



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS DO
SEMIÁRIDO**

Rânmilla Cristhina Santos Castro

**Deteção de micro-organismos patógenos e bactérias
láticas em queijo caprino artesanal produzido no sertão
semiárido nordestino e adição de cultura iniciadora para
segurança microbiológica do produto**

Petrolina

2016

Rânmillia Cristhina Santos Castro

**Detecção de micro-organismos patógenos e bactérias
láticas em queijo caprino artesanal produzido no sertão
semiárido nordestino e adição de cultura iniciadora para
segurança microbiológica do produto**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito da obtenção do título de – Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dra. Francesca Silva Dias Nobre
Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Ribeiro Menezes

Petrolina

2016

	Castro, Rânmillia Cristhina Santos
C355d	Detecção de micro-organismos patógenos e bactérias lácticas em queijo caprino artesanal produzido no sertão semiárido nordestino e adição de cultura iniciadora para segurança microbiológica do produto / Rânmillia Cristhina Santos Castro -- Petrolina, 2016.
	60f.: il.
	Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2016.
	Orientadora: Profa. Dra. Francesca Silva Dias Nobre. Referências.
	1. Queijo artesanal. 2. Patógenos. 3. Bactéria do ácido láctico. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco
	CDD 637.35

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIBI/UNIVASF

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS DO
SEMIÁRIDO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rânmilla Cristhina Santos Castro

**Detecção de micro-organismos patógenos em queijo
caprino artesanal produzido no sertão semiárido e adição
de cultura iniciadora para segurança microbiológica do
produto**

Dissertação para requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências Veterinárias, pela
Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

Banca examinadora

Francesca Silva Dias Nobre, Doutorado em Microbiologia Agrícola, UNIVASF.

Daniel Ribeiro Menezes, Doutor em Zootecnia, UNIVASF

Karla dos Santos Melo de Sousa, Doutora em Engenharia Agrícola, UNIVASF

Dedico a Deus, minha vó (*in memoriam*), meus familiares, ao meu companheiro e aos amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, por guiar meu caminho e pelas bênçãos concebidas.

A minha vó Zilda (in memoria) pela educação e inspiração. Ao meu tio Fernando por todo o incentivo. A todos os familiares.

Ao meu namorado e companheiro Benilson por toda atenção, apoio e paciência.

A minha Orientadora Francesca pela oportunidade, aprendizado e incentivo.

As minhas colegas de trabalho diário do Grupo NEPOA, Bianca, Carla, Eline, Iris, Isabela, Jane, Tayla e em especial Anna Paula e Anay pelo apoio e companheirismo.

Ao programa de Pós-graduação de Ciências Veterinárias e todos os colegas que fazem parte.

A FACEPE pelo auxílio.

Á todos, muito obrigada!

RESUMO

O queijo coalho de cabra artesanal é um derivado lácteo de importância para a região semiárida do Nordeste. Sua produção e comercialização gera renda para os pequenos produtores, porém os queijos artesanais de leite cru são susceptíveis a contaminação de micro-organismos patogênicos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, sendo um risco para a saúde dos consumidores. Com o desenvolvimento da indústria de produtos a partir de leite de caprino, fez-se importante identificar micro-organismos do queijo de cabra do semiárido nordestino e como alternativa de controle para a contaminação a adição de Bactérias do Ácido Lático (BAL) para promover atividade antagônica aos patógenos e dar qualidade ao produto. Para isto, 40 queijos artesanais de leite de cabra foram adquiridos em feiras e associações de criadores de caprinos em oito municípios do semiárido nordestino: Petrolina, Santa Maria da Boa Vista, Lagoa Grande, Cabrobó, Dormentes, Afrânio, Casa Nova e Sento Sé, para a detecção de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Destes, o patógeno mais encontrado no queijo de cabra foi *Staphylococcus* e para ação antagônica, a adição das BAL selecionadas (UNIVASF CAP) a partir de queijo caprino foi capaz de reduzir em aproximadamente 3 unidades log do patógeno *S. aureus* Resistentes a Múltiplas Drogas (MDR), isolado de queijo de cabra artesanal, aumentando sua segurança microbiológica.

Palavras-chave: queijo artesanal, bactéria do ácido lático, patógenos, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The artisan curd goat cheese is a dairy derivative of importance to the Brazilian semiarid region. Its production and marketing generate income for small-scale artisan cheesemakers. However, artisan cheeses of raw milk are susceptible to contamination of pathogenic microorganisms such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes*, with a risk to the health of consumers. With the development of products from goat milk industry, it became critical identify microorganisms from goat milk in the Brazilian semiarid as an alternative control for contamination of adding lactic acid bacteria (LAB) to promote activity antagonistic to pathogens and give quality to the product. For this, 40 goat cheeses were purchased at fairs and goat breeders' associations in eight municipalities in the Brazilian semiarid: Petrolina, Santa Maria da Boa Vista, Lagoa Grande, Cabrobó, Dormentes, Afrânio, Casa Nova e Sento Sé, for detection of *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Our analysis indicated that the most commonly found pathogen in goat cheese was *Staphylococcus*. The results showed that for antagonistic action the addition of selected BALs (UNIVASF CAP) from goat cheese was able to reduce about 3 log units of the pathogen *S. aureus* multidrug-resistant (MDR) isolated from artisanal goat cheese, increasing the microbiological safety of goat cheese.

