores da acidez no leite e nos queijos, sendo maior em julho. O aumento da acidez é consequência da proteólise que ocorre durante o processo de maturação. Essa variação aleatória nos valores da acidez se deve, provavelmente, a falta de padronização na salga. O sal, além de conferir gosto característico ou realçar o sabor, complementa a dessoragem e regula a acidez do queijo, favorecendo a liberação de água livre na massa pela diferença de pressão osmótica e a dissolução de algumas proteínas e seus produtos, os quais são substâncias tituláveis como ácidos. Durante a evolução da maturação substâncias tampão são liberadas, como por exemplo, a caseína que é titulável como ácido. A separação da caseína do soro é um fator que favorece essa variação de pH e acidez (NUCH et al., 2004).

Os teores de extrato seco total do leite variaram de 10,46 a 11,8% em janeiro e de 7,7 a 17,66% em julho. Pode-se observar que houve diferença significativa nestes valores entre os dois períodos. A legislação brasileira preconiza através da IN 62 de 2011, do Ministério da Agricultura que o mínimo de extrato seco desengordurado no leite deve ser 8,4%. Analisando os resultados obtidos, percebe-se que em julho, 70% das amostras estão fora dos padrões determinados e em janeiro apenas 10% atenderam aos limites estabelecidos.

Os desvios padrões acima de um de certos parâmetros físico-químicos nos mostram que não há uma padronização para produção dos queijos coloniais da região Fronteira Noroeste. Estes dados refletem ainda as diferentes tecnologias utilizadas pelos produtores como: prensagem, tamanho dos grãos, tamanho dos queijos e teor de sal. A composição do leite utilizado para fabricação dos queijos foi variada ocasionando esta variação também nos queijos. Esta diferença é ocasionada em virtude de fatores climáticos, raça, estágio de lactação, tipo de alimentação, entre outros.

A legislação brasileira, na forma da IN nº 62 de 2011, estabelece que os teores de matéria gorda devam ser no mínimo 3%, a acidez titulável deve estar entre 0,14 e 0,18 g/100 mL, o extrato seco desengordurado deve ser no mínimo 8,4% e o teor de proteína no mínimo 2,9%.

Barbosa et al. (2007) analisaram leite cru e pasteurizado consumidos no município de Queimadas/PB e obtiveram 14 e 15<sup>o</sup>D de acidez, valores estes considerados dentro dos padrões aceitáveis. Ao analisar os teores de gordura, os autores observaram que a média do leite pasteurizado foi de 3,36% estando dentro dos limites estabelecidos, porém o leite cru estava com valor abaixo do mínimo aceitável (2,43%). Os pesquisadores afirmam que existem diversos fatores que podem afetar a porcentagem de gordura no leite, tais como, estágio de lactação ou ordem de lactação no dia ou desnate. Para o extrato seco desengordurado a amostra de leite cru (7,94%) apresentou-se fora dos padrões estabelecidos. Almeida et al. (1999) também estudaram a composição de leite cru proveniente do município de Alfenas/MG. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o teor de gordura de cinco amostras (71,43%), em valores médios, estava abaixo do mínimo aceitável. Para o extrato seco total, todas as amostras (100%) apresentaram-se abaixo dos padrões regulamentares. Cinco amostras (71,43%) apresentaram acidez média abaixo da faixa regulamentar.

Nuch et al. (2004) analisaram dois lotes de queijos coloniais provenientes de dois produtores de Viamão/RS quanto as suas características físico-químicas durante o processo de maturação e obtiveram aproximadamente teores de umidade de 57% para T1 (um dia de maturação) e 53,84% para T8 (oito dias de maturação), extrato seco total (EST) de 42,5% para T1 e 46,16% para T8, cloreto de sódio de 0,9% para T1 e 1,0% para T8, proteína total de 17% para T1 e 19,01% para T8 e acidez 0,63 g de ácido láctico/100g de amostra para T1 e 0,57 para T8. Em 2007, Cavalcanti et al., analisaram queijos coalhos artesanais em Minas Gerais e observaram 42% de umidade, 28% de gordura, 23% de proteína, 1,73% de cloreto de sódio, pH de 5,23 e 0,77 g de ácido láctico/100g de produto de acidez. No noroeste da Espanha é produzido o tradicional queijo San Simón que possui o selo PDO pela C.E. Ele é feito com leite cru sem adição de culturas iniciadoras. Fontán et al. (2001) estudaram as alterações microbiológicas durante a maturação deste queijo relacionando com seus parâmetros físico-químicos. Eles observaram que os valores de pH, acidez e teor de sal não foram relativamente significativos para inibir o crescimento microbiano. O pH sofreu uma ligeira queda e a aw no final da maturação não se tornou significativamente baixa para exercer o controle microbiano. Os valores médios da relação NaCl/umidade também foram baixos



mesmo ao final do processo de maturação, prejudicando o controle do crescimento microbiano.

