

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Avaliação de Microbiota Patogénica e Deteriorativa em Queijos Tradicionais Portugueses

**Efeito da Adição de Bacteriocinas na Sobrevivência de
*Listeria monocytogenes***

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar

Joana Isabel Gonçalves Alves

Orientadora: Professora Doutora Cristina Saraiva

Co-orientadora: Professora Doutora Alexandra Esteves



Vila Real, 2018

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Avaliação de Microbiota Patogénica e Deteriorativa
em Queijos Tradicionais Portugueses**

**Efeito da Adição de Bacteriocinas na Sobrevivência de
*Listeria monocytogenes***

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar

Joana Isabel Gonçalves Alves

Orientadora: Professora Doutora Cristina Saraiva

Co-orientadora: Professora Doutora Alexandra Esteves

Composição do júri

Presidente: Professor Doutor José António de Oliveira e Silva

Arguente: Professora Doutora Maria da Conceição Medeiros de Castro Fontes

Orientadora: Professora Doutora Cristina Maria Teixeira Saraiva

Vila Real, 2018

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

No final de mais uma etapa acadêmica, tenho muitos sentimentos a apoderarem-se de mim! Mas sem dúvida que a alegria de dever cumprido e satisfação por uma nova conquista, são os predominantes! Esta etapa durou 3 anos, difíceis, com momentos menos bons, de muito cansaço pela acumulação de trabalho e angústia quando os acontecimentos não eram favoráveis, mas também repletos de triunfos, momentos de orgulho, companheirismo, ajuda e de muitos conhecimentos adquiridos que devo e quero agradecer:

- À Professora Doutora Cristina Saraiva, minha orientadora. pela simpatia, amizade e disponibilidade constante para ajudar, esclarecer e incentivar. Foram sempre momentos agradáveis de partilha que me fazem ter certeza que a voltaria a propor como minha orientadora;

- À Professora Doutora Alexandra Esteves, minha co-orientadora, pela simpatia, disponibilidade, acompanhamento e interesse demonstrado desde o início do estudo e sempre que necessário;

- Às minha colegas Ana Catarina, Luciana e Ângela que, logo desde as primeiras semanas, me ajudaram muito, sempre simpáticas e prestáveis por eu não poder frequentar as aulas. O meu agradecimento a vocês é muito sentido e especial!;

- À D. Ana e à D. Helena, por toda a ajuda laboratorial, principalmente na fase inicial do estudo onde tudo era novo e difícil, pela experiência e conhecimentos transmitidos e pelos momentos tão bons que passámos;

- Aos meus colegas de laboratório, Ana Catarina, Miguel e Patrícia pela amizade, companheirismo, interajuda nas horas infinitas partilhadas no laboratório. Convosco o trabalho era muito mais fácil e divertido. Não posso esquecer a ajuda fundamental do André no início do estudo. Muito obrigada pela tua simpatia e disponibilidade;

- À minha família, pela força ao longo destes 3 anos e pela alegria demonstrada a cada conquista;

- Ao Ricardo, que no último ano, foi uma fonte de apoio e de constante motivação. Obrigada pela paciência, compreensão e carinho que tiveste sempre comigo. Tornaste tudo mais fácil!

A todos vocês, o meu sincero, Muito Obrigada.

RESUMO

A literatura científica tem relatado surtos e casos de toxinfecções alimentares graves associados ao consumo de vários tipos de queijos, contaminados com *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. ou *E. coli* O157:H7. Neste sentido, é essencial preservar a qualidade da matéria-prima através da inibição do desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorativos. Em queijos, uma alternativa tecnológica à preservação convencional (aditivos químicos, excesso de sal, etc.) é o uso de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas ou bactérias do ácido lático (BAL) produtoras de bacteriocinas como agentes naturais de conservação. Neste âmbito, realizou-se este trabalho experimental que implicou duas fases: inicialmente efetuou-se uma caracterização microbiológica de amostras de queijo de ovelha e de cabra ao longo do processo de produção; numa fase posterior, testou-se o efeito da adição de bacteriocinas no comportamento de *Listeria monocytogenes* inoculada em queijos de ovelha. O queijo de cabra (Empresa A) era produzido com leite pasteurizado, enquanto que o queijo de ovelha (Empresa B) era produzido com leite cru. Recolheram-se 3 lotes de amostras de queijos em 3 meses diferentes, em que cada lote incluía 5 amostras de queijos antes de ser aplicada a salga, 5 de queijos frescos e 5 de queijos maturados (30 dias após o fabrico no caso do queijo de cabra e 60 dias no caso dos queijos de ovelha). Foi efetuada a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* e a contagem de Mesófilos, Enterobactereaceae, *Escherichia coli*, Bactérias do Ácido Lático, Bolores e Leveduras em todas as amostras de queijos.

Na segunda fase do estudo, na Empresa B, foram recolhidos 3 lotes de leite, num volume adequado para a produção de queijos em laboratório. Cada lote de leite foi subdividido em três lotes, um normal e dois distintos para a adição de bacteriocinas em duas concentrações diferentes, seguindo os procedimentos normais de fabrico de queijo e seu armazenamento em ambiente de refrigeração e humidade relativa controlada.

As contagens da microbiota deteriorativa dos queijos de ovelha foram superiores aos queijos de cabra, o que realça, entre outros aspetos, a importância da aplicação da pasteurização no leite destinado ao fabrico de queijo. Relativamente à microbiota patogénica quantificada, apenas se detetaram contagens de *S. aureus* e *E. coli* superiores nos queijos de ovelha. Contudo, nos procedimentos de pesquisa, detetou-se a presença de *S. aureus* num número superior nos queijos maturados de cabra comparativamente aos de ovelha. A presença de *L. monocytogenes* foi detetada em queijos maturados de ovelha e não em queijos maturados de cabra.

Verificou-se influência através da aplicação de bacteriocinas oriundas das espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Enterococcus faecium* na redução da multiplicação de *L.*

monocytogenes quando se adicionou uma concentração de bacteriocinas mais elevada (1200 UA/ml). Em concentrações mais baixas (300UA/ml) não se verificou qualquer efeito significativo. Deste modo, concluiu-se que as bacteriocinas usadas como aditivos alimentares, poderão vir a considerar-se como alternativas tecnológicas interessantes ao uso de aditivos químicos para controlar microrganismos patogénicos e, conseqüentemente, melhorar a segurança dos produtos alimentares.

Palavras-chave: queijos; toxinfecção alimentar; bacteriocinas; *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

The scientific literature has been reporting outbreaks and cases of severe food poisoning associated with the consumption of various types of cheese contaminated with *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. or *E. coli* O157:H7. In this sense, it is crucial to preserve the quality of the raw material by inhibiting the development of pathogenic and deteriorating microorganisms. When dealing with cheeses, a technological alternative to formal preservation (chemical additives, salt excess, etc.) is the use of purified or semi-purified bacteriocins, or Lactic Acid Bacteria that produce bacteriocins as natural agents of preservation. In this context, it was carried out a two-phase experimental work: the first phase focused on the microbiological characterization of sheep and goat cheese samples during the production process; at a later stage, it was assessed the effect of adding bacteriocins on the behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated on sheep cheeses. Goat cheese (Company A) was produced with pasteurized milk, while sheep's cheese (Company B) was produced with raw milk. Three batches of sheep and goat cheese samples were collected in 3 different months, each batch comprising 5 cheese samples before salting, 5 fresh cheeses and 5 mature cheeses (30 days after production in the case of goat cheese and 60 days in the case of sheep cheeses). All cheese samples were investigated to assess the presence of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* and take counts of Mesophiles, Enterobacteriaceae, Lactic Acid Bacteria, *Escherichia coli*, Molds and Yeasts.

In the second phase of the experimental work, in Company B, 3 batches of milk were collected in a suitable volume for the production of cheeses in the laboratory. Each batch of milk was subdivided into three batches, one regular and two distinct ones in which bacteriocins were added in two different concentrations, following the normal procedures for cheese production and storage in a refrigerated environment with relative humidity.

The deteriorating microbiota counts in sheep cheeses were higher than in goat cheeses, which highlights, among other aspects, the importance of applying pasteurization in cheese-making milk. With respect to the quantified pathogenic microbiota, only higher *S. aureus* and *E. coli* counts were detected in sheep cheeses when comparing to goat cheeses. However, in the research procedures, the presence of *S. aureus* in a higher number was detected in mature goat cheeses compared to sheep cheeses. The presence of *L. monocytogenes* was only detected in aged sheep cheeses.

Through the application of bacteriocins from *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus faecium*, it was verified influence in the reduction of multiplication of *L. monocytogenes*, when a higher concentration of bacteriocins was added (1200 UA/ml). At lower

concentrations (300 UA/ml) there was no significant effect. It was thus concluded that bacteriocins used as food additives could be considered as interesting technological alternatives to the use of chemical additives to control pathogenic microorganisms and, consequently, to improve the safety of food products.

Keywords: Cheeses; Foodborne illness; Bacteriocins; *Listeria monocytogenes*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
I. 1. Enquadramento temático	1
I. 2. Toxinfecções alimentares	2
I. 2.1. Surtos e casos de toxinfecções alimentares associadas a consumo de queijos	2
I. 3. O queijo como alimento	3
I. 3.1. Enquadramento histórico e classificação.....	3
I. 3.2. Constituição do queijo.....	5
I. 3.3. Produção de queijo	6
I. 3.4. Conservação do Queijo	13
I. 4. Fatores que afetam a segurança e qualidade do queijo	14
I. 4.1. Contaminação microbiana.....	14
I. 4.2. Características físico-químicas.....	15
I. 5. Microbiota associada a queijos	16
I. 5.1. Microbiota deteriorativa	16
I. 5.2. Microbiota patogénica.....	19
I. 6. <i>Listeria monocytogenes</i> associada a queijos	24
I. 6.1. Listeriose no Homem	24
I. 6.2. Prevenção e controlo de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos	25
I. 7. Bacteriocinas	26
I. 7.1. Definição e tipo de bacteriocinas	26
I. 7.2. Biossíntese e Mecanismo de ação	28
I. 7.3. Bactérias produtoras de bacteriocinas	29
I. 7.4. O uso de bacteriocinas no fabrico de queijos	31
I. 7.5. Limitações no uso de bacteriocinas e propostas de melhoria	33
II. OBJETIVOS	37
III. MATERIAL E MÉTODOS	39
III.1. Microbiota deteriorativa e patogénica de queijos ao longo do processo da maturação	39
III. 1. 1. Colheita e transporte	39
III. 1. 2. Preparação das amostras e sementeira	39
III. 1. 3. Isolamento e contagem de colónias	40
III. 1. 4. Isolamento e Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	42
III. 1. 5. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
III.2. Efeito de bacteriocinas no comportamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijos de ovelha	43
III. 2. 1. Preparação do leite.....	43
III. 2. 2. Produção de queijo e inoculação	44
III. 2. 3. Análises microbiológicas.....	44
III. 2. 4. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	45
III. 2. 5. Obtenção da reta de calibração para <i>Listeria monocytogenes</i> e Preparação do inóculo....	45

III. 2. 6. Cocktail de bacteriocinas	46
III. 2. 7. Medição de pH e aw	46
III. 3. Análise estatística	46
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
IV.1. Microbiota deteriorativa e patogénica de leites e queijos de ovelha e de cabra ao longo do processo da maturação	47
IV.2. Efeito de bacteriocinas no comportamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijos de ovelha	61
V. CONCLUSÃO	69
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXOS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Processo genérico de fabrico do queijo.....	7
Figura 2: Início do processo de coagulação do leite	8
Figura 3: Corte da coalhada	9
Figura 4: Dessoramento da coalhada.....	10
Figura 5: Coalhada antes de ser colocada em moldes	11
Figura 6: Moldagem do queijo em formas cilíndricas.....	11
Figura 7: Prensagem dos queijos.....	11
Figura 8: Salga em salmoura.....	12
Figura 9: Queijos na câmara de maturação.....	13
Figura 10: Evolução do crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/g) ao longo do tempo, nos queijos com <i>Listeria monocytogenes</i> e nos queijos com <i>Listeria monocytogenes</i> e as duas doses de Bacteriocinas, respetivamente.....	64
Figura 11: Evolução do desenvolvimento de microrganismos deteriorativos (log UFC/g) ao longo do tempo, nos queijos controlo (C).....	65

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1: Contagens de Mesófilos, Enterobacteriaceae, <i>E. coli</i> , BAL, <i>S. aureus</i> , Bolores e Leveduras (log ufc/ml, média e desvio padrão) em leites ao longo do período de armazenamento nas Empresas A e B.....	47
- Tabela 2: Contagens de Mesófilos (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas empresas A e B.....	48
- Tabela 3: Contagens de BAL (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas empresas A e B.....	49
- Tabela 4: Contagens de Enterobacteriaceae (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas empresas A e B.....	50
- Tabela 5: Contagens de <i>E. coli</i> (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas empresas A e B.....	51
- Tabela 6: Contagens de Bolores (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas empresas A e B.....	53
- Tabela 7: Contagens de Leveduras (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas empresas A e B.....	54
- Tabela 8: Contagens de <i>Staphylococcus aureus</i> (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas empresas A e B.....	55
- Tabela 9: Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> (nº de amostras positivas) em queijos ao longo do período de armazenamento nas empresas A e B.....	57
- Tabela 10: Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> (nº de amostras positivas) em queijos ao longo do período de armazenamento nas empresas A e B.....	59
- Tabela 11: Contagens de <i>Listeria monocytogenes</i> (log ufc/g, média e desvio padrão) nos queijos produzidos em laboratório inoculados apenas com <i>Listeria monocytogenes</i> (LM) e com a associação de <i>Listeria monocytogenes</i> com bacteriocinas nas doses 1 e 2 (LMB1 e LMB2), ao longo do período de armazenamento.....	61
- Tabela 12: Contagens dos microrganismos deteriorativos (log ufc/g, média e desvio padrão) nos queijos controlo (C) ao longo do período de armazenamento.....	66
- Tabela 13: Valores de pH e a_w das amostras Controlo, armazenadas a 8°C.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

INE – Instituto Nacional de Estatística

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Point

EFSA – European Food Safety Authority

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed

DOP – Denominação de Origem Protegida

HTST - High Temperature Short Time

LTLT – Low Temperature Long Time

a_W – Water activity

BAL – Bactérias do Ácido Lático

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

FAO – Food and Agriculture Organization

OMS – Organização Mundial de Saúde

ABC – ATP Binding Cassette

C – Queijos controlo negativo

LM – Queijos inoculados com *Listeria monocytogenes*

LMB1 – Queijos inoculados com *Listeria monocytogenes* e bacteriocinas na concentração 1

LMB2 – Queijos inoculados com *Listeria monocytogenes* e bacteriocinas na concentração 2

BHI – Brain Heart Infusion

DO – Densidade Ótica

FDA – Food and Drug Administration

I. INTRODUÇÃO

I. 1. Enquadramento temático

A indústria de produção de queijo constitui um grande setor em todo o mundo, englobando queijos produzidos a nível regional caracterizados por uma grande diversidade (Fox *et al.*, 2004), englobando queijos produzidos em diferentes regiões caracterizados por uma grande diversidade. Em Portugal, os dados do INE (Instituto Nacional de Estatística) de 2013 mostram que a produção total de queijos decresceu 3,3%, exceto a produção do queijo de mistura, a qual aumentou 7,1% (INE, 2014). Entretanto, em 2015 a tendência de decréscimo da produção total de queijos manteve-se apesar de menor (1,7%) com uma subida, também inferior, da produção do queijo de mistura (6,4%). Refira-se contudo que a produção de queijo de ovelha revelou uma tendência crescente de 0,6% (INE, 2016).

Existem, no entanto, bactérias patogénicas que podem ser transmitidas por estes produtos lácteos. A literatura científica tem relatado surtos de toxinfecções alimentares graves associados ao consumo de vários tipos de queijo (Kousta *et al.*, 2010). Os agentes de doença mais referidos são, entre outros, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. (Buncic, 2006).

O fabrico de queijo encontra-se bem regulado na Comunidade Europeia. A produção é controlada pelo Regulamento Europeu 852/2004 que se aplica diretamente para os Estados-Membros (RE 852, 2004). A aplicação de critérios microbiológicos é usada para avaliar a segurança do alimento, verificar a aplicação de boas práticas de higiene e de fabrico e manter a qualidade de alimentos perecíveis durante a sua vida útil comercial. A aplicação destes critérios pode ser útil para assegurar a confiança do consumidor em relação à segurança alimentar desse produto (Michelle Smoot L. e Pierson Merle D., 1997).

Para reduzir o risco de ocorrência de toxinfecções alimentares devem ser aplicados esforços e Boas Práticas de fabrico com o fim de melhorar a higiene na indústria e explorações destinadas à produção de queijo, tais como a aplicação de um plano baseado no sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point), controlo da temperatura durante o arrefecimento e transporte do leite, controlo regular da saúde animal, entre outros (Brooks *et al.*, 2012). Estes procedimentos devem ser contínuos com vigilância permanente e diligente (Melo *et al.*, 2015), por forma a garantir que o consumidor adquire produtos seguros.

I. 2. Toxinfecções alimentares

O número crescente e a gravidade das toxinfecções alimentares a nível mundial têm levado a um aumento considerável do interesse do público e das entidades governamentais em relação à segurança alimentar. Qualquer pessoa poderá contrair este tipo de doenças, geralmente de natureza infecciosa ou tóxica, provocadas por agentes que entram no organismo através da ingestão de alimentos (Forsythe , 2002). Os sintomas clínicos mais frequentemente associados são os típicos de uma gastroenterite, que podem ser devido a diferentes agentes patogénicos, incluindo bactérias e vírus. Normalmente, o período de incubação é curto, de 1-2 dias a uma semana, podendo ser observados diferentes níveis de gravidade, desde sintomas ligeiros (dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e febre) que não requerem tratamento médico, até situações de doença mais graves que implicam hospitalização, incapacidade a longo termo e até a morte (Forsythe , 2002). O resultado da exposição a agentes patogénicos de toxinfecções alimentares depende de fatores relacionados com o hospedeiro, incluindo o seu sistema imunitário, estado nutricional, idade assim como a outros fatores específicos do alimento e do microrganismo (Jouve *et al.*, 1999). Nas toxinfecções alimentares será necessário que o microrganismo patogénico se encontre em quantidade suficiente para causar uma infeção e/ou para produzir toxinas em quantidade suficiente. Assim, o alimento não só permite a multiplicação dos microrganismos patogénicos como serve de substrato à produção de toxinas em quantidade suficiente, de modo a ultrapassar o limiar de suscetibilidade do consumidor (Forsythe , 2002).

I. 2.1. Surtos e casos de toxinfecções alimentares associadas a consumo de queijos

A literatura científica tem relatado surtos e casos de toxinfecções alimentares graves associados ao consumo de vários tipos de queijos (Kousta *et al.*, 2010). Na literatura está bem documentado que os surtos de origem alimentar causados pelo consumo de diferentes tipos de queijo estão mais frequentemente relacionados com a presença de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. ou *E. coli* O157:H7 (Araujo *et al.*, 2002; Foschino *et al.*, 2002; Haeghebaert *et al.*, 2003; Conedera *et al.*, 2004). A presença dessas bactérias patogénicas em queijos de leite cru ou queijos que sofrem contaminação após a pasteurização representam uma ameaça eminente para a saúde humana (Kousta *et al.*, 2010). Durante muitos anos, o consumo de queijos de leite cru tinha sido apenas esporadicamente associado a doenças de origem alimentar. No entanto, nas últimas duas décadas, a segurança no consumo de queijo de leite cru tem sido questionada devido à ocorrência de vários surtos de doenças tanto na europa como nos EUA (Brooks *et al.*, 2012).

Segundo dados da EFSA (European Food Safety Authority), em 2015, foram notificados 53 surtos de doença de origem alimentar através do consumo de queijo, nos Estados-membros da União Europeia. O agente mais prevalente apontado foi *Salmonella*, não havendo nenhum registo de surto causado por *Listeria* (EFSA, 2017). Segundo a ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica), em 2011, os Estados-membros reportaram à EFSA, 1476 casos confirmados de listeriose em humanos, o que representa um decréscimo de 7,8% comparativamente com o ano 2010. O mesmo relatório refere que Portugal foi o único país a não reportar casos de listeriose em humanos. Apesar de não ser considerada por muitos autores uma das toxinfecções alimentares com o maior número de casos, é a doença mais grave no que respeita a hospitalização e casos fatais (12,7%). Em 2011, verificou-se um total de 134 casos de mortes devido a listeriose, reportadas por 19 Estados-membros. Entre o ano 2008 e 2012 foram divulgadas através do RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) 94 notificações relacionadas com deteção de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos, contudo apenas 4 estavam relacionadas com toxinfecção alimentar. Entre 2008, 2009 e 2011 foi reportada unicamente 1 caso humano de listeriose por cada ano, com sintomas gastrointestinais e gripais. Em 2010, foi reportado 1 surto de listeriose em que foram afetadas 17 pessoas no total, tendo 3 sido fatais por meningite. Todas as notificações registadas estiveram associadas a queijo (Ferreira, 2013).

I. 3. O queijo como alimento

I. 3.1. Enquadramento histórico e classificação

O queijo é um dos alimentos preparados mais antigos que a história da humanidade regista. A arte do fabrico de queijos teve o seu início num passado muito remoto, milhares de anos antes do nascimento de Cristo. Os egípcios foram dos primeiros povos que cuidaram do gado e tiveram no leite e no queijo uma fonte importante da sua alimentação. Na Europa, os gregos foram os primeiros a adotar o queijo como alimento, feito exclusivamente com leite de cabra e de ovelha. Entretanto, os romanos, na expansão do seu Império, foram os responsáveis pela maior divulgação mundial dos queijos (Rehm e Reed, 1983; Blom e Weréen, 2002; Perry, 2004). A produção em massa de queijo teve início no século XIX, com a abertura da primeira fábrica de queijo nos EUA, em 1851, no estado de Nova York. No entanto, a indústria de queijos só se instalou na Europa no início do século XX, com a abertura da primeira grande queijaria em França, sendo este o país que mais se dedicou ao fabrico e ao consumo de queijo, permanecendo

como um dos principais países produtores do mundo, ao lado de Itália, Dinamarca, Alemanha, Suíça e Inglaterra (Perry, 2004).

É particularmente interessante referir que uma grande variedade de queijos surgiu associada a um acidente determinado por circunstância local (composição do leite, microbiota endógena, espécie e raça do animal) ou devido a um único evento durante a tentativa de produção ou stock do queijo (crescimento de bolores ou outros microrganismos) (de Paula *et al.*, 2009).

Existem pelo menos 1000 variedades de queijos, sendo que as principais variedades são representadas pelos queijos Holandeses, Suíços, Cheddar e Parmesão, representando mais de 80% da produção mundial (de Paula *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, as variedades de queijos eram produzidas numa determinada região, delimitada geograficamente, em especial em áreas montanhosas. Essa produção local de algumas variedades é ainda preservada através da DOP (Denominação de Origem Protegida).

O queijo Serra da Estrela é o mais famoso queijo fabricado em Portugal. A tecnologia que lhe está associada é única, na qual o leite de ovelha cru de uma raça autóctone (Bordaleira da Serra da Estrela) é coagulado com coalho vegetal (*Cynara cardunculus*, L.) sem adição intencional de qualquer cultura de arranque. Em termos das suas características microbiológicas são as bactérias lácticas os grupos predominantes neste queijo no momento do consumo (normalmente após 45-60 dias de maturação) (Macedo *et al.*, 2004).

Por definição e segundo a Portaria N°73/90, queijo é o produto fresco ou curado, de consistência variável, obtido por coagulação e dessoramento do leite ou do leite total ou parcialmente desnatado, mesmo que reconstituído e também da nata, do leitelho, bem como da mistura de alguns ou de todos estes produtos, incluindo o lactosoro, sem ou com adição de outros géneros alimentícios.