Key-words: goat cheese, lactic acid bacteria, pathogens, *Staphylococcus aureus*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Contagem de *S. aureus* viáveis (\log_{10} UFC / g) em queijos sem (queijo 1) e com (queijo 2) inóculo de BAL durante o armazenamento por 20 dias a 4 °C.....p.50
- Figura 2.** Contagem de BAL viáveis (\log_{10} UFC / g) do inóculo de UNIVASF CAP no queijo (queijo 2) durante o armazenamento por 20 dias a 4 °C.....p.51
- Figura 3.** Valores de pH nos queijos sem (queijo 1) e com (queijo 2) inóculo de BAL durante o armazenamento por 20 dias a 4 °C.....p.52

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Tabela 1. Enumerações logarítmicas de grupos microbianos e determinação de pH (média \pm DP) de queijos de cabra comercializados em municípios do semiárido nordestino.....p.43

Tabela 2: Tabela 2. Confirmação bioquímica de patógenos (destacado em cinza) isolados de queijos de cabra comercializados em municípios do semiárido nordestino.....p.45

Tabela 3: Índice de Múltipla Resistência aos Antibióticos (MAR) de patógenos isolados de queijo de cabra.....p.49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPCC.....	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BAL.....	Bactérias do Ácido Lático
BAM.....	Bactérias Aeróbias Mesófilas
BPF.....	Boas Práticas de Fabricação
BPI.....	Biotecnologia Pesquisa e Inovação
DIC.....	Delineamento Inteiramente Casualizado
EMB.....	Ágar Eosina Azul de metileno
LIA.....	Ágar Lisina Ferro
MRS.....	Man, Rogosa e Sharpe
MAR.....	Múltipla Resistência aos Antibióticos
NMP.....	Número Mais Provável NMP
PAA.....	Programa de Aquisição de Alimentos
PCA.....	Ágar Padrão para Contagem
RTIQ.....	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
TSB.....	Caldo Triptona de Soja
TSL.....	Triplo Açucar Ferro
TSA.....	Ágar Triptona de Soja
UFC.....	Unidade Formadora de Colônias
VM.....	Vermelho de metila
VP.....	Voges-Proskauer

SUMÁRIO

	RESUMO.....	5
	ABSTRACT.....	6
	LISTA DE FIGURAS.....	7
	LISTA DE TABELAS.....	8
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
1	INTRODUÇÃO.....	12
2	DESENVOLVIMENTO.....	14
2.1	CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	14
	Microbiota patogênica em queijo caprino artesanal e efeito antagônico de bactérias lácticas.....	14
	RESUMO.....	14
2.1.1	INTRODUÇÃO.....	15
2.1.2	QUEIJO COALHO: definição, elaboração e segurança alimentar.....	16
2.1.3	MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS.....	18
2.1.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.1.3.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	20
2.1.3.3	<i>Salmonella</i> spp.....	21
2.1.3.4	Coliformes totais, Coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	22
2.1.4	ANTAGONISMO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO FRENTE A PATÓGENOS.....	23
2.1.5	CONCLUSÃO.....	25
2.1.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
2.2	CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO.....	35
	Caracterização microbiológica do queijo caprino artesanal produzido no semiárido nordestino brasileiro e adição de bactérias lácticas para o controle de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
	RESUMO.....	35
2.2.1	INTRODUÇÃO.....	35
2.2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37

2.2.2.1	Obtenção das Amostras.....	37
2.2.2.2	Análise Microbiológica.....	37
2.2.2.3	Resistência antimicrobiana.....	39
2.2.2.4	Identificação molecular.....	40
2.2.2.5	Inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> em queijo caprino artesanal.....	41
2.2.2.6	Enumeração bacteriana e determinação do pH.....	41
2.2.2.7	Análise Estatística.....	42
2.2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
2.2.3.1	Análises Microbiológicas.....	42
2.2.3.2	Resistência antimicrobiana e confirmação molecular.....	48
2.2.3.3	Inibição de <i>S. aureus</i> e valor de pH no queijo caprino artesanal.....	49
2.2.4	CONCLUSÃO.....	52
2.2.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
4	APÊNDICE.....	60

INTRODUÇÃO

A caprinocultura no Brasil é a maior da América do Sul e os números de produção é crescente devido ao resultado das mudanças na cadeia de abastecimento alimentar e diversificação de mercados e produtos (CAVALCANTE et al., 2012). No Nordeste concentra 93% do rebanho caprino do Brasil e na região semiárida do país, a maioria dos pequenos rebanhos é dirigida por produtores com poucos recursos financeiros (SOUSA et al., 2011).

As cabras têm um papel importante e significativo no desenvolvimento socioeconômico da região que tem o queijo coalho como um produto típico (QUEIROGA et al., 2013), fabricado artesanalmente (MONTEL et al., 2014). A produção do queijo coalho artesanal é uma atividade antiga de fundamental importância econômica e um patrimônio cultural fabricado nos domicílios rurais (QUEIROGA et al., 2013).

O queijo coalho de cabra é obtido após a coagulação do leite com coalho ou enzimas coagulantes apropriadas, é um alimento saudável com propriedades nutricionais e sabor característico (ALBENZIO; SANTILLO, 2011; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008), aprovado pelos que consomem (GARCÍA et al., 2014), além disso, produtos lácteos como queijos frescos, têm sido descritos como um veículos de interesse para a incorporação de bactérias probióticas dando mais qualidade ao produto (ROLIM et al., 2015).