Alguns estudos demonstraram que a estação do ano no qual o queijo é produzido também tem influência nas características físico-químicas dos queijos artesanais, tanto os produzidos no Brasil como em outros países do mundo. Podemos verificar a influência das estações do ano na composição físico-química do queijo Serrano proveniente da Serra Gaúcha em estudo realizado por Souza et al. (2003). Houve um decréscimo significativo nos valores de pH durante a primeira semana de maturação, tanto no inverno (5,1) como no verão (5,3) em decorrência do ácido láctico produzido por BAL. Os autores relatam que ocorreu um decréscimo mais pronunciado na atividade de água ( $a_w$ ) no verão provavelmente devido a grande evaporação da água e hidrólise de proteínas durante a maturação neste período por causa das altas temperaturas. Os valores de  $a_w$  no final da maturação foram suficientes para o controle dos micro-organismos. Porém, os pesquisadores verificaram que não houve variação significativa da  $a_w$  entre as estações apresentadas. Entretanto, a umidade variou significativamente entre os dois períodos, portanto foi mais bem evidenciada durante o verão devido à alta temperatura e baixa umidade relativa do ar que causaram uma intensa desidratação. Ainda, a baixa concentração de NaCl não foi suficiente para inibir o crescimento microbiano. A evolução dos parâmetros físico-químicos com o passar da maturação, não produziram condições antagonistas para nenhum dos grupos microbianos investigados. Portanto, a redução destes não é consequência do simples efeito inibitório, mas de uma combinação de diversos fatores. Os pesquisadores afirmam ainda, que embora as contagens microbianas e as principais características físico-químicas do queijo Serrano tenham apresentado variações significativas, nenhuma das produções em si apresentou importante variação considerando as estações do ano, exceto para umidade.

Na Itália, Renna et al. (2009) também estudaram a influência das estações do ano nas características de queijos tipo Danish produzidos de forma artesanal com emprego de leite cru na sua formulação, os quais possuem selo de identidade e qualidade (PDO – Protected Designation of Origin). A composição bruta dos queijos da Fontina produzido por sistemas agrários orgânicos e convencionais não apresentaram estatisticamente diferenças significativas na matéria seca, cinza, proteína e gordura entre queijos orgânicos de inverno /primavera e as produções de

verão. Todas as amostras de queijo tinham valores maiores que 45% de conteúdo de gordura (em base seca), conforme exigido pelo Valle d'Aosta Fontina Manufacturing PDO Regras. Sobre o leite usado na produção de queijos, os conteúdos de gordura e proteína do orgânico foram significativamente maiores no verão em relação ao inverno/primavera, porém esta diferença não foi visualizada para o queijo convencional. O estágio da lactação é um dos principais parâmetros que influencia a composição bruta de leite em ruminantes. No período avançado de lactação, as concentrações de gorduras e proteínas normalmente tendem a aumentar.

Em 1995, Soler et al. já estudavam a influência da estação do ano na composição do leite nas ilhas Majorca e Minorca, na Espanha. Os autores observaram que a acidez do leite produzido em Majorca (15,63 °D) foi significativamente ( $P < 0,01$ ) menor do que o leite produzido em Minorca (16,17 °D), apesar das maiores contagens de bactérias encontradas no primeiro. O teor de proteína médio do leite foi 3,04% em Majorca e Minorca em 3,21%. Assim, as diferenças composição química do leite pode explicar este resultado aparentemente contraditório. Em Majorca, os valores de acidez primavera foram significativamente maiores do que durante o resto do ano, enquanto que em valores de acidez máxima Minorca foram encontradas no inverno (Tabela 1). O pH do leite apresentou um valor médio idêntico para ambos os consoles (6,58), com um mínimo no outono para o leite produzido em Majorca e no verão para o leite produzido em Minorca. A maioria dos coeficientes foram altamente significativos ( $P < 0,001$ ). Como esperado, a acidez do leite foi fortemente ( $P < 0,001$ ) correlacionada com os níveis de contagem de viáveis totais, psicotróficos e micro-organismos termodúricos e leite pH foi inversamente correlacionado ( $P < 0,001$ ) com os níveis desses grupos microbianos e acidez do leite.