Esta portaria estabelece ainda a classificação dos queijos e determina os ingredientes que podem ser adicionados durante o seu fabrico. Assim, quanto à cura, o queijo pode ser classificado como:

- Queijo curado – produto que só se encontra apto para consumo depois de mantido, durante certo tempo, em condições determinadas de temperatura, humidade e ventilação que permitam modificações físicas e químicas próprias;
- Queijo curado pela ação de bolores – o produto cujas características são devidas essencialmente à proliferação de bolores específicos no interior ou à superfície do queijo;
- Queijo fresco – o produto obtido por coagulação e dessoramento do leite por fermentação látea, com ou sem adição de coalho e não submetido a um processo de cura.

Quanto à composição, a portaria classifica em duas categorias:

- Queijo sem adição de géneros alimentícios diferentes do queijo e
- Queijo com adição de géneros alimentícios diferentes do queijo.

Na categoria da consistência, a classificação é feita tendo em conta a percentagem de humidade para cada tipo de queijo. Assim:

- Queijo extra-duro, com humidade inferior a 50%;
- Queijo pasta dura, com humidade de 49% a 56%;
- Queijo de pasta semi-dura, com humidade de 54% a 63%;
- Queijo de pasta semi-mole, com humidade de 61% a 69%;
- Queijo de pasta mole superior a 67%.

A classificação quanto a matéria gorda é feita em função da percentagem desta no extrato seco.

Desta forma, o queijo é classificado em:

- Muito gordo ou extra-gordo, com matéria gorda superior a 60%;
- Gordo, com matéria gorda de 45% a 60%;
- Meio-gordo, com matéria gorda de 25% a 45%;
- Pouco-gordo, com matéria gorda de 10% a 25%;
- Magro, com matéria gorda inferior a 10% (Portaria N 73/90, 1990).

Para além das características descritas existem atributos específicos, como estrias, colorações, formações de crosta, orifícios internos de diferentes tamanhos e formatos, assim como, transformações no interior e exterior do queijo, odores e sabores diferentes, que os tornam distintos em vários aspetos (Fehlhaber e Janetschke P., 1995).

I. 3.2. Constituição do queijo

O queijo consiste principalmente numa associação de gordura de leite e um conjunto de proteínas coaguladas (Little *et al.*, 2008).

O queijo apresenta-se como uma excelente alternativa ao leite, nomeadamente nos casos de intolerância à lactose, uma vez que mantém algumas das suas características nutricionais. Uma pequena quantidade de queijo contém proteína e cálcio em quantidades suficientes para substituir um copo de leite. No entanto, a maioria dos queijos destaca-se pelo teor de proteínas, minerais e algumas vitaminas (Pinho e Ferreira, 2006).

O teor de aminoácidos essenciais das proteínas dos queijos confere-lhes um alto valor biológico e uma digestibilidade próxima de 95%. Por outras palavras, as proteínas dos queijos são

absorvidas quase integralmente e fornecem ao organismo os aminoácidos essenciais. A quantidade de hidratos de carbono é reduzida (Pinho e Ferreira, 2006). Os lípidos dos queijos encontram-se sob a forma de emulsão, aumentando assim a sua digestibilidade. São compostos de uma mistura maioritária de ácidos gordos saturados, mas também mono e polinsaturados. A gordura exerce um papel preponderante na geração do flavor e textura dos queijos. Um excesso de gordura origina uma coagulação mais lenta, maior período de maturação, maior rendimento, pouca resistência a ambientes desfavoráveis, enquanto que pouca gordura dá origem a um queijo de pasta dura e retarda o período de maturação (Pinho e Ferreira, 2006). O queijo é ainda um alimento rico em vitaminas lipossolúveis, como as vitaminas A, D, E, e K. O teor de vitaminas hidrossolúveis (principalmente a B2 e a B12) varia consideravelmente dependendo do tipo de queijo. Os sais minerais são também uma parte importante da sua constituição, sendo uma fonte de cálcio e fósforo (Scott, 1991).

I. 3.3. Produção de queijo

O processo de fabrico de queijo começa com a seleção do leite, tendo em atenção as suas características microbiológicas e químicas. É essencial que o leite esteja livre de antibióticos e quanto melhor a sua qualidade microbiológica, maior será possibilidade de sucesso na produção do queijo. O leite é normalmente refrigerado a 4°C imediatamente após a ordenha (Buncic, 2006). O leite representa uma excelente fonte de nutrientes para as bactérias de ácido láctico que utilizam o seu açúcar (lactose) como fonte de energia para produzir ácido láctico (Brooks *et al.*, 2012). A produção de queijo é basicamente um processo de concentração do leite, no qual, parte dos componentes sólidos, principalmente proteína e gordura, são concentrados na coalhada, enquanto que as proteínas do soro, lactose e sólidos solúveis são removidos no soro. Este último corresponde à porção aquosa que se separa da massa durante a produção de queijo e que retém cerca de 55% dos nutrientes do leite. Aproximadamente 85 a 90% do volume de leite utilizado no fabrico de queijos resulta em soro, muitas vezes aproveitado para a produção de requeijão. O rendimento de produção e a composição centesimal do queijo são determinados pelas propriedades do leite, especialmente pela composição e pelas etapas do processo de fabrico (Buncic, 2006). Aproximadamente 30% da produção mundial de leite destina-se ao fabrico de queijos (de Paula *et al.*, 2009).

De uma forma geral, para o fabrico de queijo seguem-se as várias etapas representadas na Figura 1.



Fig.1: Processo genérico de fabrico de queijo

I. 3.3.1. Aquecimento do leite

O leite é aquecido até se atingir a temperatura pretendida, que varia conforme o tipo de queijo e o uso ou não de tratamento térmico, caso se trate de leite cru ou de leite pasteurizado.

A pasteurização do leite para o fabrico de queijos pode ser realizada pelo processo rápido em permutadores de calor a placas, HTST (High Temperature Short Time) - 72 a 75°C por 15 segundos, ou pelo processo lento, LTLT (Low Temperature Long Time) - 65°C por 30 minutos. O objetivo da pasteurização é aumentar a segurança alimentar do queijo pela destruição de bactérias patogénicas e diminuição do número de bactérias deteriorativas do leite. Esse tratamento térmico modifica a microbiota do leite e em consequência a microbiota do queijo, facilitando o seu fabrico com maior uniformidade, podendo, no entanto, prejudicar a aptidão do leite para a coagulação. O queijo, quando fabricado com leite pasteurizado, apresenta sabor e aroma menos intensos e matura mais lentamente do que aqueles que são fabricados com leite cru,

dadas as várias modificações que são provocadas pelo calor como: inativação de enzimas naturais do leite (lipases e proteases), inativação de grande parte da microbiota endógena, desnaturação de proteínas, entre outras (Buncic, 2006).

Os produtores de queijo utilizam frequentemente leite cru ao leite pasteurizado destinado à produção de queijo, considerando-o essencial para o bom sabor, principalmente devido à maior proteólise e lipólise pela microbiota do leite cru no queijo. Alguns queijos também são produzidos com leite submetido a uma temperatura de sub-pasteurização (57-68°C por 15 s) com o fim único de eliminar a microbiota deteriorativa (Little *et al.*, 2008).

I. 3.3.2. Adição de coalho e outros ingredientes

Após o tempo de aquecimento, adiciona-se o coalho para promover a coagulação do leite (Rodrigues, 2014). De seguida, o leite mantém-se em repouso até se formar a coalhada (Figura 2).

À coalhada produzida podem ser introduzidos condimentos para produzir queijos de diferentes aromas e texturas. Podem também ser adicionados *starters* para favorecer a ação do coalho, drenar mais facilmente o soro, inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, assim como contribuir para a maturação do queijo (Buncic, 2006).



Fig. 2: Início do processo de coagulação do leite

De seguida, efetua-se o corte da coalhada e novo repouso (Figura 3) de curta duração (Rodrigues, 2014).



Fig. 3: Corte da coalhada

I. 3.3.3. Coagulação

O processo de **coagulação** referido é produzida pela ação enzimática do coalho sobre o leite e reflete a mudança na estrutura das micelas de caseína, a qual pode ser enzimática (pelas enzimas proteolíticas), ácida (através da diminuição do pH do leite) ou mista (conjugação das duas) (Rodrigues, 2014).

A **coagulação enzimática** é composta por três fases distintas que se sobrepõem, a proteólise, a agregação e a gelificação. A proteólise consiste na degradação das proteínas por enzimas proteolíticas, principalmente as caseínas, do qual resultam péptidos e/ou aminoácidos livres. A proteólise é a principal responsável pelas propriedades de textura, como a dureza, elasticidade, coesão, adesividade, fraturabilidade e confere propriedades emulsionantes (Moreira, 2011). A gelificação do leite é uma fase muito importante no fabrico do queijo, marca o final da coagulação do leite com o momento do corte da coalhada, podendo influenciar o rendimento em queijo de uma forma bastante significativa. Se a coalhada é cortada quando se encontra muito mole, a perda de gordura e formação de partículas finas de coalhada resultam num baixo rendimento em queijo. Se, pelo contrário, a coalhada é cortada muito firme, a sinérese é atrasada, resultando num queijo com elevado teor de humidade, obrigando a um maior tempo de maturação do queijo (Rodrigues, 2014).

O aumento da temperatura torna mais rápida a formação da coalhada, com maior interação da parte hidrofóbica nas fases de agregação e gelificação da coagulação do leite (McMahon e Brown, 1984).

A **Coagulação ácida** acontece quando uma quantidade suficiente de ácido láctico é produzida de forma a conduzir o pH do leite ao ponto isoelétrico das proteínas (4,6) (Brooks *et al.*, 2012). A diminuição do pH apresenta uma elevada importância na compressão do coalho e na eliminação do soro, assim como na consistência e maturação do queijo (Fox *et al.*, 2004). Esta

coagulação depende de diversos fatores, como a concentração de proteínas, as condições e os agentes de acidificação, a temperatura, a velocidade da acidificação e o pH no final da fermentação (Barros, 2012).

Por último, a **coagulação mista**, é uma junção dos dois anteriores processos de coagulação descritos, podendo ser predominantemente ácida ou enzimática. Quando é predominantemente ácida, adiciona-se um pouco de coalho para melhorar um pouco a qualidade da coalhada e, quando é predominantemente enzimática, o comportamento é intermédio entre os dois tipos de coagulação. Na maioria dos fabricos de queijo, a coagulação é efetuada por via enzimática, por vezes acompanhada por acidificação, não suficiente, no entanto, para promover, só por si, a coagulação (Barros, 2012).

I. 3.3.4. Dessoramento e Prensagem

No final do período de repouso faz-se o dessoramento da coalhada, ou seja, retira-se-lhe o soro (Figura 4). De seguida, transfere-se a coalhada, já sem soro, para a mesa de apoio onde é colocada em moldes, levando-os posteriormente à prensa (Figuras 5, 6 e 7).

Os moldes são prensados de ambos os lados com igual duração de tempo (Rodrigues, 2014).



Fig. 4: Dessoramento da coalhada



Fig. 5: Coalhada antes de ser colocada em moldes



Fig.6: Moldagem do queijo em formas cilíndricas



Fig. 7: Prensagem dos queijos

I. 3.3.5. Salga

Após o dessoramento e prensagem, a coalhada já bem compacta é retirada dos moldes, para se prosseguir para a salga (Figura 8).

O uso de sal para prolongar a vida útil dos alimentos teve início na pré-história e é um dos métodos mais clássicos utilizados na preservação do alimento. A salga tem grande influência na etapa final da produção, a maturação, uma vez que, se não for bem conduzida, pode afetar seriamente as características microbiológicas e enzimáticas dos queijos e ser a causa de diversos defeitos nos mesmos (Buncic, 2006).

Os métodos mais comuns de salga são: a adição de sal no leite ou na coalhada em salmoura e a seco. O sal desempenha, simultaneamente, um conjunto de funções importantes - melhora e realça o sabor e mascara sabores estranhos. O sal atenua o sabor láteo da coalhada fresca e mascara a lipólise; auxilia na formação da casca do queijo pela desidratação superficial; promove, pela modificação da pressão osmótica, a sinérese da massa, estimulando a expulsão de

soro e a redução da humidade do queijo, pois favorece a libertação da água livre da massa. Ao penetrar na massa do queijo, o sal utiliza a água livre para a sua dissolução e parte dessa água é deslocada para a casca, a fim de manter o equilíbrio osmótico, acabando por se perder externamente. A salga ajuda, ainda, a controlar o desenvolvimento e atividade microbiana, proporcionando uma seleção da microbiota do queijo, além de que a atividade enzimática nos queijos é fortemente controlada pela presença de sal - lipases e proteases são mais ativas em teores de 0,5 a 2,5% de sal. Ao nível da maturação, níveis mais elevados de sal tendem a retardá-la, pelo que normalmente, os queijos são salgados apenas quando atingem uma fermentação adequada, pois, caso contrário, haverá inibição das bactérias usadas como fermentos.

Por fim, teores de sal superiores a 5% favorecem a solubilização da caseína na maturação, devido a trocas entre cálcio e sódio. A proteína aumenta a sua interação com a água, tornando-a menos disponível para os processos bioquímicos provocando uma diminuição da atividade de água durante a maturação, levando a alterações na textura, solubilidade e provavelmente na conformação da proteína (de Paula *et al.*, 2009).



Fig. 8: Salga em salmoura

I. 3.3.6. Maturação

Por fim, colocam-se os queijos frescos nas câmaras de cura (Figura 9), onde ocorre o processo de maturação (Rodrigues, 2014).

A **maturação** é uma etapa em que o queijo é mantido sob determinadas condições de temperatura e humidade relativa controladas, quando ocorrem numerosas modificações microbiológicas, bioquímicas, físicas e químicas. A grande maioria dos queijos coagulados enzimaticamente com uso de coalhos ou coagulantes são maturados ou curados por um período de tempo que varia de três semanas até mais de dois anos. Durante este período ocorrem três eventos bioquímicos primários: o metabolismo da lactose, o metabolismo das proteínas e o metabolismo dos lípidos,

conhecidos por glicólise, proteólise e lipólise, respetivamente. Estas reações primárias são as responsáveis pelas alterações ocorridas durante a cura que mais determinam a textura e o desenvolvimento do “flavour” básico dos queijos (Alvarenga, 2008).

O fabrico de queijo a partir de leite cru só é permitido quando o mesmo é maturado por um período mínimo de 60 dias a temperaturas superiores a 5°C (Buncic, 2006).



Fig. 9: Queijos na câmara de maturação

I. 3.4. Conservação do Queijo

A capacidade de conservação do queijo é em grande parte conseguida através do controlo do pH e da atividade da água. Outras propriedades intrínsecas do queijo, como o potencial redox, a presença de compostos antimicrobianos, em conjunto com a duração de maturação do produto acabado e o armazenamento a uma temperatura e humidade controladas constituem um sistema de barreira de conservação que atuam como passos de controlo para inibir o desenvolvimento de bactérias patogénicas e deteriorativas (Little *et al.*, 2008).

O acondicionamento também exerce papel importante na conservação de alimentos. A embalagem com diferentes concentrações de gases em atmosfera modificada visa prolongar a vida de prateleira do queijo, assim como melhorar a qualidade microbiológica, resultando num produto menos propício à ação microbiana. A atmosfera modificada pode ser a 100% de dióxido de carbono ou a 70% de dióxido de carbono com 30% de nitrogénio (Okura *et al.*, 2006).

As embalagens tradicionais necessitam de melhorias para aumentar a vida de prateleira dos produtos alimentares e atender às exigências dos consumidores por produtos seguros, saudáveis e com menos conservantes. Neste sentido, as embalagens ativas têm sido utilizadas para aumentar a validade, melhorar as características sensoriais, evitar a deterioração microbiológica e química, garantindo a segurança dos alimentos, inibindo a multiplicação de microrganismos patogénicos.

Dentro das embalagens ativas, as películas, revestimentos, bolsas antimicrobianas e antioxidantes e as películas aromáticas merecem destaque (Ferreira Soares *et al.*, 2009).

Uma alternativa tecnológica à preservação convencional do queijo com aditivos químicos ou excesso de sal é o uso de bacteriocinas ou de bactérias produtoras de bacteriocinas como culturas iniciais, protetoras ou adjuvantes. As bacteriocinas, além de reduzir a intensidade do tratamento térmico necessário, são consideradas as alternativas mais adequadas aos conservantes químicos porque são inofensivos para as células eucariotas e são facilmente digeridas por enzimas proteolíticas devido à sua natureza proteica. Neste sentido, a aplicação de bacteriocinas, em combinação com outros tratamentos convencionais, pode dar origem a alimentos mais naturalmente conservados, ricos em propriedades sensoriais e nutricionais (Favaro *et al.*, 2015; Aspri *et al.*, 2017).

I. 4. Fatores que afetam a segurança e qualidade do queijo

I. 4.1. Contaminação microbiana

A contaminação do queijo com agentes patogénicos pode ocorrer em várias etapas, daí ser necessária toda a informação sobre as fontes principais de agentes patogénicos e suas características, o conhecimento sobre os veículos e vias de contaminação e dados quantitativos sobre a recontaminação, por forma a estabelecer com precisão uma análise de risco microbiológico (Kousta *et al.*, 2010). A contaminação microbiana de queijo, durante a sua produção, pode ter origem em diferentes fontes, tais como: culturas de arranque, salmoura, pavimento e qualquer material de contacto incluindo o material de acondicionamento, panos utilizados no fabrico de queijo, faca de corte da coalhada, atmosfera de produção (Tondo *et al.*, 2000; Donaghy *et al.*, 2004; André *et al.*, 2008; D'Amico e Donnelly, 2010). Por outro lado, as câmaras de refrigeração têm demonstrado ser possível fonte de contaminação por *L. monocytogenes* de queijos feitos com leite pasteurizado. Os manipuladores foram também apontados como veículo de contaminação do queijo com bactérias patogénicas, como *S. aureus* (Brito *et al.*, 2008; D'Amico e Donnelly, 2010).

O leite não pasteurizado tem sido referido como uma origem de toxinfecções alimentares ao longo da história da indústria de laticínios. Vários estudos têm detetado agentes patogénicos em leite cru e demonstrou-se que o leite cru funciona como potencial elemento de contaminação de queijos. Embora os dados sobre a qualidade do leite e a incidência de agentes patogénicos no

mesmo, quando proveniente de grandes explorações leiteiras estejam bem documentados, há poucos dados na literatura sobre a prevalência e identificação de agentes patogénicos no leite cru utilizado para a produção de queijos a nível artesanal (D'Amico e Donnelly, 2010; Kousta *et al.*, 2010).

Por outro lado, trabalhos anteriores demonstraram que o leite cru destinado ao fabrico de queijo pode ter boas características microbiológicas com baixa incidência de microrganismos patogénicos (D'Amico e Donnelly, 2010). Embora a pasteurização eficiente do leite (alta temperatura / tempo curto - 72°C durante pelo menos 15 segundos ou de baixa temperatura / tempo – 63°C durante pelo menos 30 minutos) tenha como finalidade eliminar o risco de organismos patogénicos vegetativos viáveis, é também possível produzir queijo de forma segura com leite cru (Little *et al.*, 2008). Refira-se, contudo, que análises das características microbiológicas do leite cru e queijo feito de leite cru revelaram níveis de segurança variável. Amostras de leite cru podem apresentar características comparáveis com leite pasteurizado ou apresentarem valores positivos na pesquisa de vários patogénicos (Giannino *et al.*, 2009; Brooks *et al.*, 2012).

Foram relatados casos em que o leite foi inoculado com bactérias patogénicas e demonstrou-se que alguns agentes podem sobreviver ao processo de fabrico e/ou ao período de maturação de 60 dias (Brooks *et al.*, 2012), o que prova que este procedimento não é eficiente na obtenção de queijo maturado através de leite cru em qualquer circunstância.

Não há evidência de que o risco de o leite de cabra ou ovelha não pasteurizado é mais baixo comparativamente com outras espécies animais. Os microrganismos patogénicos podem contaminar o leite, quer por contaminação fecal ou por excreção direta do úbere com o leite (Foschino *et al.*, 2002; Zweifel *et al.*, 2005).

Para evitar a contaminação do leite cru na exploração, as boas práticas agrícolas (por exemplo, gestão de resíduos, tratamento de água, boas condições de higiene durante a ordenha e controlo de mastites) são essenciais para evitar a acumulação, sobrevivência e transmissão de agentes patogénicos. A prevalência de agentes patogénicos em leite cru é influenciada por inúmeros fatores como o tamanho da exploração e número de animais, localização geográfica, estação do ano, entre outros (Kousta *et al.*, 2010).

I. 4.2. Características físico-químicas

O pH é um dos parâmetros mais críticos no que diz respeito à segurança alimentar e ao controlo de qualidade do processo de fabrico do queijo. A sua determinação é importante para caracterizar

os queijos devido à sua influência na textura, atividade microbiana e maturação, pois existem reações químicas catalisadas por enzimas derivadas de coalho e microbiota, que dependem do pH (Watkinson *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2014).

O leite tem um pH próximo de 6,8, o que significa que, em termos de pH é um meio adequado à multiplicação da maioria das bactérias. A redução do pH do queijo, para valores entre 4,5 e 5,5 contribui para a prevenção do desenvolvimento de bactérias patogênicas e da maioria dos microrganismos envolvidos na deterioração do queijo (Cabezas *et al.*, 2007).

No controlo do pH ao longo da maturação, observa-se uma fase inicial de diminuição do pH, correspondente ao consumo da lactose e à produção de ácido láctico pela ação das bactérias do ácido láctico (quer sejam nativas quer sejam adicionadas) que apresenta uma elevada importância na compressão do coalho e na eliminação do soro; e uma fase final da cura, em que se verifica um aumento de pH, atribuído à utilização do ácido láctico e formação de produtos neutros ou alcalinos. A diminuição de pH observado na fase inicial da cura é mais evidente em queijos obtidos a partir de leite cru do que em queijos obtidos a partir de leite pasteurizado, em que são utilizadas culturas de arranque (Watkinson *et al.*, 2001).

A **atividade da água (a_w)** é um parâmetro importante para o desenvolvimento microbiano. Os queijos com maior a_w apresentam uma maior tendência para se deteriorarem ou para suportarem a multiplicação de microrganismos patogênicos, dado que constituem um meio mais favorável do que os queijos com a_w mais baixa.

A a_w vai decrescendo quando passamos de um queijo de pasta mole (por ex: 0,95) para um queijo de pasta dura (por ex: 0,85), fator que reforça a proteção do produto relativamente à multiplicação de microrganismos. Nos queijos com baixa a_w multiplicam-se preferencialmente leveduras e bolores (Fox, 2000).

I. 5. Microbiota associada a queijos

I. 5.1. Microbiota deteriorativa

I. 5.1.1. Mesófilos

Os microrganismos mesófilos desenvolvem-se a uma temperatura média de 30°C (Siqueira, 1995). A determinação dos microrganismos aeróbios totais a 30°C baseia-se no pressuposto que cada célula, na presença de nutrientes adequados, se replica e forma uma colónia visível. Embora não seja uma medida da população bacteriana total, nem permita diferenciar por tipo de

microrganismo, é uma determinação genérica para microrganismos como bactérias, bolores e leveduras, que se multiplicam a temperaturas intermédias e que se desenvolvem de forma aeróbia (Downes e Ito, 2001).

O teor de microrganismos aeróbios mesófilos (contagem em placa) encontrado num alimento tem sido um dos indicadores microbiológicos de qualidade mais utilizados, a fim de verificar a aplicação de boas práticas de fabrico e obter informações sobre matérias-primas, condições de processamento, de armazenamento e de manipulação dos alimentos. Esta determinação permite também determinar a sua vida útil provável (Siqueira, 1995; Downes e Ito, 2001).

I. 5.1.2. Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae é constituída por microrganismos que estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados na água, no solo, nas plantas e também fazendo parte da microbiota normal do trato intestinal de seres humanos e animais. Os membros dessa família são bacilos Gram negativo, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, possuem motilidade peritriquia ou são imóveis. Caracterizam-se em termos bioquímicos, pela capacidade de reduzir nitratos a nitritos, fermentar a glicose com produção de gás e/ou ácido, e serem catalase positiva e oxidase negativa. Os elementos da família Enterobacteriaceae utilizam ainda vários mecanismos para aderir e colonizar as diferentes superfícies, como: flagelos, fímbrias, pili, cápsula e adesinas altamente especializadas. Essas estruturas também constituem mecanismos de proteção frente às defesas do hospedeiro e auxiliam no processo de formação de biofilmes microbianos, os quais aumentam a capacidade de sobrevivência bacteriana (Koneman *et al.*, 2001).