Porém, os queijos frescos estão entre os alimentos predominantemente envolvidos em surtos de intoxicação alimentar em todo o mundo (EL GALIOU et al., 2015; SILVA et al., 2013). Segundo Silva et al. (2013), a região Nordeste do Brasil é carente quanto a qualidade microbiológica do leite caprino, porém ainda são poucos estudos relacionados à determinação de parâmetros microbiológicos do leite e queijo de cabra.

Para garantir a segurança dos consumidores e controlar agentes patogênicos como a *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* encontrados em queijos (CAVICCHIOLI et al., 2015; MISZCZYCHA et al., 2014), a adição de Bactérias do Ácido Lático (BAL) (BLAJMAN et al., 2015; QUEIROGA et al., 2013; ROLIM et al., 2015) tem sido usada como alternativa para fornecer benefícios ao queijo. As propriedades tecnológicas de BAL são úteis no desenvolvimento e manutenção de características sensoriais diferenciadas em queijos e possui importante ação antagônica aos patógenos (FAVARO et al., 2014; PICON et al., 2015).

Para o semiárido nordestino é fundamental a identificação e controle microbiológico dos produtos oriundos da caprinocultura que tem importância fundamental para o desenvolvimento socioeconômico regional (QUEIROGA et al., 2013).

Desta forma, estudos são importantes para garantir a melhoria e segurança de produtos como o queijo coalho de cabra para a região Nordeste. Logo, esta pesquisa teve o objetivo de identificar agentes patogênicos e enumerar bactérias lácticas em queijo de cabra artesanal e adicionar culturas iniciadoras para segurança microbiológica do produto.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

Microbiota patogênica em queijo caprino artesanal e efeito antagônico de bactérias láticas: REVISÃO

RESUMO

O queijo coalho tradicional de leite de cabra é um derivado lácteo bastante consumido onde há a atividade da caprinocultura. A produção e exploração comercial desse derivado lácteo é uma atividade de subsistência de grande relevância econômica para pequenos produtores da região semiárida do Nordeste. Contudo, enquanto não houver a utilização de Boas Práticas de Fabricação (BPF) durante suas etapas de processamento e a matéria-prima for o leite cru, este produto torna-se facilmente susceptível a contaminações bacterianas podendo ser considerado veículo de patógenos e um possível risco a saúde dos consumidores, além da qualidade final do produto estar comprometida. Micro-organismos patogênicos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* são alguns dos mais comumente relacionados a surtos de origem alimentar. Estes micro-organismos podem ser encontrados em leite cru, a granel e em derivados lácteos, tornando seu conhecimento fundamental para a prevenção de zoonoses veiculadas pelo alimento e demais enfermidades. Sendo assim, é de extrema importante conhecer, identificar a diversidade microbiana, os fatores de risco e os contaminantes presentes no queijo de cabra feito artesanalmente, como também, as medidas necessárias para minimizar a microbiota patogênica. Portanto, o objetivo desta revisão foi relatar os principais micro-organismos patogênicos encontrados no queijo caprino artesanal, bem como enfatizar a atividade antagônica das Bactérias do Ácido Lático (BAL) frente a estes patógenos alimentares.

Palavras-chave: queijo de cabra artesanal. *Escherichia coli*. *Listeria monocytogenes*.

Salmonella. *Staphylococcus aureus*

2.1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma produção de 141 mil toneladas por ano de leite caprino com concentração majoritária na região nordeste (MEDINA et al., 2011). O leite de cabra possui características nutricionais importantes relacionadas ao bem estar e alimentação humana (RIBEIRO; RIBEIRO, 2010). Soma-se também propriedades químicas diferenciadas e um fator alérgico menor, quando comparado ao leite bovino (BEZERRA et al., 2016).

O mercado brasileiro de produtos lácteos fabricados a partir de leite de cabra está em ascensão. No entanto, sua produtividade é caracterizada como sazonal e resultando em produtos com altos preços e incentivam as fraudes (GOLINELLI et al., 2014). No Nordeste, o queijo coalho caprino é produzido e consumido há mais de 150 anos e tem grande importância para a economia das regiões produtoras de leite caprino, especialmente para os pequenos produtores sem acesso a tecnologias de processamento do leite (CAVALCANTE et al., 2007; QUEIROGA et al., 2013).

O queijo de cabra é um produto de alto valor comercial devido à tecnologia simples aplicada no processo de fabricação, bom rendimento e aceitação por parte dos consumidores (GARCIA et al., 2012). Este produto é de grande importância para a região semiárida pernambucana, que já é conhecida pela produção de vinhos finos, pois complementaria o turismo gastronômico e renda dos pequenos produtores (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015).

Devido ao seu alto valor biológico, por conter vários componentes reconhecidos como funcionais e fonte de Bactérias Ácido Lácticas (BAL), o leite de cabra tem recebido atenção especial por pesquisadores e indústria de laticínios (ALBENZIO; SANTILLO, 2011). No entanto, queijos frescos e macios elaborados com leite de cabra cru constituem um meio adequado para o crescimento de agentes patogênicos e são frequentemente associados a diversas doenças de origem alimentar em muitos países (EL GALIOU et al., 2015).

Queijos são implicados em infecções alimentares associadas com sintomas graves e alta taxa de mortalidade (MELO; ANDREW; FALEIRO, 2015). Além de tal alimento, quando contaminado, ser possível veículo de agentes patogênicos (ARQUÉS et al., 2005), ainda há a crescente preocupação quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos destes micro-organismos presentes, uma vez que o uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de infecções bacterianas promove a disseminação de genes de resistência entre os patógenos, dificultando ainda mais o tratamento das doenças (TANG; APISARNTHANARAK; HSU, 2014).