Comparando os estudos de diversos autores apresentados anteriormente com o presente estudo, observa-se que queijos coloniais de diversas regiões não provem de processos padronizados de fabricação, pois apresentam grandes desvios padrões nas médias dos parâmetros físico-químicos analisados. Percebe-se ainda, que a microbiota nativa e os períodos de coleta influenciam nesta diferença.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

1. Pelas características morfológicas e fisiológicas apresentadas pelas BAL isoladas, pressupõe-se que 37,49% pertencem ao gênero *Lactococcus/Enterococcus* e 25,89% ao gênero *Lactobacillus*;
2. Um total de 33,87% dos isolados não produziu gás a partir da glicose demonstrando característica homofermentativa e apresentaram atividade antagonista, pois inibiram os patógenos de referência, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes*;
3. As amostras de leite e queijos analisados possuem baixa qualidade microbiológica devido às altas contagens de micro-organismos indicadores de higiene, porém não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes*;
4. Os altos valores de desvios padrões de umidade, proteína, gordura e teor de sal nos mostram que não há uniformidade ou padronização para produção dos queijos coloniais da região Fronteira Noroeste. A composição do leite utilizado para fabricação dos queijos foi variada ocasionando esta variação também nos queijos;
5. Em virtude da diferença nas contagens de coliforme totais e termotolerantes, Estafilococos coagulase positiva, *E. coli*, contagem de mesófilos aeróbios e contagem de BAL nos meses de janeiro e julho, o período de coleta influenciou nas características microbiológicas do leite e queijos da região;
6. Variação nos valores de extrato seco total do leite e na aw, umidade e teor de sal dos queijos confirmam que houve influências sazonais nas características físico-químicas.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Faz-se necessária a continuidade deste estudo para identificação das espécies de BAL isoladas e das substâncias antimicrobianas que provocaram o antagonismo láctico para posterior aplicação destas culturas como iniciadoras e bioconservadoras na padronização dos queijos regionais.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. C.; SILVA, G. L. M.; SILVA, D. B.; FONSECA, Y. M.; BUELTA, T. T. M.; FERNANDES, E. C. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de Alfenas, MG. **Revista Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 5, p. 165-168, 1999. Disponível em: < [http://www.unifenas.br/pesquisa/download/ArtigosRev2\\_99/pag165-168.pdf](http://www.unifenas.br/pesquisa/download/ArtigosRev2_99/pag165-168.pdf)>. Acesso em: 18 dez. 2011.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. APHA, Washington, 2002.

AMMOR, M.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v. 76, n. 1, p. 138-146, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174006003627>>. Acesso em: 22 abr. 2011.

ANDRADE, C. R. **Diagnóstico da qualidade microbiológica de queijo Serra da Canastra e caracterização de bactérias do gênero *Enterococcus***. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. AOAC, Maryland, 2002.

BARBOSA, A. S.; PIRES, E. C. F.; BARBOSA, A. S.; CANUTO, T. M.; ARAÚJO, A. P.; NUNES, L. S. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru e pasteurizado consumido no município de queimadas, PB. In: CONGRESSO NORTE

NORDESTE DE QUÍMICA, 1., 2007, Natal. **Anais do I Congresso Norte Nordeste de química**. Natal: ANNQ, 2007. Disponível em: < <http://www.annq.org/congresso2007/trabalhosapresentados/T127.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2011.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do Leite**. 13 ed. São Paulo: Nobel, 1999.

BONOMO, M. G.; RICCIARDI, A.; SALZANO, G. Influence of autochthonous starter cultures on microbial dynamics and chemical-physical features of traditional fermented sausages of Basilicata region. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 137–146, 2011. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/p98k6586r27835w6/>>. Acesso em: 24 nov. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146 de 11 de março de 1996**. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 62 de 29/12/11**. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 12 de 02/01/2001**. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. 2008. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10\\_passos\\_para\\_investigacao\\_surtos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_passos_para_investigacao_surtos.pdf)>. Acesso em: 03 de ago. de 2010.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota láctica de queijos artesanais. Disponível em:< [http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc\\_124.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc_124.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2012.