A taxonomia de Enterobacteriaceae é complexa e tem passado por muitas alterações com a inclusão de novos grupos e novas designações. Nesta família, os géneros mais frequentes são *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. (Koneman *et al.*, 2001).

Essas bactérias podem estar associadas a infeções comunitárias e hospitalares, oportunistas. No Homem, são capazes de causar doenças infecciosas como pneumonias, meningite, septicemia, infeções do trato urinário e intestinal (Koneman *et al.*, 2001). Os membros da família Enterobacteriaceae estão entre os principais agentes de infeção, particularmente, entre indivíduos imunocomprometidos. A colonização assintomática ocorre antes do estabelecimento da infeção e os microrganismos podem ter origem na microbiota autóctone ou por contaminação externa. As infeções causadas por estes agentes são reconhecidas como um problema emergente (Marra *et al.*, 2006; Al-Zarouni *et al.*, 2007).

I. 5.1.3. Bactérias do Ácido Lático (BAL)

As BAL são bactérias Gram positivo, anaeróbias facultativas e não esporuladas, com formas tanto de bacilos como cocos. O seu pH ótimo varia entre 4,0 e 4,5 (apesar de algumas espécies apresentarem capacidade de multiplicação a pH de 3,2 e outras de 9,6). Apresentam reação de catalase negativa. São microrganismos mesófilos, com temperaturas de multiplicação ótima por volta dos 30°C, no entanto algumas são capazes de se multiplicar a 5°C e outras a 42°C (Sabo *et al.*, 2014).

Estas bactérias produzem ácido lático como metabolito principal da fermentação de hidratos de carbono. Com base nos produtos da fermentação da glicose, este grupo de bactérias é dividido em homofermentativas, se o ácido lático for o único produto resultante da fermentação; ou heterofermentativas se houver produção tanto de ácido lático, como de etanol e dióxido de carbono (Jay, 2000).

Para a sua multiplicação, as BAL requerem aminoácidos, vitaminas do Complexo B, bases purinas e pirimidinas, constituindo uma população microbiana ligeiramente proteolítica e lipolítica (Jay, 2000).

As BAL são utilizadas na indústria de alimentos devido à sua capacidade para inibir ou reduzir a multiplicação de microrganismos deteriorativos ou patogênicos através da produção de vários compostos antimicrobianos. A acidificação dos alimentos - principalmente por formação de ácido lático - é provavelmente o principal mecanismo para a inibição de microrganismos indesejáveis. Reduzem o pH dos alimentos para valores próximos de 4, o que dificulta a sobrevivência de microrganismos sensíveis ao meio ácido. Esta condição conduz ao aumento da vida de prateleira do produto fermentado e a uma maior segurança alimentar, quando comparado com o não-fermentado. As BAL produzem também ácidos orgânicos, compostos de carbonilo e hidrolisam parcialmente as proteínas ou gorduras melhorando a qualidade sensorial dos alimentos.

A proliferação de BAL no queijo é muitas vezes acompanhada por compostos de texturização, capazes de melhorar a viscosidade e textura. Por outro lado, estas bactérias podem produzir bacteriocinas com aplicação na preservação de alimentos e vários compostos promotores da saúde, como vitaminas, antioxidantes e péptidos bioativos. Finalmente, são também utilizadas como culturas probióticas, conferindo propriedades organolépticas e terapêuticas em leites fermentados (Sabo *et al.*, 2014; Favaro *et al.*, 2015)

I. 5.1.4. Bolores e leveduras

Os bolores são fungos filamentosos, multicelulares, podendo estar presentes em vários produtos alimentares, no solo, ar, água e em matéria orgânica em decomposição. As leveduras são fungos não filamentosos, normalmente disseminados por insetos vetores e pelas correntes aéreas (Siqueira, 1995). Os bolores são capazes de se multiplicar numa vasta gama de alimentos, tais como, cereais, carnes, nozes, frutas, queijos e produtos derivados, e podem surgir em qualquer fase de produção de um alimento (Tournas *et al.*, 2011).

Os fungos constituem um perigo para a saúde pública devido à possibilidade de produção de micotoxinas e marcada capacidade de deterioração de alimentos. Os géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* foram referidos como os principais organismos de deterioração durante o armazenamento de uma vasta variedade de alimentos (Tharmaraj e Shah, 2009).

A presença de bolores e leveduras viáveis e em teores elevados nos alimentos pode fornecer várias informações, tais como, condições higiénicas deficitárias de equipamento, consequência de falhas no processamento e/ou armazenamento e matéria-prima com contaminação excessiva (Siqueira, 1995).

Segundo o mesmo autor, a contagem de bolores e leveduras é adequável principalmente, na análise de alimentos ácidos, com pH menor que 4,5, alimentos parcialmente desidratados e farinhas (Siqueira, 1995).

As leveduras mais presentes em laticínios são *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenni*, *Candida famata*, *Candida kefir*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica* e *Candida parapsilosis*. Por outro lado, os bolores mais comuns em queijos pertencem aos géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Geotrichum* e *Hormodendrum* (Frank, 1997).

Na indústria de produtos lácteos, os bolores e leveduras são normalmente provenientes da embalagem, do ar, da salmoura, do equipamento e das infraestruturas físicas envolventes (paredes, piso). A multiplicação de bolores e leveduras é uma causa comum de destruição e desaproveitamento de produtos lácteos dada a sua facilidade de desenvolvimento a pH baixo, capacidade de utilização da lactose ou ácido láctico e tolerância a altas concentrações de sódio. Assim, no sentido de controlar esta contaminação devem ser feitos esforços para limitar a exposição às fontes de contaminação, incluir empacotamento em atmosferas pouco aeróbias, armazenamento em refrigeração, controlo da humidade (Frank, 1997).

I. 5.2. Microbiota patogénica

I. 5.2.1. *Escherichia coli*

E. coli é um dos diversos microrganismos que fazem parte da microbiota intestinal dos animais homeotérmicos, sendo considerado um agente patogênico oportunista de interesse na indústria de alimentos (Doyle e Schoeni, 1987). Pertence a família Enterobacteriaceae, e como tal partilha das mesmas características. (Holt *et al.*, 1994).

A maioria das espécies desenvolve-se a uma temperatura de 37°C, embora também possam multiplicar-se a temperaturas de 4-5°C (Holt *et al.*, 1994). São capazes de sobreviver por tempo prolongado em alimentos congelados. A multiplicação de grande parte das estirpes é inibida a pH menor que 4,5 ou maior que 9,0, porém este pH extremo não é capaz de destruir a bactéria. Os ácidos orgânicos são mais eficazes do que ácidos inorgânicos na inibição do seu desenvolvimento. Da mesma forma, uma concentração de sal a 8,5% previne a multiplicação bacteriana, mas não inativa o microrganismo (Holt *et al.*, 1994).

E. coli, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais, é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento, pelo que a sua presença em alimentos crus é considerada um indicador de contaminação fecal, direta ou indireta. A contaminação direta pode ocorrer através de matéria-prima contaminada e de águas poluídas e de esgoto. A contaminação fecal indireta ocorre durante o processamento de matérias-primas de origem animal devido à falta de higiene pessoal dos manipuladores. (Silva *et al.*, 2001).

Com base nos fatores de virulência de *E. coli* nas manifestações clínicas e epidemiologia do hospedeiro, as linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas são atualmente agrupadas em *E. coli* enteropatogênica; *E. coli* enteroinvasiva; *E. coli* enterotoxigênica; *E. coli* enterohemorrágica e *E. coli* enteroagregativa. A designação de *E. coli* enterohemorrágica foi inicialmente utilizada para estirpes de *E. coli* pertencentes ao serótipo O157:H7, implicadas como agente etiológico da colite hemorrágica (Kaper *et al.*, 2004).

I. 5.2.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram positivo, com forma de coco e aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. São anaeróbios facultativos, catalase positiva, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspeto semelhante a um cacho de uvas). *S. aureus* é uma espécie mesófila, apresentando uma temperatura ótima de multiplicação a 37°C, porém têm tolerância a um grande intervalo de temperatura, entre 7 a 48,5°C.

O género *Staphylococcus* pertence a família *Staphylococaceae*. Este género possui 33 espécies, sendo a maioria isoladas de amostras biológicas humanas. *Staphylococcus* foi descrito pela

primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos, por um cirurgião escocês e é atualmente um dos microrganismos mais comuns nas infecções piogénicas em todo o mundo (Dos Santos *et al.*, 2007).

A distribuição de *S. aureus* é ubiqüitária, visto que essa bactéria é significativamente resistente à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos. Geralmente, esse género faz parte da microbiota da pele humana normal e de outros locais anatómicos, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele, sendo o próprio Homem o seu principal reservatório (Raddi *et al.*, 1988; Dos Santos *et al.*, 2007). Desses locais anatómicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40% na população adulta, podendo ser ainda maior em doentes em hospitais. *S. aureus* encontrado nas fossas nasais ou na pele de recém-nascidos, crianças e adultos pode, a partir desses sítios, alcançar outras regiões da pele e das mucosas. Caso as barreiras naturais, isto é, pele e mucosas, estejam comprometidas por lesão ou cirurgia, *S. aureus* pode alojar-se no tecido e provocar uma lesão local. A colonização nasal por *S. aureus* é desprovida de sintomas, ou seja, o indivíduo não desenvolve infecção. Essa colonização assintomática tem grande importância clínica, uma vez que, com as narinas colonizadas, o indivíduo contamina as próprias mãos e passa a ser veículo de transferência da bactéria no mecanismo de infecções por contacto. Os manipuladores de alimentos desempenham um papel importante na disseminação do microrganismo, principalmente através dos alimentos por eles manipulados. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde as simples até outras mais graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outros) (Dos Santos *et al.*, 2007). As medidas de controlo incluem a implementação de técnicas de lavagem das mãos, formação e consciencialização dos profissionais envolvidos na preparação e confeção de alimentos (Raddi *et al.*, 1988).

A utilização da antibioterapia, no início da década de 1930, com a sulfanilamida, ditava, aparentemente, o fim das doenças infecciosas. No entanto, no final daquela década surgiram as primeiras colónias de *S. aureus* resistentes àquele antibiótico. Desde então, *S. aureus* tem ganho esta “batalha”, uma vez que tem surgido novas colónias resistentes a cada novo antibiótico introduzido no tratamento (Dos Santos *et al.*, 2007).

S. aureus é uma importante causa de intoxicações alimentares em todo o mundo, tendo sido já considerado, mundialmente, a terceira causa mais importante de doença de origem alimentar (Kousta *et al.*, 2010).

A intoxicação alimentar estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham uma ou mais enterotoxinas pré-formadas por *S. aureus*. Através de métodos sorológicos, foram identificadas enterotoxinas estafilocócicas denominadas A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H e I (Dinges *et al.*, 2000). Após a infecção, os sintomas iniciam-se rapidamente e incluem náuseas, vômitos, diarreia e sudorese. Tais sintomas têm curta duração, ainda que variem com o grau de suscetibilidade do indivíduo, com a concentração da enterotoxina no alimento e a quantidade ingerida. Os principais alimentos associados à contaminação são habitualmente os produtos que sofreram mais manipulação e que são refrigerados de forma errada depois de preparados. Os alimentos mais comuns são os cremes, produtos de pastelaria, produtos feitos com ovos, carne, especialmente de porco e frango, atum e maionese (Jay, 2000).

I. 5.2.3. *Listeria monocytogenes*

Listeria é um bacilo curto (com comprimento de 0,4µm a 2µm) Gram-positivo, anaeróbio facultativo, não esporulado, catalase positiva, oxidase negativa e não produz sulfureto de hidrogénio (Cruz *et al.*, 2008; Maia, 2009).

Dentro das várias espécies de *Listeria*, as 6 espécies mais conhecidas: *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L.innocua* e *L.seeligeri*. De entre estas espécies apenas *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* são patogénicas. *Listeria monocytogenes* infeta animais e o Homem, enquanto que *Listeria ivanovii* infeta animais, mas raramente ocorre no Homem (Cruz *et al.*, 2008).

É uma bactéria móvel, devido à presença de flagelos peritricos (Cruz *et al.*, 2008) e requiere para o seu desenvolvimento pelo menos 4 vitaminas do complexo B, alguns aminoácidos, sendo a presença de glicose um fator favorável (Jay, 2000). Em agar sangue, *Listeria monocytogenes*, apresenta uma β-hemólise, o que permite distinguir esta espécie das outras pertencentes ao mesmo género (Maia, 2009).

Apesar de *Listeria* se multiplicar melhor num intervalo de pH entre 6 e 8, algumas espécies toleram pH extremos de 4,1 e 9,6. De facto, o pH mínimo capaz de favorecer a multiplicação de *Listeria* depende de outras variáveis ambientais, como a temperatura de incubação, a composição nutricional do meio, a atividade da água e a presença ou quantidade de cloreto de sódio e/ou outros inibidores. Esta associação/interação tem sido estudada e conclui-se que o efeito do pH e da presença de cloreto de sódio pode ser apenas aditivo e nunca sinérgico (Jay, 2000). Os microrganismos podem ultrapassar o efeito inibidor do pH baixo através do desenvolvimento de mecanismos adaptativos. *Listeria* pode multiplicar-se na presença de concentrações de sal elevadas (até 10 % [m/v] de NaCl), sobreviver a uma atividade de água tão baixo quanto 0,92.

Sendo uma bactéria anaeróbia facultativa, é capaz de tolerar várias condições de embalagem (Melo *et al.*, 2015).

Apresenta um desenvolvimento ótimo a uma temperatura aproximada de 37°C, apesar de se multiplicar num intervalo de temperaturas de 1°C a 45°C, logo com características psicrotróficas (Beverly, 2004).

Normalmente os teores de *L. monocytogenes* em alimentos contaminados são baixos, no entanto, a sua capacidade de se multiplicar a baixas temperaturas permite-lhe atingir níveis altos o suficiente para causar a doença, especialmente se os alimentos contaminados são refrigerados por períodos de tempo prolongados. Por outro lado, *L. monocytogenes* é mais tolerante ao calor do que a maioria dos outros agentes patogénicos de origem alimentar não-formadoras de esporos (Melo *et al.*, 2015). Muitos fatores influenciam a resistência ao calor, incluindo o teor de sal e acidez (Melo *et al.*, 2015).

Sendo uma bactéria ubiqüitária, *L. monocytogenes* foi encontrada em vários ambientes: solo, vegetação, animais, humanos, água e esgotos (Jay, 2000; Forsythe, 2002).

L. monocytogenes já foi detetada numa variedade de alimentos, tanto crus como processados, além do leite cru e produtos derivados (queijo mole e gelado), carne (incluído avícola) e produtos derivados, vegetais, pescado e vários alimentos prontos-a-comer (Jay, 2000; National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, 2016).

A capacidade de sobrevivência por longos períodos de tempo em condições adversas e a facilidade de contaminação nos processos de fabrico alimentar tornam este microrganismo uma grande preocupação na indústria alimentar (Rocourt e Cossart P., 1997). Também nos parece importante referir que a capacidade desta bactéria resistir ao stresse alcalino pode explicar a persistência nas instalações das unidades de fabrico de alimentos, onde os procedimentos de descontaminação são maioritariamente dependentes do uso de detergentes alcalinos (Melo *et al.*, 2015).

A presença de *L. monocytogenes* em alimentos está regulamentada na União Europeia (RE 1441, 2007), sendo que deve estar ausente em 25g em alimentos prontos-a-consumir destinados a lactentes ou a um grupo-alvo com indicação médica especial. Em outros alimentos pode tolerar-se um teor de 100 UFC/g durante o seu prazo de validade (Melo *et al.*, 2015).

A aplicação de estratégias de controlo de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de alimentos permitiu a identificação de pontos críticos de controlo nos quais a contaminação de produtos alimentares com esta bactéria é mais frequente (Melo *et al.*, 2015).

I. 6. *Listeria monocytogenes* associada a queijos

Depois de alguns surtos associados com o consumo de leite e produtos lácteos, *L. monocytogenes* tornou-se um microrganismo alvo de grande preocupação para a indústria de laticínios, devido à alta taxa de mortalidade associada (Arqués *et al.*, 2005). Cerca de metade do total de surtos de listeriose na Europa estão associados ao consumo de produtos lácteos contaminados com *L. monocytogenes* (Melo *et al.*, 2015).

A contaminação direta de leite cru por *L. monocytogenes* ocorre devido a animais com listeriose. Animais assintomáticos podem também veicular o microrganismo patogénico de forma intermitente no leite (Arqués *et al.*, 2005). O leite cru pode também ser contaminado com *L. monocytogenes* a partir de equipamentos durante a ordenha, durante o armazenamento em tanques de refrigeração ou durante o transporte para a unidade de processamento de queijo, onde as medidas de controlo de higiene podem não ser as mais adequadas. Esta bactéria pode sobreviver e multiplicar-se em ambientes de processamento pós-pasteurização devido à sua capacidade em aderir a superfícies alimentares e não-alimentares, no equipamento e em instalações de armazenamento. A formação de biofilmes potencia a propagação deste agente patogénico para o produto final, onde pode permanecer viável e multiplicar-se durante a sua vida de prateleira (Melo *et al.*, 2015).

Uma elevada quantidade de amostras positivas a *L. monocytogenes* foi associada ao uso de um lay-out do processo de fabrico do queijo mal elaborado e higiene pessoal deficiente (Melo *et al.*, 2015).

Os queijos são produtos prontos a consumir, que não têm qualquer passo que envolva o tratamento térmico imediatamente antes do consumo e são geralmente conservadas a temperaturas de refrigeração que permitem a sobrevivência e a multiplicação de bactérias psicrotrópicas, tais como *L. monocytogenes*. Naturalmente, apesar de muito importante, a pasteurização do leite cru não elimina riscos adicionais de contaminação posterior de produtos lácteos por este agente patogénico (Melo *et al.*, 2015).

I. 6.1. Listeriose no Homem

L. monocytogenes é o agente causador de listeriose, uma doença infecciosa grave de origem alimentar caracterizada por uma taxa de mortalidade muito elevada (Kousta *et al.*, 2010).

A listeriose afeta preferencialmente indivíduos cujo sistema imunitário está comprometido, incluindo mulheres grávidas, recém-nascidos e idosos (Rocourt e Cossart P., 1997; Jay, 2000;

Kousta *et al.*, 2010). No entanto, ainda que raramente, indivíduos sem esses fatores de risco também podem ser afetados (National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, 2016).

A maioria dos doentes diagnosticados tem infecção "invasiva", na qual o agente patogénico se dissemina para além do trato gastrointestinal. Os sintomas apresentam muita variação individual. As mulheres grávidas podem não apresentar sintomas, mas normalmente têm febre e outros sintomas não específicos, tais como fadiga e dores. Estamos em presença de uma bactéria que tem como característica um tropismo para o aparelho reprodutor pelo que durante a gravidez pode existir a aborto, morte fetal, parto prematuro ou infecção com risco de vida do recém-nascido. Em casos graves, podem existir também sintomas relacionados com o Sistema Nervoso Central como dor de cabeça, rigidez do pescoço, confusão, perda de equilíbrio e convulsões. Em idosos ou indivíduos com o sistema imunitário comprometido, a septicémia e meningite são as apresentações clínicas mais comuns e mais graves (Jay, 2000; National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, 2016).

I. 6.2. Prevenção e controlo de *L. monocytogenes* em alimentos

L. monocytogenes é destruída por ação de calor a temperaturas de 72°C durante 2 minutos. Assim, a confeção de alimentos de origem animal, como carne bovina, suína ou de aves de capoeira pode ser considerada uma medida de prevenção. No entanto, nos produtos prontos-a-consumir, a contaminação pode ocorrer após confeção, ainda antes do acondicionamento ou até mesmo no local de venda direta ao público (National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, 2016).

Manter as boas práticas de higiene e segurança alimentar é fundamental para prevenir qualquer tipo de contaminação. Não armazenar o produto em refrigeração para além do prazo de validade, dividir as sobras de alimentos cozinhados em recipientes rasos para promover um rápido arrefecimento e cobrir com tampas herméticas, filme plástico ou papel alumínio são também medidas preventivas para evitar a multiplicação deste microrganismo nos alimentos. Outra forma de prevenir esta infecção consiste em evitar beber leite cru (Barancelli *et al.*, 2011; National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, 2016; Anjos *et al.*, 2017).

I. 7. Bacteriocinas

I. 7.1. Definição e tipo de bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ao nível do ribossoma de bactérias, libertados para o meio extracelular, que exibem antagonismo principalmente contra bactérias Gram positivo de espécies relacionadas. Algumas bacteriocinas são também ativas contra certas bactérias Gram negativo, tais como *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* (Ghraiiri *et al.*, 2008; Todorov *et al.*, 2010; Sabo *et al.*, 2014; Favaro *et al.*, 2015; Aspri *et al.*, 2017).

Um grande número de bacteriocinas são produzidos por BAL, destacando-se o género *Lactobacillus*, o qual engloba mais de 150 espécies (Moreno *et al.*, 2003; Sabo *et al.*, 2014). Estes compostos possuem propriedades antibióticas mas diferem da maioria dos antibióticos terapêuticos por serem de origem proteica e por apresentarem, geralmente, especificidade de ação contra as estirpes da mesma espécie ou de espécies estreitamente relacionadas (Chen e Hoover, 2003). As estirpes produtoras de bacteriocinas têm um mecanismo de imunidade específica para protegê-las contra as suas próprias bacteriocinas (Goh e Philip, 2015). As bacteriocinas produzidas por BAL oferecem potenciais aplicações biotecnológicas visto serem estáveis em valores baixos de pH, de fácil de produção e livres de efeitos adversos (Todorov *et al.*, 2010).

As bacteriocinas são geralmente divididas em 3 grupos bem definidos, com base na sua estrutura e função:

- Classe I, que consiste em bacteriocinas modificadas, conhecidas como lantibióticos, de baixo peso molecular, onde se incluem a nisina e lantionina. A Classe I é dividida em 3 sub-grupos: os do tipo A são péptidos lineares, os do tipo B são péptidos globulares e os do tipo C são mais complexos;
- Classe II, que engloba péptidos hidrofóbicos sem resíduos de aminoácidos modificados. São bacteriocinas não modificadas estáveis ao calor, ainda sub-divididas em 3 classes: classe IIa (bacteriocinas com atividade contra *Listeria* spp.), classe IIb (bacteriocinas com 2 péptidos) e classe IIc (péptidos com estrutura cíclica).
- Classe III, que compreende bacteriocinas termolábeis de elevado peso molecular (Chen e Hoover, 2003; Ghraiiri *et al.*, 2008; Sabo *et al.*, 2014; Goh e Philip, 2015; Favaro *et al.*, 2015).
- Classe IV, não sugerida por muitos autores, diz respeito a um conjunto de bacteriocinas complexas que contêm porções de hidrato de carbono ou lípidos em adição à fração proteica. Contudo Cleveland e colaboradores consideram que estes complexos são artefactos de

purificação parcial e não uma nova classe de bacteriocinas (Cleveland *et al.*, 2001; Chen e Hoover, 2003).

A maioria das bacteriocinas da classe I têm um espectro inibitório bastante amplo. Elas não só inibem as bactérias estreitamente relacionadas, tais como espécies do género *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, mas também inibem bactérias Gram-positivo muito menos relacionadas, tais como *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum* (Chen e Hoover, 2003; Ghrairi *et al.*, 2008).

Os lantibióticos Tipo A são péptidos alongados com uma carga catiónica que exercem a sua atividade através da formação de poros na membrana bacteriana. Por outro lado, lantibióticos do tipo B são peptídeos globulares menores e têm uma carga negativa ou neutra, cuja atividade antimicrobiana está relacionada com a inibição de enzimas específicas (Chen e Hoover, 2003).