Na região semiárida brasileira, ainda são escassos estudos relacionados à determinação de parâmetros microbiológicos do leite de cabra, bem como alternativas para aumentar a segurança microbiológica do produto (SILVA et al., 2013). E, tendo em vista o risco que representa a microbiota patogênica em queijos, é necessário intensificar os esforços para garantir a segurança do produto (EL-SHAROUD, 2015). Neste intuito se faz necessário a identificação da microbiota patogênica circulante no queijo caprino artesanal e determinar o padrão de resistência dos patógenos aos antimicrobianos (FLÓREZ; MAYO, 2015). Assim, objetivou-se com esta revisão definir os principais micro-organismos patogênicos presentes no queijo coalho caprino, bem como enfatizar a atividade antagônica das BAL frente a estes micro-organismos.

2.1.2 QUEIJO COALHO: definição, elaboração e segurança alimentar

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Coalho (BRASIL, 2001) entende-se por queijo coalho, o produto obtido através da coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação.

O queijo coalho apresenta como características distintivas do processo de elaboração, a coagulação em torno de 40 minutos, corte e mexedura da massa, remoção parcial do soro, aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semicozida (até 45 °C) ou cozida (entre 45 e 55 °C), adição de sal (cloreto de sódio) à massa, se for o caso, prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura média de 10 a 12 °C normalmente até 10 (dez) dias. Esse queijo poderá ser também elaborado a partir de massa crua (sem aquecimento) (BRASIL, 2001).

Na região Nordeste, embora este produto faça parte da cultura e tenha história secular, não existe a padronização do seu processo de elaboração, sendo comum o emprego de leite cru, o que coloca em risco a saúde do consumidor. Soma-se ainda a variabilidade nas propriedades físicas, tecnológicas e sensorial, como dessoramento e textura emborrachada do produto (CAVALCANTE et al., 2007; QUEIROGA et al., 2013).

Parâmetros tecnológicos durante as diferentes etapas como: coalho, acidificação, aquecimento, drenagem do soro, salga e maturação exercem uma grande influência sobre as características finais do queijo e desempenham um papel importante em sua composição microbiana, aumentando a biodiversidade do produto (RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI,

2009), podendo ser considerado como um fator fundamental para a manutenção das características típicas de produtos de queijo tradicional (SERHAN et al., 2009).

Hoje há um interesse na produção de queijos de leite cru, devido a exigências dos consumidores para o aumento das variedades do produto, de sabores e texturas (JAKOBSEN et al., 2011). No Brasil, o queijo Minas tradicional é feito de leite cru e tem importância social e econômica para a região que desde 2002 tem uma legislação específica que regula a sua produção no Estado de Minas Gerais (ARCURI et al., 2013). Assim, os queijos tradicionais são um dos produtos lácteos mais apreciados no Brasil. (CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007). E, o queijo de cabra, além do sabor peculiar, apresenta importantes propriedades nutricionais, sendo reconhecido como um alimento saudável (QUEIROGA et al., 2013).

Em alguns países como Marrocos, o queijo é produzido tradicionalmente nos domicílios rurais, e estes produtos artesanais são normalmente vendidos no comércio local (EL GALIOU et al., 2015). Estes queijos são geralmente referidos como "artesanais" ou "tradicionais" (PINTO et al., 2011). Além disso, queijos tradicionais são reconhecidos por suas propriedades sensoriais diversas e distintas (MONTEL et al., 2014). Os queijos de leite cru são frequentemente caracterizados por serem nutricionalmente mais ricos e por possuírem maior intensidade de sabor em relação aos queijos feitos a partir de leite pasteurizado (MASOUD et al., 2012), apresentando uma alta aceitabilidade ao paladar dos consumidores (GARCÍA et al., 2014). Este fato se deve principalmente à presença da microbiota autóctone abundante em queijos de leite cru. Assim, conhecer a diversidade microbiana do leite cru é o passo preliminar para monitorar a microbiota autóctone que, agrega as características organolépticas típicas e qualidade do queijo (FADDA et al., 2010).

No entanto, deve-se também ressaltar que a fabricação do queijo envolve várias etapas em que pode ocorrer a contaminação com micro-organismos patogênicos. A consistência físico-química de alguns tipos de queijo está prontamente adequada para o crescimento microbiano e de bactérias zoonóticas comensais. Algumas destas bactérias, como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., são patógenos importantes que quando consumido pode resultar em doença grave ou até mesmo a morte (SCHODER et al., 2015).

No Brasil é notável o crescimento da produção leiteira, e para maior acesso ao mercado é fundamental o estudo sobre a microbiota do leite de cabra e seus derivados, como por exemplo, o queijo (MEDINA et al., 2011). Além disso, questões relacionadas com a sua segurança, qualidade e procedência a fim de proteger os produtores e consumidores, é sempre uma preocupação (ARCURI et al., 2013).

Diversos agentes patogênicos podem ser encontrados em leite cru (YOON; LEE; CHOI, 2016). Micro-organismos como *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos, são predominantes em leite de cabra no Brasil e seu consumo pode ser um risco ao consumidor, (CAVICCHIOLI et al., 2015).

A presença e a sobrevivência de bactérias patogênicas em queijo tradicional fabricado com leite cru em diferentes países foi documentada (ALEGRÍA et al., 2009), inclusive no Brasil, em queijos minas (PINTO et al., 2011). Tais registros são motivo de preocupação, pois este alimento pode hospedar e ser veículo de agentes patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, entre outros (DE BUYSER et al., 2001).