CASTRO, M.P.; PALAVECINO, N.Z.; HERMAN, C.; GARRO, O.A.; CAMPOS, C.A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of

antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production.

**Meat Science**, v. 87, p. 321–329, 2011. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174010003967>>. Acesso em:

01 dez. 2011.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21(3), p. 281-287, 2001.

Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cta/v21n3/8544.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

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

<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n1/35.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2009.

CHIODA, T. P.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R.; PIGATTO, C. P.; RIBEIRO, C. A. M.; RAGAZZANI, A. V. F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n.2, p. 583-585, mar./abr., 2007. Disponível em: <

<http://www.scielo.br/pdf/cr/v37n2/a48v37n2.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 2011.

CHYE, F.; ABDULLAH, A.; AYOB, K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, v. 21, p. 535–541, 2004. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002003001163>>. Acesso em:

28 jan. 2012.

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

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2008.01883.x/pdf>>. Acesso

em: 17 ago. 2010.

DALLABRIDA, V. R. e BÜTTENBENDER, P. L. (Org.). Gestão, Inovação e Desenvolvimento: Oportunidades e Desafios para o Desenvolvimento da Região Fronteira Noroeste. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2007.

DHANASHREE, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; GOEBEL, W. Incidence of *Listeria* spp. In clinical and food samples in Mangarole. **Food Microbiology**, v. 20, p. 447-453, 2003. Acesso em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002002001405>>. Acesso em: 13 dez. 2011.

EMATER, 2012. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. Regional de Santa Rosa. Disponível em: <<http://www.emater.tche.br/site/regionais/santarosa.php>>. Acesso em: 30 jan. 2012.

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

EVANGELISTA, M. L. S.; HECKLER, V.; ELGER, F. A.; GRIEBLER, G.; NUSKE, A. C. A sustentabilidade no sistema produtivo da atividade leiteira na Região Fronteira Noroeste do Rio Grande do Sul. In: XIII Simpósio de Engenharia de Produção, 2006, Bauru. Anais do XIII Simpósio de Engenharia de Produção. Bauru: UNESP, 2006. Disponível em: < [http://www.simpep.feb.unesp.br/anais/anais\\_13/artigos/773.pdf](http://www.simpep.feb.unesp.br/anais/anais_13/artigos/773.pdf) >. Acesso em: 18 mar. 2012.

FONTAN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B.; TORNADIJO, M.E.; CARBALLO, J. Microbiological changes in 'San Simon' cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, v. 18, p. 25-33, 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002000903514>>. Acesso em: 28 jan. 2012.

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



FUNDAÇÃO DE ECONOMIA E ESTATÍSTICA DO RS. Resumo estatístico do RS – COREDES. Disponível em: <[http://www.fee.tche.br/sitefee/pt/content/resumo/pg\\_coredes\\_detalhe.php?corede=Fronteira%20Noroeste](http://www.fee.tche.br/sitefee/pt/content/resumo/pg_coredes_detalhe.php?corede=Fronteira%20Noroeste)>. Acesso em: 10 mar. 2012.

HAIKHANI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 2, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0307.2007.00304.x/full>>. Acesso em: 28 jan. 2012.

HAN, B-Z.; MIN LI, Y. M; YANG, Y-X; REN, F-Z.; ZENG, Q-K.; NOUT, M. J. R. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. **Food Control**, v. 18, p. 742–746, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713506000946>>. Acesso em: 28 jan. 2012.

HERNANDEZ, D.; CARDELL, E.; ZARATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p.77–84, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02576.x/pdf>>. Acesso em: 17 mai. 2010.

HERREROS, M.A.; SANDOVAL, H.; GONZALEZ, L.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). **Food Microbiology**, v. 22, p. 455–459, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002004001388>>. Acesso em: 17 mai. 2010.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365-373, 2001.

Disponível em: <<http://www.ajcn.org/content/73/2/365S.full.pdf+html>>. Acesso em: 17 ago. 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. 2010.

Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 14 jul. 2010.