A nisina, bacteriocina de classe I, tipo A, continua a ser a bacteriocina comercialmente mais importante, embora outras bacteriocinas tenham sido caracterizadas e desenvolvidas para possível aprovação e utilização. A nisina tem sido a mais utilizada, devido à sua história relativamente longa de utilização segura e eficaz contra importantes agentes patogénicos e deteriorativos Gram-positivo. Em 1983, a nisina foi adicionado à lista de aditivos alimentares e, em 1988, a FDA permitiu a sua utilização em queijos processados (Sabo *et al.*, 2014). Esta bacteriocina geralmente não tem efeito sobre bactérias Gram-negativo, leveduras e bolores, mas sobre bactérias Gram-positivo, incluindo as BAL, *Listeria*, *Staphylococcus* e *Mycobacterium*, *Bacillus* e *Clostridium*. Em particular, a nisina mostrou-se eficaz contra *L. monocytogenes* em laticínios, podendo inibir o desenvolvimento deste agente patogénico por um período igual ou superior a 8 semanas. Esta bacteriocina é muitas vezes comparada a um detergente catiónico com atividade de superfície, na qual a adsorção para a célula bacteriana é o primeiro passo necessário para a rutura da membrana. Outras bacteriocinas da classe I comportam-se de um modo semelhante (Chen e Hoover, 2003)

O maior grupo de bacteriocinas neste sistema de classificação são os pertencentes à Classe II. Estes péptidos são divididos em 3 subgrupos. A Classe IIa tem atraído muita atenção devido à sua atividade na indústria alimentar, inibindo o desenvolvimento de microrganismos deteriorativos e patogénicos Gram-positivo, como *B. cereus*, *Cl. perfringens*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, mas também na medicina, como complemento de antibióticos ou como agente antiviral. Em geral, colónias do género *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* são sensíveis

a bacteriocinas de classe IIa, enquanto que colónias do género *Lactococcus* são resistentes. As bacteriocinas de classe IIa, especialmente a pediocina PA-1, enterocina A, sakacina P e curvacina A, são geralmente ativas contra *Listeria*, nas suas várias espécies, incluindo *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii* (Chen e Hoover, 2003).

A Classe IIb contém bacteriocinas que exigem 2 péptidos diferentes para exercerem a sua atividade. Neste contexto, a natureza catiónica é essencial, permitindo a ocorrência de interações electrostáticas, entre as bacteriocinas e as membranas com carga negativa. Por último, a classe IIc engloba os péptidos que requerem ligações covalentes, formando estruturas cíclicas (Chen e Hoover, 2003; Sabo *et al.*, 2014).

As bacteriocinas classe III não estão bem caracterizadas. Este grupo de proteínas engloba péptidos termolábeis de grandes dimensões que são de menor interesse na ciência alimentar (Chen e Hoover, 2003).

I. 7.2. Biossíntese e Mecanismo de ação

De acordo com um estudo de 2006, pelo menos quatro genes são necessários para a produção e secreção de bacteriocinas. Em particular, o gene estrutural bacteriocina, que codifica uma pré-bacteriocina; o gene da imunidade, que codifica uma proteína de imunidade que protege o produtor de bacteriocina do seu próprio produto; o gene que codifica a expressão de ABC (cassete de ligação ao ATP) necessária para a secreção e um gene que codifica uma proteína acessória de função desconhecida (Drider *et al.*, 2006).

A maioria das bacteriocinas pertencentes à Classe II são sintetizadas na forma de pré-péptido ou pré-bacteriocina biologicamente inativa. Este composto contém uma sequência de 18 a 27 aminoácidos, terminando com 2 glicinas. Esta sequência tem a função de prevenir a ativação da bacteriocina dentro da célula, servindo também como sinal de reconhecimento para as proteínas que envolvem o sistema de transporte ABC acoplado às membranas celulares. Depois de ocorrido este reconhecimento do pré-péptido, a bacteriocina ativa é libertada para o meio extra celular (Moll *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação das bacteriocinas depende diretamente de fatores relacionados com a espécie bacteriana e as suas condições de crescimento, dose utilizada e o seu grau de purificação. As bacteriocinas podem promover um efeito bactericida, com ou sem lise celular, ou bacteriostática, inibindo a multiplicação celular. A formação de poros é o principal mecanismo pelo qual a maior parte das bacteriocinas exerce o seu efeito antibacteriano (Sabo *et al.*, 2014),

sendo os lipídios da membrana citoplasmática os principais recetores de bacteriocinas (Moll *et al.*, 1999).

I. 7.3. Bactérias produtoras de bacteriocinas

***Enterococcus* spp.**

Enterococcus spp. são frequentemente encontrados em produtos lácteos, sendo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* as espécies predominantes (Ghraiiri *et al.*, 2008). Num estudo de 2009, foram selecionados três queijos diferentes de leite de cabra como fonte de 95 Enterococos, pertencentes às espécies *Enterococcus devriesei*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus malodoratus*. Um grande número desses isolados (87%) demonstraram ser produtores de bacteriocinas (Martin-Platero *et al.*, 2009).

A atividade antibacteriana das bacteriocinas produzidas por *E. faecium*, tem como alvo particular estirpes de *Listeria*. Estudos laboratoriais demonstraram que o efeito sobre *Listeria* ocorre no final da fase exponencial da sua multiplicação. *E. faecium* produz várias bacteriocinas com estruturas diferentes (Ennahar *et al.*, 2001), existindo uma atividade sinérgica entre as enterocinas A e B, duas das bacteriocinas produzidas por esta estirpe (Izquierdo *et al.*, 2009).

Algumas estirpes *E. faecium* produtoras de bacteriocinas isoladas a partir de queijo búlgaro apresentaram elevada atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes* (Favaro *et al.*, 2014).

Em geral, bacteriocinas produzidas por *E. faecium* e *E. faecalis* são péptidos pequenos, hidrofóbicos e termoestáveis com um potencial tecnológico interessante, sendo a maioria deles pertencentes à classe II de bacteriocinas. A sua atividade é superior em meio com pH de 5,5.

O número de bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* contra os agentes patogénicos de origem alimentar, tais como *Listeria* spp., *Clostridium* spp. e *Staphylococcus aureus* tem sido crescente (Moreno *et al.*, 2003; Ghraiiri *et al.*, 2008; Pingitore *et al.*, 2012). Além das reconhecidas propriedades antimicrobianas, estas bacteriocinas surgem também como vantajosas no desenvolvimento do sabor e textura durante a fermentação do leite, melhorando as propriedades organoléticas em alimentos lácteos (Ghraiiri *et al.*, 2008).

***Lactobacillus* spp.**

Lactobacillus spp. engloba mais de 150 espécies, são bactérias ubíquas com capacidade de suportar stress térmico e outras condições ambientais adversas. Têm um grande potencial para o uso na indústria alimentar, pelo que podem estar presentes em muitos produtos alimentares

fermentados de origem animal e vegetal. Estão, inclusivamente, presentes em queijos, em quantidades elevadas, contribuindo para a maturação do mesmo e desenvolvimento do aroma, devido às suas atividades proteolíticas e lipolíticas. A sua capacidade adicional de produzir bacteriocinas fornece uma capacidade acrescida para competir com outros microrganismos (Sabo *et al.*, 2014; Favaro *et al.*, 2015).

Lactobacillus rhamnosus tem sido bem estudado e utilizado de forma segura como uma estirpe probiótica numa variedade de alimentos. *L. rhamnosus* é amplamente prescrito para o tratamento da diarreia aguda em crianças e a sua eficácia já foi avaliada por estudos *in vivo* (Mpofu *et al.*, 2016).

Lactobacillus rhamnosus, isolado a partir de queijo de bovino e avaliado em termos tecnológicos, de segurança e de funcionalidade, provou ser um candidato probiótico promissor para uso em produtos lácteos fermentados. *Lactobacillus rhamnosus* é mais eficaz contra *S. aureus* e *L. monocytogenes* no final do armazenamento em refrigeração, em comparação com outras bactérias patogénicas estudadas. A capacidade de *L. rhamnosus* inibir bactérias patogénicas foi descrita por (Douillard *et al.*, 2013), observando-se que a maioria das estirpes exibiram efeitos inibitórios sobre o desenvolvimento de *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* e *L. monocytogenes*. Este efeito deve-se à produção de vários compostos durante o metabolismo fermentativo das bactérias, tais como ácidos orgânicos, péptidos e proteínas com atividade antibacteriana (Douillard *et al.*, 2013; Rolim *et al.*, 2015). Num estudo de 2015, *L. rhamnosus* CJNU 0519, provou produzir a bacteriocina rhamnocin 519, com um espetro antimicrobiano limitado, contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*, sendo a multiplicação de *L. monocytogenes* inibida de uma forma mais intensa (Jeong e Moon, 2015).

Apesar de ainda existir uma certa controvérsia sobre a produção de bacteriocinas por parte de *L. rhamnosus*, a produção de ácidos orgânicos é bem conhecida, sendo a atividade inibidora específica contra agentes patogénicos Gram-negativo e Gram-positivo bem documentada (Mpofu *et al.*, 2016). Por outro lado, Lu e seus colaboradores isolaram e caracterizaram 7 péptidos produzidos por *L. rhamnosus* (Lu *et al.*, 2009). O péptido NPSRQERR apresenta as maiores propriedades antibacterianas, tanto em bactérias Gram-positivo como Gram-negativo. Kankainen e seus colaboradores descreveram ainda a presença de vários genes relacionados com a produção de bacteriocinas no genoma de *L. rhamnosus* (Kankainen *et al.*, 2009; Mpofu *et al.*, 2016).

Lactobacillus casei foi avaliada em amostras de queijo experimentais durante o armazenamento como bactéria produtora de bacteriocinas. Os resultados mostraram que as contagens de *Listeria monocytogenes* foram reduzidas de 5,81 log ufc/g até 0,86 log ufc/ml, em ambiente refrigerado a 4°C, pela adição da bacteriocina produzida por *L. casei* RN 78, evidenciando níveis elevados de atividade antibacteriana nas amostras em geral (Mojgani *et al.*, 2010).

Lactobacillus sakei produziu a um efeito inibidor notável contra *L. monocytogenes* em queijo de barrar, armazenado a 4 °C e a 15 °C. O efeito mais pronunciado anti-*Listeria* foi observado no queijo mantido a 15 °C, possivelmente relacionado com uma melhor combinação de um ambiente mais ácido e a produção de bacteriocina por *L. sakei* a esta temperatura do que a 4 °C (Martinez *et al.*, 2015).

As bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* foram isoladas a partir do Queijo Cheddar e identificados por métodos fenotípicos e moleculares. Estes compostos revelaram uma alta resistência térmica e atividade de amplo espectro contra vários agentes patogênicos veiculados pelos alimentos: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* O157: H7, entre outros (Mlalazi *et al.*, 2011).

I. 7.4. O uso de bacteriocinas no fabrico de queijos

Na indústria de alimentar, é essencial preservar a qualidade nutricional da matéria-prima através da inibição do desenvolvimento de microrganismos deteriorativos e patogênicos, conseguidas substâncias químicas naturais ou sintéticas (Favaro *et al.*, 2015).

No caso particular do queijo, uma alternativa tecnológica à preservação convencional do queijo (aditivos químicos, teor elevado de sal, entre outros) é o uso de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas ou BAL produtoras de bacteriocinas como culturas iniciadoras, protetoras ou adjuvantes (Aspri *et al.*, 2017). As bacteriocinas são consideradas as alternativas mais adequadas aos conservantes químicos porque são inofensivas para as células eucariotas e são rapidamente digeridas por enzimas proteolíticas devido à sua natureza proteica (Aspri *et al.*, 2017). Desta forma, a adição de culturas lácticas probióticas com atividade antimicrobiana reconhecida em queijos pode contribuir para a manutenção da qualidade microbiológica destes produtos durante o armazenamento (Rolim *et al.*, 2015).

Apesar da grande pesquisa sobre identificação, caracterização e desenvolvimento de BAL em queijo nas últimas quatro décadas, poucas formulações chegaram ao mercado. Isto é explicado,

em grande parte, pelo obstáculo da aplicação de estirpes produtoras de bacteriocinas no contexto do fabrico industrial de queijos que necessita de processos muito específicos, rigorosos e reprodutíveis. A seleção de estirpes competitivas em ambientes de queijo e *starters* adequados com baixa sensibilidade à bacteriocina é essencial para o sucesso de aplicações em grande escala (Favaro *et al.*, 2015).

Os queijos são alvo de risco de contaminação por parte de bactérias patogénicas, como *Listeria monocytogenes*. O desenvolvimento de *Listeria* spp. a temperaturas de refrigeração representa grande ameaça na segurança dos produtos lácteos (Mojgani *et al.*, 2010). O queijo fresco, devido à elevada atividade de água merece especial atenção, onde o controlo de *L. monocytogenes* se torna imperativo (Coelho *et al.*, 2014). A preocupação com a listeriose com origem no queijo levou a pesquisas de BAL e outras espécies bacterianas produtoras de bacteriocinas, a fim de serem usadas como uma alternativa promissora para reduzir a ocorrência de *Listeria monocytogenes* (Moreno *et al.*, 2003; Izquierdo *et al.*, 2009).

As bacteriocinas mais extensivamente estudadas são a nisina e a pediocina PA-1, ambas com aplicações comerciais na indústria do queijo. O Comité do Codex FAO (Food and Agriculture Organization) / OMS (Organização Mundial de Saúde) permitiu a utilização de nisina como aditivo alimentar em queijos a uma concentração de 12,5 mg/kg de produto, como nisina pura. No entanto, há várias limitações que impedem o uso de nisina em produtos lácteos, nomeadamente a sua adsorção à gordura e à superfície da proteína, a distribuição heterogénea nas matrizes dos produtos lácteos, a inibição de culturas iniciadoras não resistentes ou alteração de sabor pela incorporação de espécies produtoras de nisina. A interferência com componentes de queijo, como fosfolípidos, gorduras ou proteínas também pode ocorrer, o que limita a atividade da bacteriocina, especialmente quando o alimento apresenta alto teor de gordura (Favaro *et al.*, 2015).

O efeito de NaCl, gorduras e enzimas proteolíticas sobre a atividade antimicrobiana da nisina em queijo Emmental foi estudado, verificando-se que um maior teor de NaCl aumentou ligeiramente a atividade da nisina, influenciando provavelmente a adsorção da bacteriocina aos microrganismos. O estudo realizado com o queijo Emmental indicou que a nisina interagiu com a matriz de queijo, provavelmente com glóbulos de gordura do leite, mas não foi afetada pelas proteases (Chollet *et al.*, 2008). A nisina é frequentemente adicionada na produção de queijo para evitar, igualmente, a proliferação de esporos de *Clostridium* spp. (Chen e Hoover, 2003).

Algumas estirpes de *Lc. lactis* e *Lactococcus cremoris* foram aplicados em conjunto com a nisina para o desenvolvimento de culturas iniciadoras a fim de melhorar a segurança e a qualidade nutricional em queijos. A utilização de *Lc. lactis* como produtores de nisina, pediocina PA-1 e

enterocina A foi proposta para serem utilizados como culturas iniciadoras devido ao potencial benefício no controlo de *L. monocytogenes* na produção de queijo (Favaro *et al.*, 2015).

Também foi relatada a aplicação de estirpes de *Enterococcus casseliflavus* contra *L. monocytogenes* em queijos frescos (Favaro *et al.*, 2015). Izquierdo e colaboradores descreveram o uso de *E. faecium* como cultura adjuvante utilizada em salmoura com atividade anti-*Listeria* (Izquierdo *et al.*, 2009).

Por outro lado, bacteriocinas produzidas por *Enterococcus mundtii* CRL35 e *E. faecium* ST88Ch foram caracterizadas pela capacidade de controlar o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em queijo fresco contaminado experimentalmente, armazenado em refrigeração (Pington *et al.*, 2012). *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são capazes de produzir uma variedade de enterocinas com atividade contra *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Clostridium* spp. (Ghraiiri *et al.*, 2008). A aplicação de várias enterocinas, como aditivo ou através da produção *in situ* por uma cultura iniciadora durante a fermentação, tem sido estudado na produção de queijo (Moreno *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de culturas com atividade antimicrobiana para aplicação na produção de queijo e os limites de sua utilização têm sido alvo de investigação. Contudo, atualmente, muito poucas culturas protetoras são comercializadas. Os resultados obtidos em trabalhos experimentais parecem indicar que uma combinação de estirpes produtoras de bacteriocinas ou outro conservante de alimentos permitido pode ser uma resposta para o controlo mais eficaz de *L. monocytogenes* na produção de queijos (Favaro *et al.*, 2015).

I. 7.5. Limitações no uso de bacteriocinas e propostas de melhoria

A aplicação de culturas produtoras de bacteriocinas com o objetivo de controlar o desenvolvimento de microrganismos deteriorativos e patogénicos podem, de facto, contribuir para a segurança do produto final, mas é necessário considerar que estes compostos antimicrobianos têm limitações. Assim sendo, a melhor opção é procurar a combinação ideal de métodos tradicionais e recentes de biopreservação (Favaro *et al.*, 2015).

O metabolismo bioquímico da bactéria necessita de nutrientes suficientes para a produção de bacteriocinas (Favaro *et al.*, 2015). A atividade antimicrobiana das bacteriocinas é instável, pois depende das condições físico-químicas dos alimentos (Sabo *et al.*, 2014). Existem fatores que podem interferir na otimização da produção de bacteriocinas, como condições de processo inadequadas (pH, temperatura, nutrientes, entre outros), composição do meio (incluindo o tipo de açúcares, fontes de nitrogénio, minerais e vitaminas), presença de microrganismos

competitivos no meio, entre outros. Além disso, a eficácia da bacteriocina também pode ser afetada pela presença de enzimas (como proteases) e de microrganismos resistentes a essa mesma bacteriocina, pela ocorrência de reações de oxidação/redução, pela interação com componentes da fórmula alimentar (gorduras, proteínas, conservantes, entre outros) e por restrições impostas devido à concentração de NaCl. De facto, nos produtos lácteos, o NaCl pode ser aplicado até 6% como parte de características tecnológicas ou sensoriais do produto. Dependendo da influência específica de NaCl na adsorção de cada bacteriocina no microrganismo, o composto antimicrobiano pode ou não ter vantagem em ser aplicado no fabrico do queijo. É, igualmente, importante considerar o armazenamento e maturação frequentes de queijos em temperatura de refrigeração. Essa temperatura não é prejudicial para a sobrevivência de muitas bactérias, mas não permite que haja uma multiplicação abundante e, uma consequente produção profícua de bacteriocinas (Sabo *et al.*, 2014; Favaro *et al.*, 2015). Por outro lado, a presença de nitrato e nitrito e uma baixa atividade da água, pode prejudicar uma distribuição adequada da bacteriocina em todo o produto alimentar (Sabo *et al.*, 2014).

As principais limitações funcionais para a aplicação de bacteriocinas nos alimentos são os seus espetros de atividade relativamente apertados com efeitos antibacterianos moderados. Além disso, a sua atividade, geralmente, não inclui bactérias Gram-negativo (Chen e Hoover, 2003). O uso de culturas produtoras de bacteriocinas tem várias limitações relacionados com a estirpe produtora, como: nível insuficiente de expressão de bacteriocina; antagonismo de outras bactérias para a bactéria produtora; baixa capacidade de produção de bacteriocina no sistema alimentar; segurança da estirpe produtora; interação entre bacteriocina produzida e a matriz alimentar; efeito de parâmetros físico-químicos na atividade da bacteriocina (Favaro *et al.*, 2015). O efeito sinérgico entre bacteriocinas e outros tratamentos tecnológicos para a inativação de microrganismos tem sido frequentemente relatado na literatura. Tem-se verificado um interesse contínuo na indústria alimentar em usar tecnologias de processamento não-térmico, como pressão alta hidrostática e campo elétrico pulsado na preservação de alimentos. Frequentemente observa-se que as bacteriocinas, em combinação com estas técnicas de processamento, melhoram a inativação bacteriana. As bactérias Gram-negativo que geralmente são insensíveis à ação de bacteriocinas, como *E. coli* O157: H7 e *S. Typhimurium* tornam-se sensíveis após estes tratamentos. Por outro lado, o uso de combinações de várias bacteriocinas também foi demonstrado para aumentar a atividade antibacteriana (Chen e Hoover, 2003).

A incorporação de bacteriocinas em películas de embalagem para reduzir a multiplicação de microrganismos deteriorativos e patogénicos em alimentos tem sido uma área de investigação importante. Esta película de embalagem antimicrobiana deve entrar em contato com a superfície

do alimento para que as bacteriocinas se possam difundir e, conseqüentemente, evitar o desenvolvimento microbiano (Chen e Hoover, 2003).

II. OBJETIVOS

Este estudo experimental implicou duas fases de delineamento e de realização de trabalho experimental:

- i) Numa primeira fase pretendeu-se efetuar uma caracterização microbiológica de queijo de ovelha e de cabra de duas empresas artesanais portuguesas, variando na utilização de leite pasteurizado ou não no fabrico dos queijos;
- ii) Numa segunda fase, pretendeu-se testar o efeito de um produto comercial com bacteriocinas em 2 concentrações no comportamento de *Listeria monocytogenes* inoculada em queijos de ovelha.

Por fim, num âmbito mais abrangente, foi também objetivo deste trabalho avaliar se existe uma correta aplicação das práticas de higiene e segurança alimentar próprias deste setor alimentar durante o fabrico de queijos nas duas empresas, necessárias para se obter um produto final de qualidade microbiológica satisfatória.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Microbiota deteriorativa e patogénica de queijos ao longo do processo da maturação

III. 1. 1. Colheita e transporte

Entre Novembro de 2015 e Janeiro de 2016, recolheram-se 3 lotes de amostras de leite de cabra e de ovelha e respetivos queijos de cabra ou de ovelha de 2 empresas artesanais portuguesas (A e B). A empresa A recorria à pasteurização do leite de cabra para o fabrico do queijo correspondente, por outro lado, a empresa B utilizava leite cru de ovelha no fabrico dos respetivos queijos. Cada lote incluía 1 amostra de leite, 5 amostras de queijos antes de ser aplicada a salga, 5 amostras de queijo fresco e 5 amostras de queijo maturado (30 dias após o fabrico no caso do queijo de cabra e 60 dias no caso dos queijos de ovelha).

A colheita das amostras foi efetuada *in locu* nas instalações das empresas, sendo os queijos colocados em sacos de plástico de fecho hermético com o auxílio de espátulas desinfetadas e o leite, em frascos esterilizados. Após este procedimento, as amostras foram colocadas de imediato em caixas térmicas, devidamente fechadas e acondicionadas, em condições de temperatura controladas, de modo a preservar as características microbiológicas das mesmas durante o seu transporte para o laboratório, o que acontecia logo de seguida no período máximo de 2 horas. As amostras foram processadas num prazo máximo de 24 horas.

III. 1. 2. Preparação das amostras e sementeira

A colheita e pesagem assépticas de pequenas porções de diferentes zonas das amostras foram realizadas com material esterilizado por forma a perfazer a quantidade de amostra desejada (10g no caso dos queijos e de 10ml no caso do leite) para um volume de 90 ml de Triptona Sal, obtendo-se uma diluição de 10^{-1} . As amostras foram sujeitas a homogeneização no equipamento *Stomacher* (IUL Instruments®) durante 60s. Seguidamente, as diluições decimais seriadas foram preparadas a partir da suspensão-mãe, de modo a obter-se o número apropriado de microrganismos para a contagem em meio de cultura sólido em placas de Petri. Para este efeito, transferiu-se 1 ml da suspensão-mãe para um tubo contendo 9 ml de triptona sal – previamente esterilizado em autoclave (Uniclave 88) –, com uma pipeta estéril, e homogeneizou-se no *vórtex*

(Velp Científica®), obtendo-se a diluição decimal 10^{-2} . O procedimento foi repetido de modo a obter as diluições sucessivas necessárias, utilizando sempre uma pipeta esterilizada, conforme descrito na norma (BS EN ISO 6887-1:1999).

As diluições realizadas serviram para contagem de microrganismos mesófilos, bolores e leveduras, BAL, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* garantindo a obtenção de um número de colónias contáveis por placa após incubação.

De seguida, descreve-se o procedimento de contagem e/ou pesquisa de cada microrganismo, de acordo com as normas em vigor.

III. 1. 3. Isolamento e contagem de colónias

Em todas as análises microbiológicas realizou-se um duplicado da amostra, com o objetivo de obter médias aritméticas e resultados com significado estatístico.