Portanto, alimentos contaminados por micro-organismos patogênicos podem ser considerados um grave problema a saúde pública (HAYASHI et al., 2001; LÜ et al., 2014; PARKHILL et al., 2000). Assim, torna-se necessário a utilização de alternativas para conservação dos alimentos associadas às tecnologias já existentes no intuito de proporcionar à população alimentos de melhor qualidade e seguros do ponto de vista microbiológico (ARCURI et al., 2013).

2.1.3- MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS

2.1.3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus spp é um gênero de bactérias Gram-positivas, que possui estirpes enterotoxigênicas de estafilococos coagulase-positiva (KLOSS; SCHLEIFER et al., 1989).

S. aureus e suas enterotoxinas são provavelmente a causa mais comum de intoxicação de origem alimentar (GUSTAFSON et al., 2014). *S. aureus* pode produzir uma grande variedade de enterotoxinas, mais de 20 já foram descritas, no entanto, 5 (A, B, C, D e E) são mais comumente relatadas em surtos (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012; PELISSER et al., 2009). Leite caprino e queijo são alimentos comumente implicados com a presença de *S. aureus* enterotoxigênicos (BASANISI et al., 2015; MISZCZYCHA et al., 2014). Geralmente a presença de *S. aureus* e suas toxinas em queijos é associada com a falta de medidas higiênicas, principalmente, o contato direto da mão contaminada do manipulador sob o produto durante a elaboração do mesmo (AKINEDEN et al., 2008).

No entanto, é importante ressaltar que a contaminação de produtos lácteos por *S. aureus* pode ser tanto de origem animal ou humana. Este microrganismo está presente nas membranas mucosas nasais e vaginais dos pequenos ruminantes, sendo a cavidade nasal o

principal reservatório, de modo que, geralmente quando este patógeno é encontrado em queijos das espécies caprina e ovina é de origem animal e não humana (SPANU et al., 2012). Também é comum infecções no úbere dos animais por *Staphylococcus* spp. e que pode acarretar na presença da enterotoxinas no leite (LEE et al., 2015; SKEIE, 2014). Assim, *S. aureus* estão envolvidos em muitos surtos de origem alimentar envolvendo queijos, sendo considerada uma perigosa ameaça para a segurança deste produto (PIMENTEL-FILHO et al., 2014).

A intoxicação é resultante da ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estáveis ao calor, produzidas por este microrganismo. Os sintomas são caracterizados por náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia (NORMANNO et al., 2005), mialgia, diarreia, tonturas, dor de cabeça e prostração (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012).

Mesmo em derivados lácteos processados termicamente através da pasteurização, as enterotoxinas produzidas por *S. aureus* permanecem estáveis e podem causar intoxicação em seres humanos. Esta capacidade ocorre devido a sua termoestabilidade, não afetando então sua atividade biológica ao ser exposta ao tratamento térmico. As enterotoxinas são também resistentes às proteases gastrointestinais, como a pepsina, podendo permanecer ativa após a ingestão (BALABAN; RASOOLY, 2000). Desta forma, a presença de *S. aureus* é uma questão que exige consideração, uma vez que é relevante para a higiene dos alimentos, especialmente com relação a produtos derivados de leite (ERTAS et al., 2010).

Segundo Zeleny et al. (2015), 345 surtos de origem alimentar em 2011 na Europa foram ocasionados pela presença de enterotoxinas estafilocócicas, envolvendo principalmente o consumo de queijos e ovos.

Além da produção de enterotoxina, a resistência aos antibióticos é outro importante fenótipo patogênico para *S. aureus*. Genes relacionados com a resistência a antibióticos são facilmente transferidos a outras estirpes de iguais ou diferentes espécies através de elementos genéticos móveis (YOON et al., 2016). As transferências de genes de resistência a bactérias sensíveis podem ocorrer durante a fabricação de alimentos (ROSSI et al., 2014). Quanto à questão de resistência, chama a atenção ainda na cadeia láctea, o fato do leite geralmente conter altos níveis de resíduos de antibióticos, o que pode contribuir para o aumento de resistência dos isolados nesta matriz alimentar. Isolados de *Staphylococcus* oriundos de queijos elaborados a partir de leite cru apresentaram elevada resistência a antibióticos (FLÓREZ; MAYO, 2015).

Um dos maiores desafios terapêuticos é sem dúvida, a resistência a múltiplas drogas em agentes patogênicos Gram-positivos, como o *S. aureus*. Este microrganismo comumente

é resistente a metilina (ABED; COUVREUR, 2014; ALEKSHUN; LEVY, 2007), e vancomicina (LEVY, 2005) tornando-se um sério problema para a saúde pública. (STEBBINS; OUIOMET; UHRICH, 2014).

2.1.3.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva ubíqua, microaerofílica, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos (KLOOS; SCHLEIFER et al., 1989). Sendo também considerado um agente patogênico de origem alimentar de grande relevância (GOVARIS et al., 2011).

Esta bactéria tem sido reconhecida como um importante agente patogênico de origem alimentar, causando infecções graves em humanos, as chamadas listerioses (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015; MAĆKIW al., 2016). A listeriose ocorre em diferentes formas: neuromeningite, gastroenterite materno-neonatal e febril, e em casos graves, pode levar a infecção cerebral e até mesmo a morte (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015). É uma doença esporádica que é muitas vezes associado ao consumo de leite contaminado e queijo macio, (AURELI et al., 2003). Atualmente é considerada uma das principais enfermidades transmitidas por alimentos no mundo inteiro (VÄLIMAA; TILSALA-TIMISJÄRVI; VIRTANEN, 2015). No Brasil, a listeriose humana é sub-diagnosticada e subnotificada (SILVA et al., 2010).