JACOBSEN, C. N.; NIELSEN, V.A. R.; HAYFORD, E. ; MOLLER, P. L.; MICHAELSEN, K. F.; PARREGAARD, A. ; SANDSTRÖM, B.; TVEDE, M.; JAKOBSEN, M. Strains in humans the colonization ability of five selected by in vitro techniques and evaluation of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. screening of probiotic activities of the colonization ability of five selected strains in humans.

**Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, 1999. Disponível em: <<http://aem.asm.org/> on January 15, 2012 by guest>. Acesso em: 15 jan. 2012.

JAY, J. M.. **Microbiologia de Alimentos**/ James M. Jay. Traduzido por Eduardo Cesar Tondo... [et al.]. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JONES, R. J.; HUSSEIN, H. M.; ZAGOREC, M.; BRIGHTWELL, G.; TAGG, J. R. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. **Food Microbiology**, v. 25, p. 228–234, 2008.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002007001384>>. Acesso em: 18 jun. 2009.

KHEDID, K; FAID, M.; MOKHTARI, A.; SOULAYMANI, A.; ZINEDINE, A. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. **Microbiological Research**, v. 164, p. 81—91, 2009.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501306001327>>. Acesso em: 21 nov. 2011.

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

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.6, p.1063-1067, 2001. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v31n6/a24v31n6.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

LOPES, M.A.; CARMO, E.A.; LIMA, A.L.R.; CARVALHO, F.M. Análise de rentabilidade de uma empresa com opção de comercialização de queijo ou leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.642-647, 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v58n4/a28v58n4.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2012.

MACEDO, A. C.; TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. **Food Microbiology**, v.21, p. 233–240, 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002003000649>>. Acesso em: 12 jan. 2010.

MARTINIS, E. C. P.; PÚBLIO, M. R.P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 32-37, 2001. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s1517-83822001000100008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1517-83822001000100008)>. Acesso em: 28 mar. 2010.

MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; MEDINA, L. F. C.; BRANDELLI, A. Atividade antagonística de *Lactobacillus* frente a bactérias de importância em alimentos. In: 3º Simpósio de Segurança Alimentar, 2010, Florianópolis. **Anais do 3º Simpósio de Segurança Alimentar**. Florianópolis: SBCTA, 2010.

MILKNET, 2010. Portal Milknet. Disponível em: <<http://www.milknet.com.br>>. Acesso em: 23 jul. 2010.

MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N.; YAMAZI, A. K.; ORTOLANI, M. B. T.; NERO, L. A. Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. **Foodborne pathogens and disease**, v. 6, n. 2,

2009. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2008.0156>>. Acesso em: 28 jan. 2012.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p. 1320-1324, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810001593>>. Acesso em: 12 fev. 2011.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p.13-126, 1999.

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

NERO, L. A.; Mattos, M. R. de; Barros, M.A. F.; Ortolani, M. B. T.; Beloti, V.; Franco, B. D. G. M. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses Public Health**, v. 55, p. 299–305, 2008.

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

NETO, G. G. L.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, supl. 2, p. 245-250, 2005. Acesso em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v57s2/28329.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2009.

NUCH, E.; GUEDES, F. F.; VARGAS, L.; KOCH, F. F. Caracterização dos queijos artesanais produzidos em Viamão, no Estado do Rio Grande do Sul, quanto à evolução físico-Química e microbiológica. **Revista Veterinária em Foco**, v. 2, n.1, 2004. Disponível em: < [http://www.ulbra.br/medicina-veterinaria/files/revista\\_v2\\_n1.pdf](http://www.ulbra.br/medicina-veterinaria/files/revista_v2_n1.pdf)>. Acesso em: 08 set. 2011.

OLIVEIRA, R. B. P.; OLIVEIRA, A. L.; GLÓRIA, M. B. A.. Screening of lactic acid bacteria from vacuum packaged beef for antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 368-374, 2008. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v39n2/a31.pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2011.

OLIVER, S.P; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdfplus/10.1089/fpd.2005.2.115>>. Acesso em: 05 dez. 2010.

ORTIGOSA, M.; ARIZCUN, C.; IRIGOYEN, A.; ONECA, M.; Torre, P. Effect of lactobacillus adjunct cultures on the microbiological and physicochemical characteristics of Roncal-type ewes'-milk cheese. **Food Microbiology**, v. 23, p. 591–598, 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002005001280>>. Acesso em: 12 jan. 2010.