III. 1. 3.1. Contagem de Bolores e Leveduras

De acordo com a (ISO 21527-1: 2008), semeou-se 0,1ml de cada diluição em placas de Petri com meio seletivo Chloramphenicol Glucose Agar (VWR Chemicals®, Ref: 84604.0500) pela técnica de sementeira em superfície, seguida de incubação a 25°C durante 5 dias. Transcorrido o tempo de incubação, fez-se a contagem do número de colónias de leveduras e bolores com o auxílio de um contador de colónias nas placas contáveis e multiplicou-se a média aritmética dos duplicados pelo respetivo fator de diluição. Os resultados foram expressos em ufc/g ou ml de alimento.

III. 1. 3.2. Contagem de *Staphylococcus aureus*

Seguindo a (BS EN ISO 6888-1: 1999) semeou-se 0,1ml de cada diluição em meio de cultura seletivo Baird-Parker (VWR Chemicals®, Ref: 84664.0500) em placas de Petri esterilizadas através da técnica de sementeira à superfície, seguido de incubação a 37°C durante 48 horas. Para preparação do referido meio de cultura, usaram-se como aditivos, solução de sulfametazida em NaOH e gema de ovo (Biokar®, Ref: BS060), segundo as instruções impostas pelo fabricante.

Procedeu-se à contagem e marcação de colónias típicas de *Staphylococcus aureus*, colónias brilhantes de cor negra-acinzentada rodeadas por halos claros, pelo método descrito anteriormente. Repicaram-se 5 delas, através de uma ansa estéril, para tubos com o meio Brain Heart Infusion (VWR Chemicals®, Ref: 84626.0500) para que pudesse haver crescimento e

desenvolvimento microbiano, seguido de incubação a 37°C durante 24 horas. Quando se observava turvação no meio, sinónimo de crescimento microbiano, era efetuada a prova da pesquisa de Coagulase com o reagente BBL Coagulase Plasma Rabbit (Biokar®, Ref: BS03408) segundo as instruções do fabricante, para confirmação de *S. aureus*.

III. 1. 3.3. Contagem de *Enterobacteriaceae*

Seguindo os pressupostos da (BS ISO 21528-2:2004), semeou-se 1 ml de cada diluição, através do método de sementeira por incorporação com dupla camada, em placas de Petri esterilizadas com o meio Violet Red Bile Glucose Agar (VWR Chemicals®, Ref: 84603.0500) . As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas, momento em que se procedeu à contagem de colónias típicas de *Enterobacteriaceae*, pelo método já descrito. Foram repicadas 5 colónias isoladas em cada placa e transferidas para o meio Agar Nutritivo (VWR Chemicals®, Ref: 84654.0500) pelo método de estria. Depois do seu crescimento, ao fim de 24 horas, eram realizadas as provas de pesquisa de oxidase a 1% (Aplichem®, Ref: A8073.0010), especificamente negativa, e subsequentemente, a capacidade de fermentação da glicose. Esta prova consistia em repicar das colónias oxidase negativas, por picada central, para tubos contendo glucose agar (Himedia®, Ref: M1589-500600018639). Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas. A reação verificava-se positiva quando ocorria o desenvolvimento de uma cor amarela.

III. 1. 3.4. Contagem de Bactérias de Ácido Lático (BAL)

De acordo com a (BS ISO 15214: 1998), semeou-se 1 ml de amostra de cada diluição, pela técnica de incorporação com dupla camada, em placas de Petri esterilizadas com o meio Man, Rogosa e Sharpe Agar (VWR Chemicals®, Ref: 84607.0500). As placas foram de seguida colocadas a 30°C durante 72 horas. As colónias típicas de BAL foram, então, contadas pelo método usado anteriormente.

III. 1. 3.5. Contagem de Mesófilos

Seguindo os princípios da (ISO 4833-1: 2013), semeou-se 1 ml de amostra de cada diluição, pela técnica de incorporação, em placas de Petri esterilizadas com o meio Plate Count Agar (VWR Chemicals®, Ref: 84608.0500), seguido de incubação a 30°C durante 72 horas. De seguida, as colónias eram contadas pelo método usado anteriormente.

III. 1. 3.6. Contagem de *E. coli*

Aplicando os pressupostos da (BS ISO 16649-2: 2001), semeou-se 1 ml de amostra de cada diluição, pela técnica de incorporação, em placas de Petri esterilizadas com o meio Tryptone Bile X-glucuronide Agar (VWR Chemicals®, Ref: 84637.0500). As placas foram de seguida colocadas na estufa a 41°C durante 24 horas, momento em que se procedia à contagem pelo método explicado anteriormente.

III. 1. 4. Isolamento e Contagem de *Listeria monocytogenes*

III. 1. 4.1. Preparação das amostras em meio de enriquecimento

Foi realizada a pesagem de 25g de queijo, nas devidas condições de assépsia, em sacos esterilizados, seguida de adição de um volume de 225 mL de solução de UVM I (Biokar Diagnostics®, Ref: BK 113HA). Esta amostra foi devidamente homogeneizada no equipamento *Stomacher* (IUL Instruments®) durante 60s e transferida para uma estufa a 30°C.

III. 1. 4.2. Contagem de *Listeria monocytogenes*

De acordo com a (ISO 11290-2: 1996), semeou-se 0,1ml da solução de enriquecimento, aplicando a técnica de sementeira superfície, em placas de Petri esterilizadas com meio seletivo para o crescimento desta bactéria, Oxford (Biokar®, Ref: BK110), seguido de incubação a 37°C durante 48 horas. Nunca foi detetada qualquer colónia sugestiva de *Listeria monocytogenes*.

III. 1. 4.3. Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A cultura de pré-enriquecimento foi sujeita a uma incubação a 30°C durante 24 horas. Foi então transferido um volume de 0,1mL desta cultura para um tubo de ensaio de 10 mL contendo UVMII (Biokar Diagnostics®, Ref: BK 114HA), sendo incubado a 37°C durante 48 horas.

De acordo com a (ISO 11290-1: 1996), inoculou-se 0,1 ml da solução obtida anteriormente, em placas de Petri com meio seletivo sólido *Listeria Selective Agar Oxford* (Biokar Diagnostics®, Ref: BK110) com aditivo (Biokar Diagnostics®, Ref: BS00308), pela técnica de sementeira à superfície, seguindo-se uma incubação a 37°C durante 24-48 horas. Procedeu-se à pesquisa de colónias com coloração castanho-escura, envolvidas por um anel negro, presuntivas de *L. monocytogenes*.

Entre as colónias típicas bem individualizadas, repicaram-se 5 pelo método de estria para placas de Petri com o meio no meio seletivo *Agar Listeria Ottavani & Agosti* (Merck®, Ref: 1.00427.0500) enriquecido com aditivos (VWR Chemicals®, Refs: 335032ZF e 928460NL). A partir deste fazia-se ainda repicagem de colónias para o meio seletivo *Tryptone Soy Yeast Extract*

Agar e incubaram-se as placas a 37°C durante 24 horas. Depois do período adequado de crescimento, procedia-se à aplicação, segundo a ISO correspondente, dos testes de confirmação: catalase (peróxido de hidrogénio a 30% (p/v), Panreac™ 121076.1211), Gram, pesquisa de hemolisinas, fermentação dos açúcares ramnose (AppliChem™ A4336, 0010) e xilose (Sigma-Aldrich® X-1500). Os resultados foram interpretados de acordo com a tabela 1 da norma já referida. Consideraram-se positivas as amostras nas quais foi detetada pelo menos uma colónia típica de *L. monocytogenes*.

III. 1. 5. Isolamento de *Staphylococcus aureus*

III. 1. 5.1. Preparação das amostras em meio de enriquecimento

De acordo com a (NP 2262, 1986), depois de elaborada a solução-mãe de Triptona Sal, como descrito anteriormente, o volume de 10ml foi transferido para um tubo de ensaio com 15ml de meio líquido de enriquecimento Chapman, solução que era incubada a 37°C durante 24 horas.

III. 1. 5.2. Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

Findo este período, através da técnica de sementeira à superfície, era inoculado 0.1ml da solução preparada em placas com o meio seletivo Baird Parker (VWR Chemicals®, Ref: 84664.0500), seguido por uma incubação por mais 48 horas a 37°C. Para preparação do referido meio de cultura, usaram-se como aditivos, Solução de sulfametazida em NaOH e Gema de ovo (Biokar®, Ref: BS060), segundo as instruções impostas pelo fabricante.

Era, então, avaliada a presença de colónias típicas de *Staphylococcus aureus* e, em caso positivo, o processo de confirmação descrito anteriormente era também efetuado.

III.2. Efeito de bacteriocinas no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijos de ovelha

III. 2. 1. Preparação do leite

No mês de Junho de 2016, na Empresa B, foi recolhida uma amostra de leite em condições de assepsia e para recipientes esterilizados, num volume adequado e necessário para a produção de queijo no laboratório a fim de se fazer as inoculações pretendidas aquando da sua produção. O transporte da amostra foi também realizado sob condições controladas de higiene e temperatura num período inferior a 24 horas.

Já no laboratório, o leite foi separado em três lotes, um normal e dois lotes para adição de bacteriocinas em duas concentrações (1200 UA/l de leite e 300 UA/l de leite).

III. 2. 2. Produção de queijo e inoculação

Foi aquecido lentamente em banho-maria até uma temperatura de 34°C, momento em que se adicionou 1,25ml de coalho químico a cada 5L de leite para a coagulação se iniciar. As duas doses de bacteriocinas foram também adicionadas aos 2 recipientes respectivos. Procedeu-se à sua homogeneização. De seguida, procedeu-se ao corte da coalhada, deixando repousar durante 2 minutos para que ocorresse o dessoramento, ou seja a saída do soro. Utilizou-se um pano para este efeito. Depois desta etapa realizou-se a moldagem, em que se colocou o queijo em formas cilíndricas com capacidade para 50g de queijo. Deu-se início à prensagem para que ocorresse a saída do restante soro, através dos pequenos orifícios destas formas.

Procedeu-se depois à salga, colocando os queijos imersos numa salmoura, ou seja, uma solução de água com NaCl com uma concentração de 0,20g/cm³. Colocaram-se os queijos nesta solução durante 10 minutos de cada lado. Após esse tempo, o produto foi deixado em repouso durante 10 minutos e devidamente acondicionado para estar isento de contaminação e colocado numa câmara de refrigeração com temperatura controlada a 8°C.

Neste momento, foi introduzido o inóculo de *Listeria monocytogenes* nos queijos pretendidos. Nesta produção de queijos, pretendeu-se obter queijos sem nenhum tipo de inoculação, que serviu como controlo negativo (C) e dois controlos positivos: queijos apenas com *Listeria monocytogenes* (LM) e queijos com inoculação simultânea de *Listeria monocytogenes* e de bacteriocinas, nas duas concentrações (LMB1 e LMB2).

III. 2. 3. Análises microbiológicas

Em todas as análises realizou-se triplicado de amostras para que o tratamento estatístico de dados possa ter significado estatístico. Realizou-se análises no dia da produção (T0) e após 24 horas (T1), 72 horas (T2), 7 dias (T3), 14 dias (T4) e 28 dias (T5).

Nos queijos com inóculo de *Listeria monocytogenes* (com e sem bacteriocinas em ambas concentrações) fez-se análise, apenas por contagem, à *Listeria monocytogenes*. Essa prática laboratorial seguiu as etapas já descritas anteriormente.

III. 2. 4. Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

É de referir que aquando da receção do leite de ovelha foi efetuada a pesquisa de *Listeria monocytogenes*, para verificar a sua existência ou ausência, ou seja, uma pesquisa efetuada a nível de rastreio, antes do fabrico do queijo.

III. 2. 5. Obtenção da reta de calibração para *Listeria monocytogenes* e Preparação do inóculo

A cultura de *L. monocytogenes* (ATCC BAA – 679, SEROTIPO 1/2 a) utilizada encontrava-se conservada a -20°C em BHI (Biokar Diagnostics BK015HA) e 25% (V/V) de glicerol (Panreac).

A estirpe de *L. monocytogenes* foi repicada para BHI (Biokar Diagnostics BK015HA) e incubada a 37°C durante 18± 2h horas, seguida de repicagem para PALCAM agar (Biokar Diagnostics BK145HA) suplementado (Biokar Diagnostics BS00408) com posterior incubação a 37°C por 24± 2h horas. Colónias isoladas foram repicadas para BHI (Biokar Diagnostics BK015HA) que foi incubado a 37°C durante 18± 2h. Após este período, o meio de cultura líquido com turvação foi transferido para tubos de centrífuga e centrifugados a 1000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi desperdiçado e o pellet foi ressuscitado com 10 ml de NaCl (0,9%). Este procedimento foi repetido duas vezes. A concentração bacteriana da suspensão foi aferida por densidade ótica (D.O) a 600 nm para valores de absorvância de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1,0 e 1,2. Para o ajustamento da D.O da suspensão foi utilizada a equação $Abs1 \times V1 = Abs2 \times V2$. Para confirmação da concentração bacteriana correspondente a cada D.O foi realizada sementeira à superfície de 0,1 mL da solução-mãe e das respetivas diluições, em duplicado, em PALCAM agar (Biokar Diagnostics BK145HA) suplementado (Biokar Diagnostics BS00408). As placas foram incubadas a 37°C durante 48± 2h. Com objetivo de se obter uma suspensão bacteriana de 8 log₁₀ UFC/ml foram realizados os passos descritos. A concentração celular foi aferida por D.O para 1,2 a 600 nm. A concentração bacteriana foi confirmada através da sementeira de 0,1 ml, da solução-mãe e das respetivas diluições, em duplicado, em PALCAM agar (Biokar Diagnostics BK145HA) suplementado (Biokar Diagnostics BS00408)). As placas foram incubadas a 37°C durante 48± 2h. Após contagem das placas, verificou-se que o inóculo apresentava uma concentração de 6,8 log UFC/ml.

O inóculo de *Listeria monocytogenes* foi preparado a uma concentração de 5×10⁵ UFC/ 80 µL inoculado em cada queijo pretendido.

III. 2. 6. Cocktail de bacteriocinas

A mistura de bacteriocinas usada neste estudo experimental foram produzidas pelas bactérias *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Enterococcus faecium*. Este cocktail foi fornecido pelo laboratório espanhol ABIASA®, usado na concentração de 1:1000ml de leite (Bacteriocina1) e na concentração de 1:250ml de leite (Bacteriocina2).

III. 2. 7. Medição de pH e aw

O valor do pH foi obtido pela média aritmética de três medidas feitas com um medidor de pH 330i WTW colocado diretamente em uma amostra de queijo.

A atividade da água (aw) foi determinada com o aparelho Rotronic – Hygroskop DT.

III. 3. Análise estatística

Os resultados das análises microbiológicas de ambas as partes do estudo foram tratados pelo programa informático *Statistica 7*. Foi efetuada a análise descritiva dos dados e a Análise de dados ANOVA One-Way para avaliar: 1) o efeito do tipo de estabelecimento (Empresa A e B) e o efeito do tempo de maturação dos queijos de cabra e de ovelha (Fase I- pré-salmoura; Fase II- pós-salmoura; Fase III- queijo maturado) no primeiro trabalho; 2) o efeito da adição de bacteriocinas (sem bacteriocinas; bacteriocinas concentração 1; bacteriocinas concentração 2) e efeito do tempo de armazenamento de queijo de ovelha no segundo trabalho. A diferença entre médias foi avaliada pelo teste de Tukey para um nível de significância de 5%.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Microbiota deteriorativa e patogénica de leites e queijos de ovelha e de cabra ao longo do processo da maturação

Na tabela 1 apresentam-se os resultados das contagens médias (e desvio padrão) dos microrganismos deteriorativos e patogénicos, expressos em log ufc/g em leites da Empresa A e B, utilizados para o fabrico dos respetivos queijos. Não se apresentam os dados relativos a *Listeria monocytogenes* uma vez que as contagens foram nulas em todas as amostras.

Tabela 1 - Contagens de Mesófilos, Enterobacteriaceae, *E. coli*, BAL, *S. aureus*, Bolores e Leveduras (log ufc/ml, média e desvio padrão) em leites ao longo do período de armazenamento nas Empresas A e B

Empresa	Mesófilos	Enterob.	<i>E. coli</i>	BAL	<i>S. aureus</i>	Bolores	Leveduras
A	5,96± 1,31	4,74± 1,00	n.d.	5,30 ± 0,95	1,38 ± 2,40	1,45 ± 0,33	5,12 ± 0,43
B	7,75± 0,42	5,03± 0,19	1,32± 1,14	5,28± 0,25	4,34± 0,78	2,84± 0,11	3,47± 0,13

n.d. – não determinado

Pela análise feita aos ambos tipos de leite, verificou-se uma elevada contaminação por microrganismos deteriorativos e alguns microrganismos patogénicos, especialmente no leite de ovelha, proveniente da Empresa B. O leite de cabra (Empresa A) apresentou teores mais elevados apenas nas BAL e Leveduras, sendo os teores de *S.aureus* mais baixos.

O leite no estado cru pode apresentar uma ampla gama de perigos microbiológicos, pelo que a pasteurização permite eliminar as bactérias patogénicas, desde que a relação temperatura/tempo exigida na pasteurização seja cumprida (Kousta *et al.*, 2010; Ferreira, 2013; Rea *et al.*, 2016).

A prevalência de agentes patogénicos em leite cru é influenciada por vários fatores, como o tamanho da exploração, número de animais, práticas de higiene, localização geográfica, estação do ano, entre outros. Vários estudos detetaram agentes patogénicos de origem alimentar em leite cru com origem nos tanques e silos (Kousta *et al.*, 2010).

Tondo e seus colaboradores (2000) verificaram que 90,4% de amostras de leite cru estavam contaminadas com *S. aureus*. No mesmo estudo, o leite cru foi identificado como a principal fonte de contaminação de *S. aureus*, provavelmente por excreção direta do ubere com mastite ou por contaminação fecal. D'Amico e seus colaboradores (2010) verificaram uma contaminação média de 4,23 log ufc/ml em 25 amostras de leite de cabra e um teor médio de 3,58 log ufc/ml

em 15 amostras leite de ovelha, valores inferiores aos observados no presente estudo em ambos os leites.

Na tabela 2 apresentam-se os resultados das contagens médias (e desvio padrão) dos microrganismos mesófilos, expressos em log ufc/g, em queijos, de acordo com a análise ANOVA realizada para o efeito tempo (período de maturação) e efeito estabelecimento.

Tabela 2 - Contagens de mesófilos (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas Empresas A e B

<i>Mesófilos</i>			
Fase de produção	Empresa A	Empresa B	Efeito Estabelecimento
I (pré-salmoura)	7,23±0,87	6,98 ^A ±0,70	n.s.
II (pós-salmoura)	6,97±0,81	7,05 ^A ±0,78	n.s.
III (Queijo maturado)	7,25±1,07	8,12 ^B ±0,36	**
Efeito tempo	n.s	***	

n.s.- não significativo ($p>0,05$); ** - muito significativo ($p<0,01$); *** - altamente significativo ($p<0,001$). Médias que não apresentam letras iguais distinguem-se significativamente ($p<0,05$): letras maiúsculas (colunas) para efeito tempo.

Em relação ao efeito estabelecimento, existem diferenças muito significativas ($p<0,01$) apenas na fase de produção III (fase do queijo maturado), sendo o queijo da empresa B o que apresenta maiores teores em mesófilos.

Relativamente ao efeito tempo, foram observadas diferenças altamente significativas ($p<0,001$) na empresa B, distinguindo-se a fase III de queijo maturado das duas primeiras fases. Nesta empresa verificou-se uma evolução crescente de microrganismos mesófilos, ao longo do tempo, sendo o teor máximo encontrado no queijo maturado.

Apesar de não se observarem diferenças significativas entre as contagens médias obtidas na empresa A, observou-se uma diminuição da microbiota mesófila entre a pré e pós-salmoura e um aumento da mesma até à maturação final do queijo.

Esta variação de valores não é concordante com o observado por Diezhandino e colaboradores (2015), cujas contagens foram superiores aos 2 dias de cura (8 log ufc/g) e diminuiu gradualmente até ao final do período de cura com, aproximadamente, 6 log ufc/g em amostras de queijo produzidas a partir de leite pasteurizado (Diezhandino *et al.*, 2015), tal como na empresa A. Contudo um estudo de 2016, desenvolvido a partir de 22 queijos produzidos com leite cru e

pasteurizado, apresentou contagens de microrganismos mesófilos entre 6,5 log ufc/g e 9,5 ufc/g (Westling *et al.*, 2016), valores que se aproximam dos encontrados neste estudo. Também outro estudo, de 2012, realizado com 41 amostras de queijo de leite cru apresentou valores semelhantes (entre 4,43 log ufc/g e 8,32 log ufc/g) (Brooks *et al.*, 2012).

Esta oposição de evolução entre as empresas poderá justificar-se pela realização de pasteurização do leite na empresa A e na ausência deste processo na empresa B, levando a uma maior multiplicação de mesófilos nos queijos. Outro fator que poderá explicar a elevado teor de mesófilos encontrado em ambas as empresas é a falta de higiene por parte dos manipuladores ao longo de todo o processo.

A tabela 3 apresenta os resultados de contagens médias (e desvio padrão) de BAL, expressos em log ufc/g, após análise ANOVA para o efeito tempo (período de maturação) e efeito estabelecimento.

Tabela 3 - Contagens de BAL (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas Empresas A e B

<i>BAL</i>			
Fase de produção	Empresa A	Empresa B	Efeito Estabelecimento
I (pré-salmoura)	7,78 ^B ±0,27	6,34 ^A ±0,98	***
II (pós-salmoura)	7,19 ^{AB} ±0,50	6,33 ^A ±0,89	**
III (Queijo maturado)	6,41 ^A ±1,71	7,79 ^B ±0,37	**
Efeito tempo	**	***	

n.s.- não significativo (p>0,05); ** - muito significativo (p<0,01); *** - altamente significativo (p<0,001). Médias que não apresentam letras iguais distinguem-se significativamente (p<0,05): letras maiúsculas (colunas) para efeito tempo.

Em relação ao efeito estabelecimento, existem diferenças muito significativas (p<0,01) na fase de produção II e III e altamente significativas (p<0,001) na fase de produção I. Por outro lado, foram observadas diferenças altamente significativas (p<0,001) relativamente ao efeito do tempo na empresa B e muito significativas na empresa A (p<0,01).

A evolução decrescente das contagens na empresa A ao longo do período de maturação são concordantes com os resultados de Diezhandino e colaboradores, num estudo em queijos Valdeon em 2015, cujas contagens de *Lactococci* diminuíram, gradualmente, de 8 log ufc/g para 6 log ufc/g. É sugerido que o declínio dos teores de BAL durante a maturação do queijo é devido

tanto à atividade hidrolítica das suas enzimas como à competição com outros microrganismos com melhor adaptação às condições do meio. Além disso, o desenvolvimento de BAL pode ser influenciado pela concentração de sal e proporção sal/humidade do queijo. Existe uma correlação negativa significativa entre a proporção sal/humidade no queijo e as contagens de BAL. Por outro lado, a libertação de dióxido de carbono por algumas espécies, gera a formação de poros no queijo, facilitando a entrada de ar e o desenvolvimento de *P. roqueforti* (Diezhandino *et al.*, 2015).

Ainda no mesmo estudo é referido que as contagens de *Lactobacilli* aumentaram durante o primeiro mês de maturação com estabilização até ao final do processo (Diezhandino *et al.*, 2015). Esta situação poderá ter ocorrido na empresa B, uma vez que se verificou um aumento de BAL ao longo do período de maturação.

Curiosamente, nas fases I e II de produção verificaram-se maiores contagens de BAL na empresa A, cujos queijos são produzidos com leite pasteurizado, ao contrário da empresa B.

A tabela 4 apresenta os resultados das contagens médias (e desvio padrão) de Enterobacteriaceae, expressos em log ufc/g, após análise ANOVA para o efeito tempo (período de maturação) e efeito estabelecimento.