Entre os agentes patogênicos de origem alimentar, em particular a atenção é focada no comportamento de *Listeria monocytogenes*, pois é capaz de crescer a temperaturas de refrigeração e também pode crescer durante a maturação de queijo (BERNINI et al., 2015). *L. monocytogenes* podem multiplicar-se sobre uma vasta gama de pH (FARBER; PETERKIN, 1991), e em condições aeróbias e anaeróbias (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007), esta é uma preocupação especial e requer controle ao longo da cadeia alimentar (VÄLIMAA; TILSALA-TIMISJÄRVI; VIRTANEN, 2015).

Os queijos feitos a partir de leite cru, não passam por qualquer etapa de tratamento térmico antes de serem comercializados (MELO; ANDREW; FALEIRO, 2015). Embora a aplicação de um tratamento térmico, com temperatura adequada, seja suficiente para inativar agentes patogênicos presentes no leite cru, a identificação da *L. monocytogenes* no produto pode ocorrer por consequência de uma contaminação cruzada em ambientes durante armazenamento (COCOLIN et al., 2009).

Segundo El Galiou et al. (2015), é possível realizar o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de diferentes locais do ambiente de fabricação do queijo. A contaminação por *L. monocytogenes* em queijo ocorre principalmente durante o manuseio, sendo que as condições ambientais não controladas durante a fabricação favorecerem a sua presença e sobrevivência. De acordo com Le et al. (2014), os produtores de queijo consideram *L. monocytogenes* como o principal perigo biológico em virtude do seu impacto na indústria alimentar e na saúde humana. Como consequência, muitas estratégias têm sido propostas para controlar *L. monocytogenes* em queijos.

Há falhas em detectar ou estimar os efeitos adversos à saúde e mortes, além das perdas econômicas substanciais que a bactéria *L. monocytogenes* pode causar. Por esta razão, há pesquisas contínuas para o desenvolvimento ou refinamento de métodos analíticos alternativos, sensíveis, específicos e rápidos para detectar quantitativamente baixos níveis de *L. monocytogenes* nos alimentos (COKAL et al., 2012). *L. monocytogenes* tem sido historicamente susceptível a agentes antimicrobianos eficazes contra bactérias Gram-positivas, porém há relatos de resistência antimicrobiana (ALLEN et al., 2014).

Devido às habilidades específicas deste patógeno em superar os obstáculos de processamento, seu controle continua sendo um desafio. O cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF), observação de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e da vigilância do patógeno no ambiente de processamento de queijo são cruciais para fornecer aos consumidores um produto seguro (MELO; ANDREW; FALEIRO, 2015).

2.1.3.3 *Salmonella* spp

Salmonella é uma bactéria com potencial patogênico zoonótico, podendo ser causador da salmonelose (LÖFSTRÖM et al., 2016). É uma das principais causadoras de doenças veiculadas por alimentos no mundo inteiro (EMCH; WAITE-CUSIC, 2016; XIONG et al., 2014; YANG et al., 2016).

A maioria dos casos de infecção de origem alimentar estão associados com o consumo de alimentos frescos (COLAK et al., 2007). Queijos moles feitos a partir de leite não pasteurizado são susceptíveis a contaminados com *Salmonella* (SILVA; HELLO, 2011). Segundo Tamagnini et al (2008) queijos de leite de cabra contaminado pode causar sérios problemas de saúde para os consumidores, pois a *Salmonella* spp resiste ao baixo pH de queijos e leites fermentados (TAMAGNINI et al., 2008), sendo implicadas em vários surtos relacionadas com contaminação de alimentos, e continuam a ser uma preocupação para a

indústria de laticínios (DE BUYSER et al., 2001; DURANGO; ARRIETA; MATTAR, 2004; EL-SHAROUD, 2015; TAMAGNINI et al., 2008).

Salmonella spp. é um microrganismo de difícil controle devido à alta tolerância da bactéria ao estresse ambiental, pois sobrevivem durante períodos extensos (TAMAGNINI et al., 2005), pela sua distribuição generalizada e a ação de múltipla resistência aos antimicrobianos (SILVA; HELLO, 2011).

A resistência a antibióticos é uma preocupação em isolados de *Salmonella*, pois há um número crescente de cepas resistentes a diversos agentes antimicrobianos (FAVARO et al., 2014). A resistência e transmissão dos genes que conferem tal característica a *Salmonella* spp., relacionadas a produtos alimentares, representam uma grave ameaça à saúde dos consumidores (YANG et al., 2016).

Cepas de *Salmonella* com resistência aos agentes antimicrobianos clinicamente importantes, como fluoroquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro, têm sido frequentemente identificadas (EDRINGTON et al., 2004)

A associação de leite e produtos lácteos com a presença de *Salmonella* levanta a necessidade de intensificar esforços para garantir a segurança dos alimentos. Desenvolvimento de medidas eficientes para a detecção e controle de patógenos em leite e produtos lácteos apresenta um elemento importante neste esforço (EL-SHAROUD, 2015).