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

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C.. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr./jun., 2007. Disponível em: < [www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/.../2791](http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/.../2791)> . Acesso em: 24 jan. 2010.

PERRIN, M.; BEMER, M.; DELAMATE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5308-5309, 2003. Disponível em: < <http://jcm.asm.org/content/41/11/5308.full.pdf+html>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

RANDAZZO, C.L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, p. 1–9, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701209001110>>. Acesso em: 22 nov. 2011.

RENNA, M.; GARDA, A.; LUSSIANA, C.; AMBROSOLI, R.; BATTAGLINI, L.M. Chemical, nutritional and microbiological characterization of organic Fontina PDO cheese. **Italian Journal Food Science**, vol. 21, n. 3, 2009. Disponível em: < <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=22108865>>. Acesso em: 24 nov. 2011.

REQUE, E. F.; PANDEY, A.; FRANCO, S. G.; SOCCOL, S. R.. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* lpb for use as probiotic in chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 303-307, 2000. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822000000400012](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822000000400012)>. Acesso em 24 jan. 2010.

SALOTTI, B, M.; Carvalho, A.C.F.B.; Amaral, L.A.; Vidal-Martins, A.M.C.; Cortez, A.L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.171-175, 2006. Disponível em: < [http://200.144.6.109/docs/arq/V73\\_2/salotti.PDF](http://200.144.6.109/docs/arq/V73_2/salotti.PDF)>. Acesso em: 07 dez. 2011.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; VLASSI, M.; PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salami — a microbiological ecology study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 69-82, 1998. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816059800124X>>. Acesso em: 01 dez. 2011.

SANTANA, R.F.; SANTOS, D.M.; MARTINEZ, A.C.C.; LIMA, Á.S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro**

**de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v60n6/31.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arquivo Instituto Biologia**, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, jul./set., 2010. Disponível em: < [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77\\_3/santana.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_3/santana.pdf)>. Acesso em: 18 mar. 2012.

SAWITZKI, M. C.; FIORENTINI, A. M.; BERTOL, T. M.; SANT'ANNA, E. S. *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sausages and their technological properties for application as starter cultures. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 340-345, 2009. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612009000200016&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612009000200016&script=sci_arttext)>. Acesso em: 11 jun. 2011.

SAWITZKI, M. C.; FIORENTINI, A. M.; BROD, F. C. A.; TAGLIARI, C.; BERTOL, T. M.; ARISI, A. C. M.; SANT'ANA, E. S.. Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from naturally fermented sausages. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 547-552, 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v38n3/v38n3a31.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2010.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from Meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1901-1906, 1999. Disponível em: < <http://aem.highwire.org/content/55/8/1901.full.pdf+html>>. Acesso em: 16 jan. 2012.

SENGUN, I. Y.; NIELSEN, D. S.; KARAPINAR, M.; JAKOBSEN, M. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 105–111, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050900378X>>. Acesso em: 22 nov. 2011.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, p. 691-697, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002010001292>>. Acesso em: 21 nov. 2011.

SILVEIRA, P. R. C.; TREVISAN, A. P. A produção e comercialização de queijos coloniais: Dinâmicas da validação social da qualidade. Palestra. Disponível em:< <http://www.sober.org.br/palestra/6/960.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2010.

SOLER, A.; PONSELL, C.; PAZ, M.; NUÑEZ, M. The microbiological quality of milk produced in the Balearic Islands. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 69-74, 1995. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0958694694P15999>>. Acesso em: 28 jan. 2012.

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

VELJOVIC, K. et al. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2142–2152, 2007. Disponível em: < [http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url\\_ver=Z39.88-2004&url\\_ctx\\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx\\_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx\\_ver=Z39.88-2004&fr\\_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore\\_date\\_threshold=1&rft.object\\_id=954925620153&svc.fulltext=yes](http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&fr_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=954925620153&svc.fulltext=yes)>. Acesso em: 24 jan. 2010.

VOULGARI, K.; HATZIKAMARI, M.; DELEPOGLOU, A.; GEORGAKOPOULOS, P.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. **Food Control**, v. 21, p. 136–142, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713509001273>>. Acesso em: 22 nov. 2011.

ZOCCAL, R. **Evolução da produção de leite no Rio Grande do Sul, 1990/2010** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Gado de Leite. Disponível em:



<<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/grafico02.60.php>>. Acesso em: 17 mar. 2012.