Tabela 4 - Contagens de Enterobacteriaceae (ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas Empresas A e B

Enterobacteriaceae			
Fase de produção	Empresa A	Empresa B	Efeito Estabelecimento
I (pré-salmoura)	4,13 ^C ±1,24	5,32± 1,03	**
II (pós-salmoura)	3,27 ^B ± 0,73	5,37± 1,08	***
III (Queijo maturado)	2,13 ^A ± 1,94	5,48± 0,91	***
Efeito tempo	**	n.s.	

n.s.- não significativo (p>0,05); ** - muito significativo (p<0,01); *** - altamente significativo (p<0,001). Médias que não apresentam letras iguais distinguem-se significativamente (p<0,05): letras maiúsculas (colunas) para efeito tempo.

Relativamente ao efeito estabelecimento, existem diferenças muito significativas (p<0,01) na fase de produção I e altamente significativas (p<0,001) na fase de produção II e III. Os valores da empresa B apresentam-se mais elevados em todas as fases de produção. De facto, a contagem de Enterobacteriaceae é um bom indicador da qualidade higiénica de um produto, pelo que, contagens elevadas indicam más práticas de higiene durante a recolha de leite e fabrico de queijos

(Diezhandino *et al.*, 2015). Também se poderá concluir que estas diferenças entre empresas se devem à utilização de leite pasteurizado apenas pela empresa A, tal como sugerem estes autores, assim como a existência de condições de higiene adequadas durante o fabrico (Diezhandino *et al.*, 2015).

Quanto ao efeito da fase de produção, apenas se verificou na empresa A ($p < 0,01$), cujos valores, ao longo do processo de maturação, foram diminuindo gradualmente, ainda que se tenham revelado superiores aos de Westling e colaboradores, que apresentavam valores de 1,3 log ufc/g em queijos com leite pasteurizado (Westling *et al.*, 2016). No entanto, na empresa B, os valores mantiveram-se mais ou menos constantes ao longo do tempo, concordantes com os valores mais elevados obtidos pelo mesmo autor em queijos produzidos com leite cru (entre 2,7 e 7,8 log ufc/g), ainda que com um valor médio superior (7,1 log ufc/g) ao obtido no nosso estudo (Westling *et al.*, 2016).

De acordo com Giammanco e seus colaboradores, a qualidade do leite para o fabrico de queijo, bem como o estado de higiene durante o seu fabrico, embalagem e manipulação do mesmo, pode ser avaliada pela análise do teor de Enterobacteriaceae em amostras de queijo (Giammanco *et al.*, 2011).

A tabela 5 apresenta os resultados das contagens médias (e desvio padrão) de *E. coli*, expressos em log ufc/g, após análise ANOVA para o efeito tempo (período de maturação) e efeito estabelecimento.

Tabela 5 - Contagens de *E. coli* (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas Empresas A e B

<i>E. coli</i>			
Fase de produção	Empresa A	Empresa B	Efeito Estabelecimento
I (pré-salmoura)	n.d.	3,27 ^B ± 1,16	--
II (pós-salmoura)	n.d.	3,28 ^B ±1,11	--
III (Queijo maturado)	0,0±0,0	0,95 ^A ±1,22	**
Efeito tempo	--	***	

n.s.- não significativo ($p > 0,05$); n.d. - não determinado; ** - muito significativo ($p < 0,01$); *** - altamente significativo ($p < 0,001$). Médias que não apresentam letras iguais distinguem-se significativamente ($p < 0,05$): letras maiúsculas (colunas) para efeito tempo.

Devido à falta de dados nas fases de produção I e II da empresa A, não se conseguiu estabelecer efeito tempo para essa empresa e, só foi possível estabelecer efeito estabelecimento na fase III de produção, que se revelou muito significativo ($p < 0,01$). Verificou-se efeito tempo altamente significativo ($p < 0,001$) na empresa B, com uma diminuição muito acentuada do teor bacteriano até ao produto final.

As contagens de *E. coli* nos queijos maturados deste estudo revelaram-se inferiores às de Little e seus colaboradores, cujos valores de queijos com qualidade insatisfatória variaram entre 3,04 log ufc/g e 7 log ufc/g (Little *et al.*, 2008). Por outro lado, Brooks e os seus colaboradores apresentaram resultados mais satisfatórios, reportando, de um total de 41 amostras de queijo de leite cru analisado, cinco amostras detetadas com coliformes a níveis entre 1,7 log ufc/g e 3,23 log ufc/g, das quais apenas duas continham *E. coli* com teores de 2 log ufc/g, (Brooks *et al.*, 2012).

Outro estudo de 2015, realizado em queijo romeno fabricado a partir de leite cru, revelou uma contaminação maior no centro da amostra de queijo, cuja média se situou em 3,84 log ufc/g. Estes teores foram similares aos observados nos queijos da empresa B nas fases I e II, também feitos com leite cru. Os autores sugerem que as concentrações mais elevadas de *E. coli* e coliformes no núcleo da amostra de queijo podem indicar falta de higiene na ordenha ou a existência de uma mastite (Georgescu *et al.*, 2015).

A ausência de *E. coli* nos queijos da empresa A, ainda que só analisados na última fase de produção, segue os critérios impostos pelo Regulamento 1441/2007, Cap. 2 – “Critérios de higiene dos processos”, 2.2.2 – “Queijo fabricado com leite ou soro de leite que tenha sido submetido a tratamento térmico” para os mesmos serem classificados como satisfatórios.

A tabela 6 apresenta os resultados das contagens (e desvio padrão) de Bolors, expressos em log ufc/g, após análise ANOVA para o efeito tempo (período de maturação) e efeito estabelecimento.

Tabela 6 - Contagens de Bolores (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas Empresas A e B

<i>Bolores</i>			
Fase de produção	Empresa A	Empresa B	Efeito Estabelecimento
I (pré-salmoura)	0,84 ^A ± 1,07	3,24 ^A ± 0,53	***
II (pós-salmoura)	0,57 ^A ± 0,98	2,93 ^A ± 0,48	***
III (Queijo maturado)	3,04 ^B ± 0,86	3,70 ^B ± 0,76	*
Efeito tempo	***	**	

n.s.- não significativo (p>0,05); * - significativo (p<0,05); ** - muito significativo (p<0,01); *** - altamente significativo (p<0,001). Médias que não apresentam letras iguais distinguem-se significativamente (p<0,05): letras maiúsculas (colunas) para efeito tempo.

Em relação ao efeito estabelecimento, existem diferenças altamente significativas (p<0,001) na fase de produção I e II e significativas (p<0,05) na fase de produção III. As maiores contagens de bolores presentes na empresa B poderão dever-se à ausência de pasteurização do leite nessa empresa. Kure e seus colaboradores recolheram 672 amostras de queijos noruegueses de 4 indústrias onde detetaram a presença de bolores em 202 amostras, isto é, em 30%. No total foram identificados 18 géneros diferentes, sendo *Geotrichum* e *Penicillium* os mais comuns (Kure *et al.*, 2004). Estes autores detetaram contagens altas de bolores em alguns pontos de controlo do ar, enquanto que no leite, nos queijos em salmoura, nos equipamentos e na película plástica que envolve os queijos os teores eram geralmente baixos.

Já no efeito tempo, verificaram-se diferenças altamente significativas (p<0,001) na empresa A e muito significativas (p<0,001) na empresa B. Verifica-se um aumento do crescimento de bolores no queijo maturado, provavelmente pela crescente adaptação não só ao meio e suas características físico-químicas, como também à temperatura de acondicionamento durante o processo de maturação.

A tabela 7 apresenta os resultados das contagens (e desvio padrão) de Leveduras, expressos em log ufc/g, após análise ANOVA para o efeito tempo (período de maturação) e efeito estabelecimento.

Tabela 7 - Contagens de Leveduras (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas Empresas A e B

<i>Leveduras</i>			
Fase de produção	Empresa A	Empresa B	Efeito Estabelecimento
I (pré-salmoura)	2,92 ^A ± 1,07	4,18 ^A ± 0,35	***
II (pós-salmoura)	2,31 ^A ± 1,63	3,81 ^A ± 0,28	**
III (Queijo maturado)	5,24 ^B ± 0,94	5,18 ^B ± 1,19	n.s.
Efeito tempo	***	***	

n.s.- não significativo ($p > 0,05$); ** - muito significativo ($p < 0,01$); *** - altamente significativo ($p < 0,001$). Médias que não apresentam letras iguais distinguem-se significativamente ($p < 0,05$): letras maiúsculas (colunas) para efeito tempo.

Relativamente ao efeito estabelecimento, existem diferenças altamente significativas ($p < 0,001$) na fase de produção e muito significativas ($p < 0,01$) na fase de produção II. Contudo, na fase de produção III as diferenças não são significativas, pelo que se poderá concluir que o facto de a utilização de pasteurização do leite acontecer apenas na empresa A não terá sido relevante.

Por outro lado, tanto a empresa A como a B apresentam diferenças altamente significativas no efeito tempo, distinguindo-se os queijos maturados com os teores mais elevados de leveduras. Estes teores nos queijos maturados das duas empresas, encontram-se muito acima dos obtidos por Brooks e colaboradores, cujas contagens de bolores e leveduras se situaram abaixo de 4 log ufc/g (Brooks *et al.*, 2012).

Estas contagens elevadas de bolores e leveduras podem apontar para uma desinfeção inadequada dos utensílios utilizados para o fabrico de queijos e o uso de matéria-prima contaminada (Romanelli *et al.*, 2016). Estes microrganismos são indesejáveis porque podem sintetizar micotoxinas que podem estar envolvidas em intoxicações alimentares (Jay, 2000).

A tabela 8 apresenta os resultados das contagens (e desvio padrão) de *Staphylococcus aureus*, expressos em log ufc/g, após análise ANOVA para o efeito tempo (período de maturação) e efeito estabelecimento.

Tabela 8 - Contagens de *Staphylococcus aureus* (log ufc/g, média e desvio padrão) em queijos ao longo do período de armazenamento nas Empresas A e B

<i>Staphylococcus aureus</i>			
Fase de produção	Empresa A	Empresa B	Efeito Estabelecimento
I (pré-salmoura)	0,17± 0,46	3,21±1,36	***
II (pós-salmoura)	0,21± 0,45	3,23± 1,29	***
III (Queijo maturado)	0,43± 1,14	3,84±1,26	***
Efeito tempo	n.s.	n.s.	

n.s.- não significativo ($p>0,05$); *** - altamente significativo ($p<0,001$).

Em relação ao efeito estabelecimento, existem diferenças altamente significativas ($p<0,001$) em todas as fases de produção. Observaram-se contagens mais elevadas na empresa B do que na empresa A em todas as fases de produção, provavelmente pela ausência de aplicação de pasteurização na referida empresa, como já tem sido referido. Ainda assim, estes valores foram inferiores aos resultados obtidos por Morgan e colaboradores de 4 a 5 log ufc/g de (Morgan *et al.*, 2003), sendo estes valores relatados por D'Amico e colaboradores (2010) como níveis preocupantes. Contagens elevadas também foram observadas em queijos produzidos a partir de leite cru nos Estados Unidos (D'Amico e Donnelly, 2010). Kousta e seus colaboradores, num estudo de revisão, relataram um estudo realizado na Irlanda com 351 amostras de queijo de leite pasteurizado e não pasteurizado onde se detetou doze amostras com teores elevados de *S. aureus*, superiores a 4 log ufc/g, em que a fonte de contaminação era o processo de fabrico (Kousta *et al.*, 2010). Por outro lado, Brooks e colaboradores relataram poucas amostras com *S. aureus* num total de 41 queijos de leite cru, com valores inferiores a 2 log ufc/g e apenas uma amostra com mais de 4 log ufc/g (Brooks *et al.*, 2012).

Relativamente ao efeito fase de produção não se verificaram diferenças significativas nem na empresa A nem na empresa B. As contagens de *S. aureus* mantiveram-se em média constantes desde o início até ao fim do processo de maturação em cada empresa. Contrariamente, Little e colaboradores refere que na maioria dos queijos, *S. aureus* pode reduzir significativamente durante o armazenamento e processo de maturação. Este autor refere ainda que, se os níveis de *S. aureus* excederem 4,70 log ufc/g em qualquer ponto há um risco significativo para a produção

enterotoxinas que permanecerão no queijo independentemente do nível restante deste microrganismo (Little *et al.*, 2008).

Neste sentido, dado *S. aureus* ser considerado um dos agentes patogénicos mais prevalentes (Kousta *et al.*, 2010) e a causa mais comum de mastite em bovinos de aptidão leiteira (Little *et al.*, 2008) é imperativa a aplicação de medidas para reduzir a presença de *Staphylococcus* spp. no leite nas explorações. Segundo Romanelli e colaboradores (2016) é igualmente importante avaliar a existência de outros possíveis reservatórios da bactéria no sistema de ordenha que possam permitir novas infeções, tais como o próprio animal (pelas lesões cutâneas), o pessoal de ordenha (com mãos contaminadas) ou o equipamento de ordenha (com formação de biofilmes). Depois desta fase, a utilização de pasteurização no leite é uma medida de segurança por ser capaz de destruir as células de *S. aureus* (Kousta *et al.*, 2010).

O Regulamento 1441/2007, Cap. 2 – Critérios de higiene dos processos, 2.2.3 - Queijo fabricado com leite cru, classifica como nível satisfatório se todos os valores observados forem menores que 10^4 ufc/g de *S. aureus* positivos. Neste contexto, os queijos da empresa B, fabricados com leite cru, revelaram em média $1,6 \times 10^3$ ufc/g na fase I, $1,7 \times 10^3$ ufc/g na fase II e $6,9 \times 10^3$ ufc/g na fase III, valores que se encontram abaixo do limite imposto.

O mesmo Regulamento e capítulo, 2.2.4 - Queijo fabricado com leite que tenha sido submetido a tratamento térmico mais baixo que o da pasteurização e queijo curado fabricado com leite ou soro de leite que tenha sido submetido a pasteurização ou tratamento térmico mais elevado classifica como nível satisfatório se todos os valores observados forem menores que 100 ufc/g de *S. aureus*. Assim, os queijos da empresa A, cujo leite sofreu pasteurização, encontram-se nessa categoria, uma vez que, apresentaram em média 1,47 ufc/g na fase I, 1,62 ufc/g na fase II e 2,69 ufc/g na fase III de produção.

Relativamente às contagens de *Listeria monocytogenes*, verificou-se neste estudo que nunca houve contagem de colónias típicas de *Listeria monocytogenes* ao longo de todo o processo de maturação, em todos os queijos analisados das empresas A e B.

A tabela 9 apresenta os resultados da presença de *Staphylococcus aureus*, expressos em unidades de queijo por lote, em que cada lote, em cada fase de produção, de cada empresa, engloba 5 unidades de queijo, perfazendo um total de 15 queijos por lote em cada empresa por fase de produção.

Tabela 9 - Presença de *Staphylococcus aureus* (nº de amostras positivas) em queijos ao longo do período de maturação nas Empresas A e B

Presença de <i>Staphylococcus aureus</i>								
Fase de produção	Empresa A				Empresa B			
	Lote 1 (n=5)	Lote 2 (n=5)	Lote 3 (n=5)	Total	Lote 1 (n=5)	Lote 2 (n=5)	Lote 3 (n=5)	Total
I (pré-salmoura)	0	0	2	2	4	1	5	10
II (pós-salmoura)	1	0	3	4	3	2	5	10
III (Queijo maturado)	4	2	4	10	5	1	1	7
Total (n=45)	5	2	9	16	12	4	11	27

Em nenhuma empresa, em nenhum lote se verifica o efeito inibidor da aplicação da salmoura, uma vez que não se constata diminuição de contaminação entre as fases I e II.

Na empresa A, verificou-se um aumento no número de queijos contaminados da fase II para a fase III em todos os lotes. No primeiro lote, foi detetado *S. aureus* num queijo na fase de produção II e em quatro queijos na fase de produção III, perfazendo um total de 5 queijos em 15 desse lote. O segundo lote foi o menos contaminado. Já o terceiro lote foi claramente o mais contaminado ao longo do processo de maturação, detetando-se a presença deste microrganismo em 9 queijos: 2 queijos na fase I; 3 queijos na fase II e em 4 queijos na última fase de produção. O facto do número de amostras contaminadas ser mais elevado na fase III, torna-se preocupante em termos de segurança alimentar por se tratar de um produto final, destinado ao consumidor. Poder-se-á concluir que esta presença acentuada de *S. aureus* no produto final se deverá à contaminação cruzada, manipulação incorreta e falta de higiene por parte dos manipuladores.

Por outro lado, na empresa B detetou-se a presença deste microrganismo de forma semelhante em todos os lotes, em todas as fases de produção, estando presente num total de 27 queijos. No primeiro lote, verificou-se presença de *S. aureus* em todas as fases de maturação, especialmente na última em que se detetou *S. aureus* na totalidade de queijos. Em contrapartida, o segundo lote apenas revelou um total de 4 queijos contaminados por esta bactéria. Por último, no lote 3, detetou-se este microrganismo nos 5 queijos nas fases I e II de produção; na última fase, apenas esteve presente num queijo, o que totalizou 11 queijos contaminados.

De uma forma geral, verifica-se uma maior contaminação de *S. aureus* nos queijos da empresa B em relação à empresa A, muito acentuada no lote 1 no produto final. Estes resultados podem dever-se à ausência de pasteurização do leite praticada na empresa B, mas também às más práticas de higiene e contaminação por parte dos manipuladores. Sabe-se que *S. aureus* pode ser transmitido ao leite por excreção direta a partir do úbere infetado com mastite estafilocócica clínica ou subclínica (Little *et al.*, 2008; Kousta *et al.*, 2010). Além disso, os seres humanos têm sido apontados como fonte de contaminação do queijo com bactérias patogénicas, como *S. aureus* (Kousta *et al.*, 2010). Tondo e colaboradores (2000) avaliaram a presença de *S. aureus* numa indústria de processamento de laticínios por dois anos e meio, a fim de identificar possíveis fontes de contaminação. No mesmo estudo, o leite cru foi descrito como a principal fonte de contaminação de *S. aureus* e os manipuladores foram apontados como uma fonte potencial de contaminação do produto final (Tondo *et al.*, 2000). Noutro estudo apresentado por Kousta e colaboradores, 10 amostras de 3200 produtos lácteos foram positivas para *S. aureus*, cerca de 90% das amostras de leite cru estavam contaminadas com esta bactéria e 35% dos manipuladores de alimentos eram portadores assintomáticos de *S. aureus* (Kousta *et al.*, 2010). Os mesmos autores verificaram em vários estudos taxas de prevalência de *S. aureus* que variaram significativamente, de 13% a 53%, em queijos com diferentes tipos de leite/tratamentos térmicos (Kousta *et al.*, 2010). Em Itália, Cremonesi e colaboradores analisaram um total de 33 amostras de queijos de leite cru fornecidos por grandes e pequenos produtores, sendo todas as amostras positivas à contaminação *S. aureus* (Cremonesi *et al.*, 2007).

A tabela 10 apresenta os resultados da presença de *Listeria monocytogenes*, expressos em unidades de queijo por lote. Cada lote, em cada fase de produção, de cada empresa, engloba 5 unidades de queijo, perfazendo um total de 15 queijos por lote em cada empresa.

Tabela 10 - Presença de *Listeria monocytogenes* (nº de amostras positivas) em queijos ao longo do período de maturação nas Empresas A e B

Presença de <i>Listeria monocytogenes</i>								
Fase de produção	Empresa A				Empresa B			
	Lote 1 (n=5)	Lote 2 (n=5)	Lote 3 (n=5)	Total	Lote 1 (n=5)	Lote 2 (n=5)	Lote 3 (n=5)	Total
I (pré-salmoura)	0	0	0	0	0	1	0	1
II (pós-salmoura)	0	1	0	1	0	0	0	0
III (Queijo maturado)	0	0	0	0	0	2	2	4
Total (n=45)	0	1	0	1	0	3	2	5

Na empresa A, apenas se detetou a presença de *L. monocytogenes* num queijo, do lote 2, na fase II de produção. Por outro lado, na empresa B, não foi detetada no primeiro lote de queijos, tendo sido encontrada no segundo lote num queijo na fase I de produção e em 2 queijos na última fase de maturação e em 2 queijos da fase III no lote 3. Nota-se que a presença deste microrganismo é mais marcada na empresa B, mesmo em queijos com o processo de maturação finalizado, prontos a serem consumidos. Poder-se-á sugerir que, mais uma vez, a ausência de pasteurização do leite e a falta de higiene dos manipuladores possam potenciar o desenvolvimento deste patogénico. Já Bradshaw e colaboradores afirmam que o aquecimento a 72°C durante 15 segundos foi adequado para destruir *L. monocytogenes* em leite inteiro (Bradshaw *et al.*, 1985). Na literatura, ainda que não recente, há vários estudos que mostram diferenças nas taxas de prevalência de *L. monocytogenes* entre queijo feito de leite cru e leite pasteurizado (Beckers *et al.*, 1987; Loncarevic *et al.*, 1995). Há também estudos que revelaram que a prevalência de agentes patogénicos de origem alimentar no queijo varia significativamente. As taxas de prevalência de *L. monocytogenes* em queijos de retalho parecem depender não só do tratamento térmico do leite, como também do tipo de queijo, das suas propriedades intrínsecas e as condições de processamento. As câmaras de refrigeração também são indicadas como fonte de *L. monocytogenes* contaminação do queijo feito de leite pasteurizado (Brito *et al.*, 2008).

Fazendo referência ao estudo realizado na Irlanda, com 351 amostras de queijo de 15 produtores de queijo, de leite não pasteurizado e pasteurizado, a prevalência de *L. monocytogenes* foi de 5,9%, isto é, 21 queijos (O'Brien *et al.*, 2009)

Por outro lado, Brooks e colaboradores (2012) relatam que, de um total de 41 amostras de queijo de leite cru, a pesquisa de *L. monocytogenes*, entre outros patogénicos foi negativa (Brooks *et al.*, 2012). Num estudo com 181 amostras, também com queijos de leite cru, apenas uma foi positiva para *L. monocytogenes* (Ryser, 2007). Outro estudo com 1819 queijos de leite cru e leite tratado termicamente, 17 amostras deram positivo para *L. monocytogenes* (Little *et al.*, 2008). De uma forma geral, a presença de *L. monocytogenes* em queijos de leite cru europeus tem sido frequentemente relatada (Knight *et al.*, 2008) e uma preocupação devido ao seu potencial de crescimento e sobrevivência a longo prazo, mesmo sob condições de refrigeração (Kousta *et al.*, 2010).

A fim de prevenir a colonização do ambiente de processamento por *L. monocytogenes*, o layout da planta, o equipamento, assim como os procedimentos de limpeza e desinfeção devem ser delineados no sentido de diminuir a ocorrência e multiplicação de *Listeria* spp. numa fábrica de queijo (Kousta *et al.*, 2010). Menendez e colaboradores relataram que nenhuma colónia de *Listeria* spp. foi recuperada no ambiente de laticínios e equipamento quando utilizaram detergente à base de cloro e um tempo de aplicação mais longo. Demonstraram também que procedimentos de limpeza e desinfeção incorretos podem determinar a contaminação pós-pasteurização de produtos de queijo (Menendez *et al.*, 1997). É imperativo existir a consciencialização de que práticas de higiene adequadas e controlo de temperatura são fundamentais para evitar a contaminação do ambiente de produção e o crescimento de patogénicos, como *L. monocytogenes* e *S. aureus*, no queijo (Little *et al.*, 2008).

Atualmente, é uma exigência legal na União Europeia que todos os queijos feitos com leite cru e em venda a retalho sejam claramente identificados com as palavras "feito com leite cru", de modo a informar a escolha do consumidor (Little *et al.*, 2008). Como já foi referido neste trabalho, grupos suscetíveis, como mulheres grávidas e imunocomprometidos, são aconselhados a não consumir queijos de paste mole maturado como Camembert, Brie ou Chevre, ou outros com casca semelhante, e queijos azuis, pois podem mais facilmente conter *L. monocytogenes* (Little *et al.*, 2008).

IV.2. Efeito de bacteriocinas no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijos de ovelha

A tabela 11 apresenta os resultados de *Listeria monocytogenes*, expressos em log ufc/g, que resultaram da análise ANOVA realizada com objetivo de verificar se existe efeito tempo (período de maturação) e efeito dose de bacteriocinas.