2.1.3.4. Coliformes totais, Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

Os coliformes totais fazem parte da família *Enterobacteriaceae*. Esses microrganismos apresentam caracteres bioquímicos particulares e são capazes de fermentar a lactose com produção de gás quando incubados de 35 a 37 °C por um período de 24 a 48 horas, sacarose, glicose e dextrose, e não produzem ácido sulfídrico (H₂S). Os Coliformes apresentam forma de bacilo, são micro-organismos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e são capazes de formar esporos (FRANCO; LANDGRAF, 2005; HOLT et al., 1994; JAY, 2005).

Pertencem a esse mesmo grupo os micro-organismos do gênero: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia* (UBEDA et al., 2013). Os micro-organismos citados podem ser encontrados no material fecal e em outros ambientes (por exemplo, vegetais e solo). Contudo, apenas a bactéria *Escherichia coli* possui como hábitat primário o trato gastrointestinal de homens e animais.

O tempo de sobrevivência dessas bactérias patogênicas no ambiente pode ser considerado superior quando comparado aos de origem intestinal. Desta forma, se for confirmado a presença de coliformes totais no alimento, não se pode afirmar que houve contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2005; JAY, 2005).

Dentro do grupo dos coliformes totais estão os termotolerantes, que possuem como principal espécie representante a *Escherichia coli*. Este grupo é capaz de fermentar a lactose com produção de gás até temperaturas que variam de 44 a 45 °C por 24 horas (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A pesquisa por *E. coli* em alimentos é de extrema relevância à saúde pública. Este contaminante é comumente encontrado no leite cru, sendo um possível indicador da presença de cepas enteropatogênicas e/ou toxigênicas (DUBEUF; SAYADI, 2014; MUEHLHERR et al., 2003; STEPHAN et al., 2008; VERNOZY-ROZAND et al., 2005; VERRAES et al., 2015).

Ausência da qualidade microbiológica em leite e queijo caprino, como a presença de *Escherichia coli*, é relatada por diversos autores na região nordeste brasileira (CHAPAVAL et al., 2010; EUTHIER; TRIGUEIRO; RIVERA, 1998; SILVA et al., 2013).

Os queijos fabricados a partir de leite cru têm sido relatados, por vezes, conter cargas elevadas de genes de resistência aos antibióticos (FLÓREZ; MAYO, 2015). A transferência de genes de resistência á bactérias sensíveis podem ocorrer durante a fabricação de alimentos (Rossi et al., 2014).

Esforços são dedicados à segurança alimentar microbiológica, para isso uma atenção está cada vez mais voltada para detecção de sorotipos de *E. coli*, pois alguns causam doenças graves. Assim, em alimentos onde tenha a presença desta bactéria, a análise de risco deve ser empregada para controle do patógeno (MÜHLEMANN, 2014).

2.1.4. ANTAGONISMO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO FRENTE A PATÓGENOS

As modificações nos hábitos alimentares dos consumidores fizeram com que houvesse um crescimento considerável na exigência quanto à qualidade dos produtos alimentícios, principalmente em relação à sua inocuidade (CASTELLANO et al., 2008). Sendo assim, é crescente a procura por alimentos “naturais”, minimamente processados e ausente utilização de conservantes químicos (BALCIUNAS et al., 2013). Para tanto, a procura por alternativas

que substituam estes conservantes e garantam a segurança alimentar vêm se intensificando. Uma opção satisfatória é o uso de Bactérias do Ácido Lático (BAL) com potencial probiótico e/ou seus metabólitos antimicrobianos, como as bacteriocinas. (ALY et al., 2012; MARTINEZ et al., 2015).

Atualmente, pesquisas são desenvolvidas a fim de estudar o potencial antagônico das BAL em relação aos deteriorantes e/ou patógenos alimentares (CALLON; ARLIGUIE; MONTEL, 2016; COELHO et al., 2014; FAVARO; PENNA; TODOROV, 2015; PERIN; NERO, 2014; PICON et al., 2015; PINTO et al., 2011). De modo que, foi comprovado o potencial inibitório a diversos micro-organismos, como por exemplo: *Staphylococcus aureus* (ROLIM et al., 2015; SERIDAN et al., 2012), *Listeria monocytogenes* (COELHO et al., 2014; ROLIM et al., 2015), *Escherichia coli* (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015) e *Salmonella* (CHEN et al., 2007).

As BAL são bactérias Gram-positivas e não formadora de esporos. O termo “bactérias do ácido lático” não reflete uma classe filética, mas sim a capacidade metabólica comum destas espécies, em gerar ácido lático como produto final do metabolismo. Este grupo engloba várias espécies de ordem *Lactobacillales* (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007).

As propriedades antimicrobianas de BAL foram derivadas de competição por nutrientes e a produção de um ou mais metabólitos antimicrobianos ativos, tais como ácidos orgânicos (sobretudo ácido lático e acético), peróxido de hidrogênio e também de outros compostos, tais como antifúngicos e as bacteriocinas (REIS et al., 2012). Esses micro-organismos podem ser encontrados ocupando diferentes nichos (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007), incluindo uma vasta gama de alimentos, inclusive no leite e em seus derivados (FRANTZEN; KLEPPEN; HOLO, 2016).

Os queijos têm sido utilizados como veículo de bactérias probióticas, por proporcionarem condições favoráveis ao crescimento e desenvolvimento destes micro-organismos (KARIMI; MORTAZAVIAN; DA CRUZ, 2011). As BAL, quando adicionadas durante a elaboração desse derivado lácteo, contribuem positivamente com o sabor, textura e valor nutricional do produto final (FAVARO; PENNA; TODOROV, 2015). Além disso, a incorporação dessas bactérias probióticas em queijos pode promover vantagens adicionais, dado que algumas estirpes possuem potencial inibitório ao crescimento de bactérias patogênicas em matrizes alimentares, devido à produção de substâncias antimicrobianas, em especial, as bacteriocinas (CHEN et al., 2007).