Tabela 11 - Contagens de *Listeria monocytogenes* (log ufc/g, média e desvio padrão) nos queijos produzidos em laboratório inoculados apenas com *Listeria monocytogenes* (LM) e com a associação de *Listeria monocytogenes* com bacteriocinas nas doses 1 e 2 (LMB1 e LMB2), ao longo do período de armazenamento

Tempo	LM	LMB1	LMB2	Efeito dose bacteriocinas
0	6,22 A ± 0,9	-	-	-
1	6,21 Aa ± 0,12	6,18 Aa ± 0,11	6,16 Aa ± 0,12	n.s.
2	6,39 Aa ± 0,08	6,38 Aa ± 0,12	6,01 Ab ± 0,02	**
3	6,92 Ba ± 0,14	6,96 Ba ± 0,07	4,72 Bb ± 0,36	***
4	7,16 Ba ± 0,09	6,98 Ba ± 0,11	4,82 Bb ± 0,11	***
5	7,56 Ba ± 0,15	6,97 Bb ± 0,08	4,74 Bc ± 0,13	***
Efeito tempo	***	***	***	

n.s.- não significativo ($p > 0,05$); ** - muito significativo ($p < 0,01$); *** - altamente significativo ($p < 0,001$). Médias que não apresentam letras iguais distinguem-se significativamente ($p < 0,05$): letras maiúsculas (colunas) para efeito tempo; letras minúsculas (linhas) para efeito dose bacteriocinas.

Em relação ao efeito tempo, verificaram-se diferenças altamente significativas ($p < 0,001$) tanto nos queijos inoculados apenas com *Listeria monocytogenes* (LM) como nos queijos que continham o microrganismo e as bacteriocinas, com a dose 1 e com a dose 2 (LMB1 e LMB2). Nos queijos LM, sem adição de bacteriocinas, observou-se uma multiplicação microbiana ao longo do tempo de armazenamento, apresentando os teores de *L. monocytogenes* mais elevados no tempo 5, os quais diferem significativamente dos obtidos nos restantes tempos. Nos queijos LMB1, o desenvolvimento de *L. monocytogenes* não foi tão marcado pela presença das bacteriocinas na dose 1, mantendo-se entre valores mais ou menos constantes a partir do tempo 3. Já nos queijos LMB2, verificou-se uma diminuição altamente significativa dos níveis de *L. monocytogenes* do tempo 2 para o tempo 3, mantendo-se depois os teores mais ou menos constantes até ao final do tempo de maturação.

Quando observamos o efeito dose bacteriocinas, verificamos que diferenças muito significativas ($p < 0,01$) no tempo 2 e altamente significativas ($p < 0,001$) nos tempos 3, 4 e 5.

Como já foi referido, as bacteriocinas utilizadas foram produzidas por *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Enterococcus faecium*. Existem vários estudos que reportam a produção de bacteriocinas por estirpes de *E. faecium* comparativamente a *L. rhamnosus* e *L. casei*, e cuja produção se verifica *in vivo* durante o fabrico do queijo e não *in vitro* como no presente estudo, pelo que a dose utilizada nos estudos referidos não é mensurável. Estudos sobre a produção de enterocinas *in vitro* através de *E. faecium* são escassos, à exceção da enterocina 1146, cuja produção foi estudada em detalhe e revelado um efeito anti-bacteriano rápido sobre *L. monocytogenes* (Moreno *et al.*, 2003).

De facto, várias estirpes de *E. faecium* foram estudadas, considerando a sua forte atividade anti-*Listeria*. (Pingitore *et al.*, 2012), verificou um desenvolvimento do patogéneo, nos primeiros seis dias, semelhante nos queijos com e sem estirpe produtora de bacteriocinas, *E. faecium* ST88Ch. Contudo após 12 dias, as contagens de *L. monocytogenes* foram 3 log ufc/g inferiores nos queijos com o agente bacteriostático (Favaro *et al.*, 2015). Também *E. faecium* RZS C5 e *E. faecium* DPC 1146 são referidos como produtores de enterocinas com alta atividade anti-*Listeria* (Moreno *et al.*, 2003). *E. faecium* WHE 81 foi também identificado como um produtor de varias bacteriocinas, cuja atividade antibacteriana contra *L. monocytogenes* foi testada em queijo Munster. O facto de *E. faecium* WHE 81 poder produzir várias bacteriocinas com diferentes estruturas é uma característica interessante, especialmente pela atividade sinérgica de duas bacteriocinas produzidas. Neste estudo, a redução das contagens de *L. monocytogenes* coincidiu com o desenvolvimento de *E. faecium* WHE 81 e respetiva produção de bacteriocinas. A adição desta estirpe na salmoura aquando da produção do queijo Munster deteve o desenvolvimento do patogéneo, além de ser capaz de reduzir o seu crescimento à superfície, se *E. faecium* WHE 81 for utilizada como cultura de superfície no início da maturação. Assim, esta estirpe parece ser uma medida promissora para combater o desenvolvimento de *L. monocytogenes* numa linha de produção contaminada (Izquierdo *et al.*, 2009). Num outro estudo, é referido que, entre as *Enterococci*, as espécies de *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* são as prevalentes em laticínios, e também produtoras de uma variedade de enterocinas com atividade contra vários patogéneos, entre eles, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. De uma forma particular, a enterocina A e enterocina B, são bacteriocinas produzidas por várias espécies de *Enterococci*, capazes de atuar contra *L. monocytogenes* de uma forma sinérgica e complementar que pode reduzir o desenvolvimento de populações resistentes à ação das bacteriocinas (Ghraiiri *et al.*, 2008). Ainda segundo estes autores, outra estirpe da mesma espécie, *E. faecium* MMT 21, isolada a partir de queijo Rigouta, produz substâncias ativas contra patogéneos de origem alimentar, incluindo *B. cereus*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, com capacidade de termoestabilidade. Aspeto a ter em conta se forem usadas

como bioconservadores, uma vez que muitos processos e etapas de fabrico alimentar envolve tratamentos térmicos. O resultados deste estudo mostraram a capacidade de *E. faecium* MMT 21 produzir enterocinas A e B (Ghraiiri *et al.*, 2008). Num estudo mais recente, de 2017, os autores testaram a atividade antimicrobiana de três estirpes de *E. faecium*: *E. faecium* DM 33, *E. faecium* DM 224 e *E. faecium* DM 270, contra quatro patogéneos, entre eles *L. monocytogenes*. Os resultados revelaram que, entre os *Enterococci* testados, *E. faecium* DM 33 foi quem apresentou um melhor potencial anti-*Listeria*. Nos queijos controlo, inoculados apenas com o patogéneo, as contagens de *L. monocytogenes* atingiram 6,50 log ufc/g ao sexto dia e 7,38 log ufc/g ao nono dia, valores semelhantes aos do presente estudo nos tempos 3 e 4 (sete e catorze dias de armazenamento, respetivamente). Já nos queijos com *E. faecium* DM 33, após 6 dias de armazenamento a 4°C, as contagens de *L. monocytogenes* foram reduzidas em mais de 4 log ufc/g em comparação com os queijos controlo, e no nono dia de armazenamento, nenhuma colónia do patogéneo foi recuperada. Por outro lado, tanto *E. faecium* DM 270 e DM 224 apenas inibiram e não reduziram a multiplicação de *L. monocytogenes* até ao fim do período de armazenamento (Aspri *et al.*, 2017).

Considerando a sua forte atividade antimicrobiana contra a espécie de *L. monocytogenes*, várias estirpes de *E. faecium* exibem um potencial promissor para serem culturas bio-conservadoras em alimentos fermentados (Ghraiiri *et al.*, 2008; Izquierdo *et al.*, 2009; Pingitore *et al.*, 2012; Favaro *et al.*, 2015; Aspri *et al.*, 2017). Por outro lado, a biodisponibilidade da atividade das bacteriocinas será provavelmente o fator determinante para uma ação antibacteriana *in situ* (Coelho *et al.*, 2014), que, por sua vez, pode ser influenciada pela estrutura e composição físico-química do alimento e sua interação com as bacteriocinas (Aspri *et al.*, 2017).

Estudos feitos com *L. rhamnosus*, mostram um efeito antibacteriano contra *L. monocytogenes* (Rolim *et al.*, 2015; Mpofu *et al.*, 2016). No entanto, não é claro se esse efeito se deve exclusivamente ou não às bacteriocinas produzidas. Rolim e colaboradores referem taxas de inibição de *L. monocytogenes* de 2,62%, 1,57% e 10,23% a 7, 14 e 21 dias de armazenamento, respetivamente (Rolim *et al.*, 2015).

Num outro estudo experimental, a contagem inicial de *L. monocytogenes* numa amostra com 150 UA/ml de rhamnocina 519 foi de 6,06 log ufc/ml, com uma diminuição para 0,33 log ufc/ml ao fim de 3 horas e nenhuma célula viável foi detetável ao fim de 9 horas. Com o dobro da concentração, isto é, numa amostra com 300 UA/ml de rhamnocina 519, a contagem de *L. monocytogenes* diminuiu de 5,84 log ufc/ml para valores não detetáveis ao fim de 3 horas. Estes resultados indicam uma forte atividade anti-listerial por parte de rhamnocina 519 (Jeong e Moon, 2015). O efeito proporcional à concentração da bacteriocina utilizada nesse estudo está de acordo

com os resultados obtidos no presente trabalho, apesar das contagens não serem nulas no final do tempo de maturação.

Num estudo com *L. casei* RN 78 e respetiva produção de bacteriocinas, a adição de 6400 UA/ml de bacteriocina, reduziu as contagens de *L. monocytogenes* de 5,81 log ufc/g para 3,16 log ufc/g ao 15º dia de armazenamento a 4°C e para 0,86 log ufc/g no fim do armazenamento à mesma temperatura, ao 90º dia. Estes valores de (Mojgani *et al.*, 2010) representam uma redução mais eficaz da contaminação por *L. monocytogenes* do que no presente estudo, em que no tempo 4 (14 dias de maturação), sendo as contagens 4,82 log ufc/g nos queijos inoculados com a dose mais alta de bacteriocinas (LMB2). Por outro lado, aquando da combinação de *L. monocytogenes* e *L. casei* RN 78, a redução das contagens do patógeno já não foi tão evidente, sendo as contagens finais, ao 90º dia de armazenamento de 5,30 log ufc/g. Esta diferença de resultados sugere uma maior eficácia na redução da contaminação de *L. monocytogenes* com a inoculação de bacteriocinas do que a espécie produtora das mesmas, a temperatura de refrigeração de 4°C (Mojgani *et al.*, 2010).

A Figura 10 mostra a evolução do comportamento de *L. monocytogenes* ao longo do período de maturação, em queijos de ovelha inoculados apenas com *L. monocytogenes* (LM), em queijos de ovelha com *L. monocytogenes* e com a dose 1 de bacteriocinas (LMB1) e por último, em queijos de ovelha que contêm *L. monocytogenes* e a dose 2 da mesma mistura de bacteriocinas (LMB2).

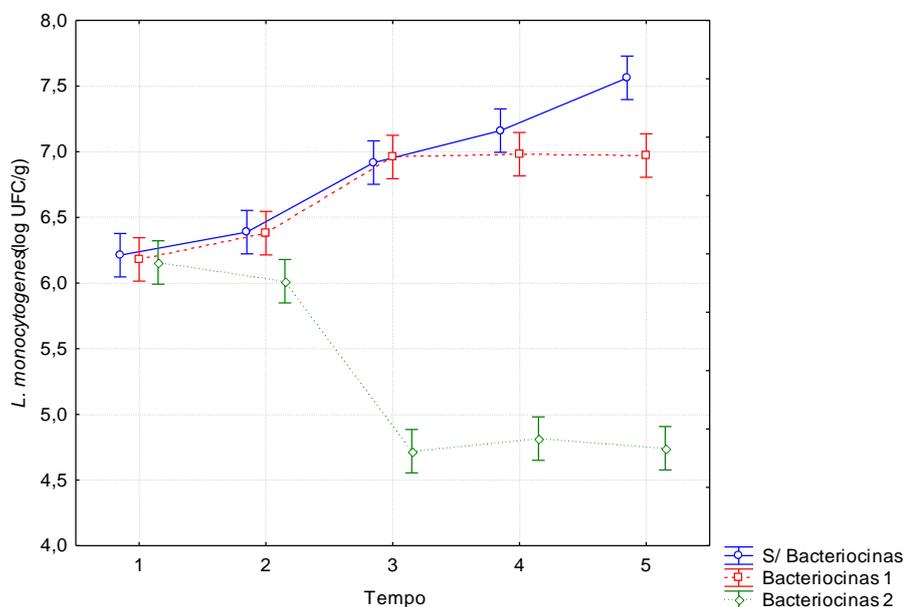


Figura 10: Evolução do comportamento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) ao longo do tempo, nos queijos com *L. monocytogenes* e nos queijos com *L. monocytogenes* e as duas doses de Bacteriocinas, respetivamente

Nos queijos sem bacteriocinas (LM), *L. monocytogenes* apresentou uma multiplicação constante ao longo do tempo. Já nos queijos que continham a dose 1 de bacteriocinas (LMB1), o desenvolvimento de *L. monocytogenes* abrandou a partir do tempo 3, mantendo-se a uma concentração quase constante até ao tempo 5. Esta redução sugere um efeito anti-bacteriano das bacteriocinas também presentes, ainda que na dose mais baixa. Nos queijos inoculados com a dose mais alta da mistura de bacteriocinas (LMB2), houve, desde o tempo 1, uma diminuição dos níveis de *L. monocytogenes*. Este decréscimo verificou-se mais acentuado entre o tempo 2 e 3, havendo posteriormente uma estabilização do desenvolvimento deste microrganismo. Assim, verifica-se que a ação das bacteriocinas é mais acentuada entre o tempo 2 e 3, ou seja, entre o terceiro e o sétimo dia de ensaio. Além disso, o efeito anti-bacteriano das bacteriocinas apenas se torna mais evidente e eficaz em doses mais elevadas (1:250ml), revelando pouco interesse no seu uso em doses mais baixas (1:1000ml).

Embora as bacteriocinas possam ser produzidas *in vivo*, durante a produção e maturação do queijo, as concentrações alcançadas são muito mais baixas do que aquelas alcançadas em fermentações *in vitro*, sob condições ótimas de crescimento e produção. Contudo, a segurança e as características tecnológicas das bactérias devem ser consideradas antes de serem aplicadas (Favaro *et al.*, 2015).

A Figura 11 mostra a evolução do desenvolvimento de Mesófilos, *Enterobacteriaceae*, BAL, Leveduras e Bolores ao longo do tempo nos queijos testemunha ou controlo negativo (C), isto é, queijos que não sofreram qualquer adição, nem de bacteriocinas, nem de *L. monocytogenes*.

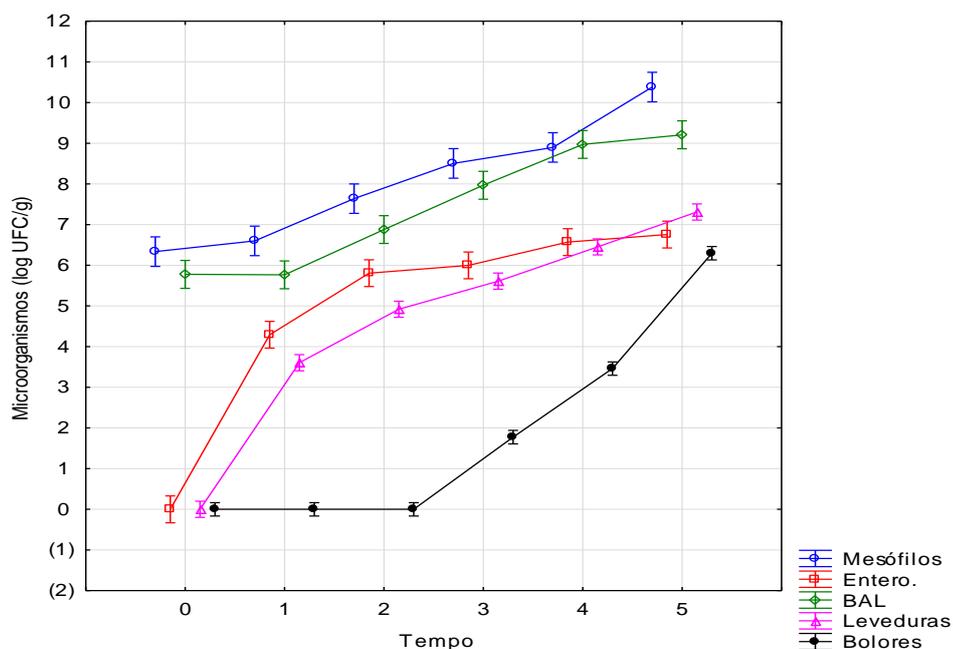


Figura 11: Evolução do desenvolvimento de microrganismos deteriorativos (log UFC/g) ao longo do tempo, nos queijos controlo (C)

Relativamente aos Mesófilos, logo no tempo 0, é visível que os queijos já continham uma grande carga microbiana, que se foi revelando crescente até ao final do armazenamento. Brooks e colaboradores (2012) num estudo realizado com 41 amostras de queijo, obtiveram valores que variaram entre 4,43 log ufc/g e 8,32 log ufc/g, inferiores aos obtidos no nosso estudo que variaram em média entre 6,33 e 10,38 log ufc/g.

No tempo 0, verificou-se que os queijos apresentaram contagens elevadas de BAL, que se mantiveram mais ou menos estáveis até ao tempo 1, momento em que se iniciou um desenvolvimento microbiano constante até ao tempo 4, diminuindo de intensidade até ao último tempo. Diezhandino e colaboradores (2015) tiveram resultados concordantes, já que relataram aumento de contagens de *Lactobacilli* durante o primeiro mês de maturação de queijos. *Enterobacteriaceae* não foram detetadas logo após o fabrico dos queijos, mas com grande desenvolvimento até ao tempo 1, sendo este mais reduzido até ao tempo 5. Em relação às Leveduras, estas apresentaram níveis muito baixos no início. Contudo, o seu desenvolvimento foi sempre crescente, ainda que mais acentuado até pouco depois do tempo 1. Os Bolores não foram detetados até ao tempo 2, momento a partir do qual se verificou um desenvolvimento mais ou menos constante até ao final de armazenamento.

A tabela 12 apresenta as contagens da microbiota deteriorativa, expressas em log ufc/g, dos queijos controlo (C) desde o tempo 0 até ao tempo 5, resultantes da análise ANOVA, demonstrando o efeito tempo ao longo da maturação.

Tabela 12 - Contagens dos microrganismos deteriorativos (log ufc/g, média e desvio padrão) nos queijos controlo (C) ao longo do período de armazenamento

Tempo	Mesófilos	<i>Enterobacteriaceae</i>	BAL	Leveduras	Bolores
0	6,33A ± 0,07	0,00A ± 0,00	5,78A ± 0,13	0,00A ± 0,00	0,00A ± 0,00
1	6,60A ± 0,09	4,29B ± 0,15	5,76A ± 0,05	3,60B ± 0,04	0,00A ± 0,00
2	7,64B ± 0,12	5,81C ± 0,21	6,88B ± 0,14	4,92C ± 0,18	0,00A ± 0,00
3	8,67C ± 0,15	6,00C ± 0,33	7,97B ± 0,08	5,61D ± 0,07	1,77B ± 0,07
4	8,49C ± 0,62	6,57CD ± 0,38	8,97C ± 0,58	6,45DE ± 0,22	3,46C ± 0,15
5	10,38D ± 0,52	6,76D ± 0,30	9,21C ± 0,26	7,31E ± 0,25	6,30D ± 0,28
Efeito tempo	***	***	***	***	***

*** - altamente significativo (p<0,001). Médias que não apresentam letras iguais distinguem-se significativamente (p<0,05): letras maiúsculas (colunas) para efeito tempo.

Desde o tempo 0 até ao tempo 5, as contagens médias de Mesófilos, *Enterobacteriaceae*, BAL, Leveduras e Bolores diferem de forma altamente significativa ($p < 0,001$). Os Mesófilos apresentaram contagens elevadas logo desde o tempo 0, que se foram revelando sempre crescentes, ainda que com mais intensidade no último tempo. *Enterobacteriaceae* não foram detetadas no início, contudo, verificou-se um grande desenvolvimento no tempo 1, mantendo-se este crescente, porém, com menos intensidade, até ao tempo 5. Estes valores foram concordantes com os obtidos por Westling e colaboradores (2016) em amostras de queijos produzidos com leite cru, ainda que estes tenham sido um pouco mais elevados (entre 2,7 e 7,8 log ufc/g).

Em relação às BAL, verificaram-se contagens elevadas logo após o fabrico do queijo, sendo que os teores foram aumentando, de forma mais ou menos constante até ao final do tempo de maturação. Por outro lado, as Leveduras não foram detetadas no tempo 0, mas a partir do tempo 1, com um crescimento progressivo até ao tempo 5. Por último, não se verificou crescimento de Bolores até ao tempo 3, momento em que se notou desenvolvimento dos mesmos e se manteve até ao final. Kure e seus colaboradores (2004) realçam a importância da necessidade de existir uma atmosfera de boa qualidade, com baixa contaminação, nas salas de produção, a fim de reduzir a contaminação dos queijos com bolores.

A tabela 13 apresenta os valores de pH e a_w nos queijos controlo produzidos, armazenados a 8°C. O valor inicial de pH foi de 6,67, revelando uma ligeira descida durante a maturação.

Tabela 13: Valores de pH e a_w das amostras Controlo, armazenadas a 8°C

Tempo	pH	a_w
0	6,67	0,984
3	6,59	0,980
4	6,33	0,965
5	5,84	0,957

Pela análise da tabela anterior, verifica-se uma diminuição do pH ao longo do tempo de maturação, mais evidente no tempo 5 (28 dias), provavelmente relacionada com os elevados teores de BAL que produzem substâncias que acidificam o meio, nomeadamente ácido láctico. Buriti e colaboradores (2005) estudaram o queijo fresco por um período de 21 dias armazenado a 8 ° C, em que obtiveram uma redução de pH foi de 6,66 a 5,85, valores semelhantes aos deste

estudo. Valores concordantes foram ainda obtidos por Macedo *et al.* (2004) em queijos de ovelha “Serra da Estrela”, verificando uma diminuição do pH de 6,37 a 5,23.

Relativamente aos valores de a_w verificou-se uma ligeira redução ao longo do tempo, ainda que os níveis se mantenham elevados o suficiente o que constitui um fator favorável ao desenvolvimento microbiano. Esta diminuição Diezhandino e colaboradores (2015) apresentaram resultados concordantes, ainda que ligeiramente inferiores (de 0,979 a 0,945) aos obtidos no nosso estudo.

V. CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho foi possível avaliar a microbiota deteriorativa e patogénica dos leites e dos queijos de ovelha e de cabra ao longo do processo de maturação e o efeito da adição de bacteriocinas no comportamento de *Listeria monocytogenes* inoculada em queijos de ovelha. Confirma-se, entre outros aspetos, a importância da necessidade da aplicação da pasteurização no leite destinado ao fabrico de queijo, uma vez que a contaminação se verificou superior no queijo de ovelha fabricado com leite cru.

Da microbiota patogénica quantificada, detetaram-se contagens de *S. aureus* e *E. coli* superiores nos queijos de ovelha. Contudo, nos procedimentos de pesquisa, detetou-se a presença de *S. aureus* num número superior nos queijos maturados de cabra comparativamente aos de ovelha. A presença de *L. monocytogenes* foi apenas detetada nos queijos maturados de ovelha, o que sugere práticas incorretas ou uma contaminação posterior do leite. Neste sentido, é de salientar a necessidade de uma adoção e implementação contínua de programas de segurança alimentar baseados nos princípios HACCP ao longo da cadeia de produção, a fim de melhorar a higiene na exploração, a redução na carga microbiana no leite cru, a segurança no produto e para o consumidor final, reduzindo desta forma a transmissão de doenças por alimentos. Entre outras medidas é imperativo implementar práticas de produção primária que garantam a saúde animal, o controlo de mastites, boas práticas de ordenha, um programa de certificação para contrariar a distribuição de animais infetados, a aplicação de um tratamento térmico eficaz do leite (como a referida pasteurização), o controlo para evitar a contaminação pós-pasteurização, assim como boas práticas de higiene das instalações e dos manipuladores.

Na segunda parte deste trabalho, verificou-se um efeito significativo da adição de bacteriocinas oriundas de diferentes espécies (*L. casei*, *L. rhamnosus* e *Enterococcus faecium*) na redução da multiplicação de *L. monocytogenes* quando se adicionou uma concentração de bacteriocinas mais elevada (1200 UA/ml), sendo que as concentrações mais baixas (300UA/ml) não surtiram efeito significativo.

As bacteriocinas, produzidas *in situ* ou usadas como aditivos alimentares, podem ser alternativas tecnológicas interessantes para controlar microrganismos patogénicos e, conseqüentemente, melhorar a segurança dos produtos alimentares. Estes metabolitos naturais podem substituir o uso de aditivos químicos como ácido sórbico, dióxido de enxofre, nitrito, nitrato, entre outros. Ainda neste contexto, a estabilidade observada das frações liofilizadas de bacteriocinas em pó seco poderia ser mais vantajosa, no sentido de poder ser transportado a baixo custo e de fácil aplicação, possibilitando ao alimento uma vida de prateleira mais longa.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

Al-Zarouni, M.; A. Senok; F. Rashid; S. M. Al-Jesmi e D. Panigrahi, (2007). Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the United Arab Emirates. *Medical Principles and Practice*, 17 (1): 32-36.

Alvarenga, N. B. M. G., (2008). *Introdução da tecnologia de Congelação na Produção de Queijo de Ovelha*, Tese de Doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa,

André, M. C. D.; M. R. H. Campos; L. J. Borges; A. Kipnis; F. C. Pimenta e A. B. Serafini, (2008). Comparison of Staphylococcus aureus isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. *Food Control*, 19 (2): 200-207.

Anjos, P.; M. Gildo; H. Costa; A. Santos; D. Sousa e E. Fraga, (2017). SALMONELLA SPP. E LISTERIA MONOCYTOGENES, MICRORGANISMOS PATOGÉNICOS EM ALIMENTOS: UMA REVISÃO DE LITERATURA. *Mostra Científica em Biomedicina*, 1.

Araujo, V. S.; V. A. Pagliares; M. L. P. Queiroz e A. C. Freitas-Almeida, (2002). Occurrence of Staphylococcus and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 92 (6): 1172-1177.

Arqués, J. L.; E. Rodríguez; P. Gaya; M. Medina e M. Nunez, (2005). Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of Listeria monocytogenes in raw milk cheese. *International Dairy Journal*, 15 893-900.

Aspri, M.; P. M. O'Connor; D. Field; P. D. Cotter; P. Ross; C. Hill e P. Papademas, (2017). Application of bacteriocin-producing Enterococcus faecium isolated from donkey milk, in the bio-control of Listeria monocytogenes in fresh whey cheese. *International Dairy Journal*, 73 1-9.

Barancelli, G. V.; J. V. Silva-Cruz; E. Porto e C. A. F. Oliveira, (2011). Listeria monocytogenes: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78 (1): 155-168.

Barros, A. C. B. B., (2012). *Avaliação da aptidão tecnológica do leite de ovelha para o fabrico de Queijo de Azeitão DOP*, Tese de Mestrado, ISA/Universidade Técnica Lisboa,

Beckers, H. J.; P. S. S. Soentoro e E. H. M. Delgou-van Asch, (1987). The occurrence of Listeria monocytogenes in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. *International Journal of Food Microbiology*, 4 (3): 249-256.

Beverly, R. L., (2004). *The control, survival, and growth of Listeria monocytogenes on food products*, Tese de Doutoramento, The Ohio State University,

- Blom, U. N. e P. Weréen, (2002). Cheese and cheese-making—with special emphasis on Swedish cheeses. *Bioscience explained*, 1 (2).
- Bradshaw, J. G.; J. T. Peeler; J. J. Corwin; J. M. Hunt; J. T. Tierney; E. P. Larkin e R. M. Twedt, (1985). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Food Protection*, 48 (9): 743-745.
- Brito, J. R.; E. M. Santos; E. F. Arcuri *et al.*, (2008). Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and environmental microbiology*, 74 (15): 4954-4961.
- Brooks, J. C.; B. Martinez; J. Stratton; A. Bianchini; R. Krokstrom e R. Hutkins, (2012). Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiology*, 31 (2): 154-158.
- BS EN ISO 6887-1:1999 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.* (1999). British Standards Institution
- BS EN ISO 6888-1: 1999 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive Staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) - Part 1: Technique using Baird Parker agar medium.* (1999). British Standards Institution
- BS ISO 15214: 1998 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30°C.* (1998). British Standards Institution
- BS ISO 16649-2: 2001 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of β -glucuronide-positive Escherichia coli - Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide.* (2001). British Standards Institution
- BS ISO 21528-2:2004 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method.* (2004). British Standards Institution
- Buncic, S., (2006). *Seguridad alimentaria integrada y salud pública veterinaria.* Zaragoza: Acribia.
- Buriti, F. C.; J. S. Da Rocha e S. M. Saad, (2005). Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, 15 (12): 1279-1288.
- Cabezas, L.; I. Sánchez; J. M. Poveda; S. Sesena e M. L. Palop, (2007). Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control*, 18 (1): 11-17.
- Chen, H. e D. G. Hoover, (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2 (3): 82-100.
- Chollet, E.; I. Sebti; A. Martial-Gros e P. Degraeve, (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, 19 (10): 982-989.

- Cleveland, J.; T. J. Montville; I. F. Nes e M. L. Chikindas, (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71 (1): 1-20.
- Coelho, M. C.; C. C. G. Silva; S. C. Ribeiro; M. L. N. E. Dapkevicius e H. J. D. Rosa, (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 191 53-59.
- Conedera, G.; P. Dalvit; M. Martini *et al.*, (2004). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 96 (1): 67-73.
- Cremonesi, P.; G. Perez; G. Pisoni; P. Moroni; S. Morandi; M. Luzzana; M. Brasca e B. Castiglioni, (2007). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in applied microbiology*, 45 (6): 586-591.
- Cruz , C. D.; M. B. Martinez e M. T. Destro , (2008). *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Alim Nutr*, 19 195-206.
- D'Amico, D. J. e C. W. Donnelly, (2010). Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: Effect of farm characteristics and practices. *Journal of Dairy Science*, 93 (1): 134-147.
- de Paula, J. C. J.; A. F. de Carvalho e M. M. Furtado, (2009). Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 64 (367): 19-25.
- Diezhandino, I.; D. Fernández; L. González; P. L. H. McSweeney e J. M. Fresno, (2015). Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese). *Food chemistry*, 168 134-141.
- Dinges, M. M.; P. M. Orwin e P. M. Schlievert, (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13 (1): 16-34.
- Donaghy, J. A.; N. L. Totton e M. T. Rowe, (2004). Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Applied and environmental microbiology*, 70 (8): 4899-4905.
- Dos Santos , A.; D. O. Santos; C. C. de Freitas; B. L. A. Ferreira; I. F. Afonso; C. R. Rodrigues e H. C. Castro, (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Bras.Patol.Med.Lab*, 43 413-423.
- Douillard, F. P.; A. Ribbera; R. Kant *et al.*, (2013). Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. *PLoS Genet*, 9 (8): e1003683.
- Downes,P e F Ito. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, (2001). American Public Health Association.
- Doyle, M. P. e J. L. Schoeni, (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied and environmental microbiology*, 53 (10): 2394-2396.

- Drider, D.; G. Fimland; Y. Héchar; L. M. McMullen e H. Prévost, (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70 (2): 564-582.
- EFSA, 2015 *Strong evidence outbreaks in Reporting Countries*. (act.2017). Parma, Italy: EFSA , Acedido em July, 2017 de [<https://dwh.efsa.europa.eu/bi/asp/Main.aspx?src=Main.aspx.2048001&evt=2048001&share=1&hide_nsections=header%2Cpath%2CdockTop&documentID=42BDFD5E4FBA300F0B007DB98D990B41¤tViewMedia=8&visMode=0&Server=-AIsF_1a8J-Xyt_MxXJughm6A7p8%3D&Port=-6XSmlasSqlbQnwKy&Project=-2JW9tXHy1_slabk3-Lc_slk3U993O1VtZlUVVA%3D%3D&encryptedByRedir=true&>](https://dwh.efsa.europa.eu/bi/asp/Main.aspx?src=Main.aspx.2048001&evt=2048001&share=1&hide_nsections=header%2Cpath%2CdockTop&documentID=42BDFD5E4FBA300F0B007DB98D990B41¤tViewMedia=8&visMode=0&Server=-AIsF_1a8J-Xyt_MxXJughm6A7p8%3D&Port=-6XSmlasSqlbQnwKy&Project=-2JW9tXHy1_slabk3-Lc_slk3U993O1VtZlUVVA%3D%3D&encryptedByRedir=true&>)
- Ennahar, S.; Y. Asou; T. Zendo; K. Sonomoto e A. Ishizaki, (2001). Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *International Journal of Food Microbiology*, 70 (3): 291-301.
- Favaro, L.; A. L. Barretto Penna e S. D. Todorov, (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses – Application in biopreservation? *Trends in Food Science & Technology*, 41 (1): 37-48.
- Favaro, L.; M. Basaglia; S. Casella; I. Hue; X. Dousset; B. D. G. de Melo Franco e S. D. Todorov, (2014). Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiology*, 38 228-239.
- Fehlhaber e Janetschke P., (1995). *Higiene Veterinaria De Los Alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Ferreira Soares, N. d. F.; W. Azevedo da Silva; A. C. dos Santos Pires; G. Peruch Camilloto e P. Santiago Silva, (2009). Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. *Revista Ceres*, 56 (4).
- Ferreira, S., (2013). *Listeria em Produtos lacteos*. Em *Riscos e Alimentos - Leite e Produtos Lacteos*, ASAE, p. 29-33
- Forsythe , S. J., (2002). *Microbiologia da segurança alimentar, trad.* Porto Alegre: Artmed.
- Foschino , R. O. B. E.; A. L. E. S. Invernizzi ; R. O. B. E. Barucc e K. A. T. I. Stradiotto , (2002). Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*, 69 (02): 213-225.
- Fox, P. F., (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Springer Science & Business Media.
- Fox, P. F.; P. L. McSweeney; T. M. Cogan e T. P. Guinee, (2004). *Cheese: chemistry, physics and microbiology: general aspects*. Academic Press.
- Frank, J. F., (1997). Milk and Dairy Products. Em *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers*, Michael P.Doyle, Larry R.Beuchat, and Thomas J.Montville eds., Washington D.C.: ASM, p. 101-116
- Georgescu, M.; M. Dobrea e D. Georgescu, (2015). Microbial Population Dynamics in Presence of Lactococcal Bacteriophage During Ripening of Traditional Raw Milk Romanian Cheese. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6 324-331.

- Ghrai, T.; J. Frere; J. M. Berjeaud e M. Manai, (2008). Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*, 19 (2): 162-169.
- Giammanco, G. M.; A. Pepe; A. Aleo; V. D'Agostino; S. Milone e C. Mammina, (2011). Microbiological quality of Pecorino Siciliano " primosale " cheese on retail sale in the street markets of Palermo, Italy. *New Microbiologica*, 34 (2): 179-185.
- Giannino, M. L.; M. Marzotto; F. Dellaglio e M. Feligini, (2009). Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 130 (3): 188-195.
- Goh, H. F. e K. Philip, (2015). Isolation and mode of action of bacteriocin BacC1 produced by nonpathogenic *Enterococcus faecium* C1. *Journal of Dairy Science*, 98 (8): 5080-5090.
- Haeghebaert, S.; P. Sulem; L. Deroudille *et al.*, (2003). Two outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 8 linked to the consumption of Cantal cheese made with raw milk, France, 2001. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin*, 8 (7): 151-156.
- Holt, J. G. K.; N. R. Sneath; P. H. Staley; J. T. Williams e T. Stanley, (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: William & Wilkins.
- INE *Estatísticas Agrícolas 2013*. (2014). Instituto Nacional de Estadística 978-989-25-0265-6
- INE *Estatísticas Agrícolas 2015*. (2016). Instituto Nacional de Estadística 978-989-25-0360-8 978
- ISO 11290-1: 1996 *Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 1: Detection method*. (1996). Comité Européen de Normalisation
- ISO 11290-2: 1996 *Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 2: Enumeration method*. (1996). Comité Européen de Normalisation
- ISO 21527-1: 2008 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and molds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0.95*. (2008). International Organization for Standardization
- ISO 4833-1: 2013 *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganism - Part 1: Colony-count at 30°C by the pour plate technique*. (2013). International Organization for Standardization
- Izquierdo, E.; E. Marchioni; D. Aoude-Werner; C. Hasselmann e S. Ennahar, (2009). Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 26 (1): 16-20.
- Jay, J. M., (2000). *Modern Food Microbiology*. Gaithersburg, Maryland: Aspen.
- Jeong, Y. J. e G. S. Moon, (2015). Antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus rhamnosus* CJNU 0519 presenting a narrow antimicrobial spectrum. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35 (1): 137.

- Jouve, L.; M. F. Stringer e A. C. Baird-Parker, (1999). Food Safety Management Tools. *Food science & technology today*, 13 (2): 82-91.
- Kankainen, M.; L. Paulin; S. Tynkkynen *et al.*, (2009). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (40): 17193-17198.
- Kaper, J. B.; J. P. Nataro e H. L. Mobley, (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2): 123-140.
- Knight, A. J.; M. R. Worosz; E. C. Todd; L. D. Bourquin e C. K. Harris, (2008). *Listeria* in raw milk soft cheese: a case study of risk governance in the United States using the IRGC framework. Em *Global risk governance*, Springer, p. 179-220
- Koneman, E. W.; S. D. Allen; W. M. Janda; P. C. Schreckenberger e W. C. Winn Jr, (2001). *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. Rio de Janeiro: MEDSI.
- Kousta, M.; M. Mataragas; P. Skandamis e E. H. Drosinos, (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21 (6): 805-815.
- Kure, C. F.; I. Skaar e J. Brendehaug, (2004). Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 93 (1): 41-49.
- Little, C. L.; J. R. Rhoades; S. K. Sagoo; J. Harris; M. Greenwood; V. Mithani; K. Grant e J. McLauchlin, (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*, 25 (2): 304-312.
- Loncarevic, S.; M. L. Danielsson-Tham e W. Tham, (1995). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 26 (2): 245-250.
- Lu, R.; S. Fasano; N. Madayiputhiya; N. P. Morin; J. Nataro e A. Fasano, (2009). Isolation, identification, and characterization of small bioactive peptides from *Lactobacillus* GG conditional media that exert both anti-Gram-negative and Gram-positive bactericidal activity. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 49 (1): 23-30.
- Macedo, A. C.; T. G. Tavares e F. X. Malcata, (2004). Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiology*, 21 (2): 233-240.
- Maia, C. M. H., (2009). *Tipagem molecular de Listeria monocytogenes proveniente de queijo de ovelha e de origem humana por AFLP*, Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Castelo Branco,
- Marra, A. R.; C. A. P. Pereira; A. Castelo; J. R. do Carmo Filho; R. G. R. Cal; H. S. Sader e S. B. Wey, (2006). Health and economic outcomes of the detection of *Klebsiella pneumoniae*-produced extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in a hospital with high prevalence of this infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 10 (1): 56-60.

- Martin-Platero, A. M.; E. Valdivia; M. Maqueda e M. Martínez-Bueno, (2009). Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132 (1): 24-32.
- Martinez, R. C. R.; C. D. Staliano; A. D. S. Vieira; M. L. M. Villarreal; S. D. Todorov; S. M. I. Saad e B. D. G. d. M. Franco, (2015). Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. *Food Microbiology*, 48 143-152.
- McMahon, D. J. e R. J. Brown, (1984). Enzymic Coagulation of Casein Micelles: A Review1. *Journal of Dairy Science*, 67 (5): 919-929.
- Melo, J.; P. W. Andrew e M. L. Faleiro, (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*, 67 75-90.
- Menendez, S.; M. R. Godinez; J. L. Rodriguez–Otero e J. A. Centeno, (1997). Removal of *Listeria* spp. in a cheese factory. *Journal of food safety*, 17 (2): 133-139.
- Michelle Smoot L. e Pierson Merle D., (1997). Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. Em *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers*, Michael P.Doyle, Larry R.Beuchat, and Thomas J.Montville eds., Washington D.C.: ASM, p. 66-82
- Mlalazi, M.; A. R. Winslow; J. J.-G. Beaubrun e B. E. Eribo, (2011). Occurrence of pediocin PA-1/AcH-like bacteriocin in native non-starter *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* from retail Cheddar cheese. *Internet J.Food Safety*, 13 325-331.
- Mojgani, N.; M. Ameli; N. Vaseji; M. A. Hejazi; M. A. Torshizi e C. Amirinia, (2010). Growth control of *Listeria monocytogenes* in experimental cheese samples by *Lactobacillus casei* RN 78 and its bacteriocin. *African Journal of Microbiology Research*, 4 (11): 1044-1050.
- Moll, G. N.; W. N. Konings e A. J. Driessen, (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Em *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications*, Springer, p. 185-198
- Moreira, C. P. M., (2011). *Desenvolvimento de metodologias analíticas para queijos. Estudo de caso: queijos da Beira Interior*, Tese de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia/Universidade Tecnica de Lisboa,
- Moreno, M. R. F.; M. C. Rea; T. M. Cogan e L. De Vuyst, (2003). Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*, 81 (1): 73-84.
- Morgan, F.; T. Massouras; M. Barbosa *et al.*, (2003). Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Ruminant Research*, 47 (1): 39-49.
- Mpofu, A.; A. R. Linnemann; M. J. R. Nout; M. H. Zwietering; E. J. Smid e H. M. W. den Besten, (2016). Inactivation of bacterial pathogens in yoba mutandabota, a dairy product fermented with the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* yoba. *International Journal of Food Microbiology*, 217 42-48.

- CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People, *Centers for Disease Control and Prevention*. (act.2016). Clifton Road Atlanta, USA: National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases , Acedido em April, 2017 de <<https://www.cdc.gov/listeria/>>
- NP 2262 *Microbiologia Alimentar: Regras Gerais para a pesquisa de Staphylococcus aureus*. (1986). Instituto Portugues da Qualidade
- O'Brien, M.; K. Hunt; S. McSweeney e K. Jordan, (2009). Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. *Food Microbiology*, 26 (8): 910-914.
- Okura, M. H.; J. R. D. Finzer; R. R. Silva; F. B. B. Jardim e P. F. d. Araújo, (2006). Influência da atmosfera modificada sobre a qualidade do queijo minas frescal. *Hig.aliment*, 20 (143): 84-91.
- Perry, K. S., (2004). Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. *Química Nova*, 27 (2): 293-300.
- Pingitore, V. E.; S. D. Todorov; F. Sesma e B. D. Gombossy de Melo Franco, (2012). Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. *Food Microbiology*, 32 (1): 38-47.
- Pinho, O. e I. Ferreira, (2006). Queijo, um alimento para todas as idades: Entre o queijo tradicional e os novos alimentos funcionais. *Leite I+D+T*, (1): 10-11.
- Portaria N 73/90 *Diário da República I Serie N 27*. (1-2-1990).
- Raddi, M. S. G.; C. Q. F. Leite e C. P. Mendonça, (1988). *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. *Revista de saúde pública*, 22 (1): 36-40.
- RE 1441 *Regulamento Europeu N 1441/2007*. (7-12-2007). Jornal Oficial da União Europeia L 322/12
- RE 852 *Regulamento Europeu N 852/2004*. (29-4-2004). Jornal Oficial da União Europeia L 139/1
- Rea, S.; L. Marino; R. Stocchi; R. Branciari; A. R. Loschi; D. Miraglia e D. Ranucci, (2016). Differences in chemical, physical and microbiological characteristics of Italian burrata cheeses made in artisanal and industrial plants of Apulia Region. *Italian journal of food safety*, 5 (3).
- Rehm, H. J. e G. Reed, (1983). *Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes*. Weinheim: Verlag Chemie.
- Rocourt, J. e Cossart P., (1997). *Listeria monocytogenes*. Em *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers*, Michael P.Doyle, Larry R.Beuchat, and Thomas J.Montville eds., Washington D.C.: ASM, p. 337-352
- Rodrigues, A. R. F., (2014). *Otimização do processo de fabrico de um queijo de ovelha amanteigado*, Tese de Mestrado, Universidade do Porto,
- Rolim, F. R. L.; K. M. O. dos Santos; S. C. de Barcelos; A. S. do Egito; T. S. Ribeiro; M. L. da Conceição; M. Magnani; M. E. G. de Oliveira e R. d. C. R. d. E. Queiroga, (2015). Survival of *Lactobacillus*

- rhamnosus EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 63 (2): 807-813.
- Romanelli, R. M. d. C.; L. M. Anchieta; A. C. Bueno e Silva; L. A. de Jesus; V. Rosado e W. T. Clemente, (2016). Empirical antimicrobial therapy for late-onset sepsis in a neonatal unit with high prevalence of coagulase-negative Staphylococcus. *Jornal de Pediatria*, 92 (5): 472-478.
- Ryser, E. T., (2007). Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. Em *Listeria, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition*, CRC Press, p. 405-501
- Sabo, S. d. S.; M. Vitolo; J. M. D. González e R. P. d. S. Oliveira, (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64 527-536.
- Scott, R., (1991). *Fabricación de queso*. Zaragoza: Acribia.
- Silva, N. d.; V. C. Junqueira e N. F. Silveira, (2001). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. Sao Paulo: Varela.
- Siqueira, R. d., (1995). *Manual de microbiologia de alimentos*. Brasília: Embrapa.
- Sousa, A. Z. B. d.; M. R. Abrantes; S. M. Sakamoto; J. B. A. d. Silva; P. d. O. Lima; R. N. d. Lima; M. d. O. C. Rocha e Y. D. B. Passos, (2014). Physical-chemical and microbiological aspects of the rennet cheese sold in the Northeast States of Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81 (1): 30-35.
- Tharmaraj, N. e N. P. Shah, (2009). Antimicrobial effects of probiotic bacteria against selected species of yeasts and moulds in cheese-based dips. *International journal of food science & technology*, 44 (10): 1916-1926.
- Todorov, S. D.; M. Wachsmann; E. Tomé; X. Dousset; M. T. DESTRO; L. M. T. Dicks; B. D. G. de Melo Franco; M. Vaz-Velho e D. Drider, (2010). Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology*, 27 (7): 869-879.
- Tondo, E. C.; M. M. Guimarães; J. A. Henriques e M. A. Ayub, (2000). Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Canadian journal of microbiology*, 46 (12): 1108-1114.
- Tournas, V. H.; J. R. Calo e S. Memon, (2011). Comparison of the SimPlate yeast and mould color indicator to the BAM method for quantification of fungi in naturally-contaminated foods. *Food Control*, 22 (5): 775-777.
- Watkinson, P.; C. Coker; R. Crawford; C. Dodds; K. Johnston; A. McKenna e N. White, (2001). Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal*, 11 455-464.
- Westling, M.; M. L. Danielsson-Tham; J. Jass; A. Nilsen; Å. Ostrom e W. Tham, (2016). Contribution of Enterobacteriaceae to Sensory Characteristics in Soft Cheeses Made from Raw Milk. *Procedia Food Science*, 7 17-20.

Zweifel, C.; J. E. Muehlherr; M. Ring e R. Stephan, (2005). Influence of different factors in milk production on standard plate count of raw small ruminant's bulk-tank milk in Switzerland. *Small Ruminant Research*, 58 (1): 63-70.

ANEXOS

ANEXO A1. Meio de cultura TSYEA

Triptona de soja	30 g
Extracto de levedura	6 g
Agar	15 g
Água destilada	1 000 ml

Dissolver os componentes em água destilada, aquecendo até à ebulição se necessário. Distribuir o meio em frascos com capacidade apropriada. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 min. Arrefecer o meio de cultura a 45 °C – 50 °C. Distribuir em placas.

ANEXO A2. Meio de cultura Chapman

Triptona	10 g
Extracto de carne	12 g
Proteose de peptona	10 g
NaCl	150 g
Lactose	15 g
Agar	1 g
Água destilada	1 000 ml

Dissolver os componentes em água destilada, aquecendo até à ebulição se necessário. Distribuir o meio por tubos em porções de 10 ml. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 min.