As BAL bacteriocinogênicas vêm ganhando destaque na indústria de produtos alimentícios por serem de natural ocorrência nos alimentos (BARBOSA et al., 2015) e por

compor um grupo de micro-organismos geralmente reconhecidos como seguros (do inglês, *Generally Recognized as Safe* – (GRAS) (LÜ et al., 2014).

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados nos ribossomos das células bacterianas (REIS et al., 2012), são biologicamente ativos e a sua liberação ocorre no meio extracelular, apresentando a ação bactericida (ou bacteriostática) sobre micro-organismos relacionados taxonomicamente. Possuem ação inibitória contra outros tipos de microrganismo, sendo que a bactéria produtora possui um mecanismo específico que lhe confere imunidade a estas substâncias (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

Por fim, ainda são escassas as informações relacionadas às condições de desenvolvimento necessárias para um ótimo de produção de muitas bacteriocinas oriundas de BAL (TODOROV; DICKS, 2006). No entanto, segundo García-Ruiz et al. (2013), a atividade inibidora da bacteriocina é dependente da estirpe e o maior efeito antimicrobiano é estabelecido na fase de crescimento exponencial.

2.1.5. CONCLUSÃO

A produção de queijo caprino artesanal é uma atividade importante para a economia baseada na atividade de caprinocultura, sendo de relevância a caracterização microbiológica de queijo coalho de cabra para sua inserção no mercado, pois é um produto fonte de contaminação por bactérias patogênicas. A fim de promover a comercialização de um produto seguro e contribuir de maneira significativa para a renda dos produtores, a adição de BAL para inibição do crescimento de bactérias deteriorantes e patogênicas é uma alternativa para o controle dos micro-organismos patogênicos, obtendo um produto seguro e rico nutricionalmente.

2.1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABED, N.; COUVREUR, P. Nanocarriers for antibiotics: a promising solution to treat intracellular bacterial infections. **International journal of antimicrobial agents**, v. 43, n. 6, p. 485–96, jun. 2014.
- AKINEDEN, O. et al. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **International journal of food microbiology**, v. 124, n. 2, p. 211–6, 31 maio 2008.
- ALBENZIO, M.; SANTILLO, A. Biochemical characteristics of ewe and goat milk: Effect on the quality of dairy products. **Small Ruminant Research**, v. 101, n. 1-3, p. 33–40, nov. 2011.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037–50, 23 mar. 2007.
- ALEGRÍA, A. et al. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. **International journal of food microbiology**, v. 136, n. 1, p. 44–51, 30 nov. 2009.
- ALY, S. et al. The efficacy of nisin can drastically vary when produced in situ in model cheeses. **Food microbiology**, v. 32, n. 1, p. 185–90, out. 2012.
- ALLEN, K. J. et al. *Listeria monocytogenes* – An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 178–189, ago. 2014.
- ALMEIDA JÚNIOR, W. L. DE G. et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, 2015. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.01.013
- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. The challenge of challenge testing to monitor *Listeria monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission (2014) Technical Guidance document. **Food Research International**, v. 75, n.1, p. 233–243, jun. 2015.
- ARCURI, E. F. et al. Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR–DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 1–6, mar. 2013.
- ARQUÉS, J. L. et al. 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**, v. 15, n. 6-9, p. 893–900, jun. 2005.
- AURELI, P. et al. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 325–330, jun. 2003.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 1–10, out. 2000.

BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134–142, 2013.

BARBOSA, M. D. S. et al. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. **Food Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 254–262, 2015.

BASANISI, M. G. et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. **Small Ruminant Research**, v. 135, n. 1, p. 17-19, fev. 2015.

BERNINI, V. et al. A multi-sampling approach to evaluate an infrared surface treatment for reducing *Listeria monocytogenes* contamination on whole Gorgonzola cheese rinds. **Food Control**, v. 55, n. 1, p. 75–81, set. 2015.

BEZERRA, T. K. A. et al. Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 196, n. 3, p. 359–366, abr. 2016.

BJÖRKROTH, J.; KOORT, J. **Reference Module in Food Science**, v. 101, n. 4, p. 6 -50, jan. 2016.

BLAJMAN, J. et al. In vitro and in vivo screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens. **Research in veterinary science**, v. 101, n.1, p. 50–56, ago. 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 25 de Junho de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo Coalho e Queijo de Manteiga, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Seção 1, p. 10, 2001.

BRASIL, Anvisa - Agência Nacional De Vigilância Sanitária., p. 48, 2000. Instrução Normativa RESOLUÇÃO - RDC Nº 12, DE 2 DE JANEIRO DE 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES.

CALLON, C.; ARLIGUIE, C.; MONTEL, M.-C. Control of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in cheese by dairy bacterial strains. **Food microbiology**, v. 53, n. 1, p. 63–70, fev. 2016.

CHAPAVAL, L. et al. Técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Sociedade Brasileira de Zootecnia**. v. 1, n. 1, p. 49–56, julh 2010.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 262–267, mar. 2007.

CASTELLANO, P. et al. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat science**, v. 79, n. 3, p. 483–

99, jul. 2008.

CAVALCANTE, A. C. R. et al. Eimeria species in dairy goats in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 183, n. 3-4, p. 356–8, 10 fev. 2012.

CAVALCANTE, J. F. M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura lática endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 205–214, mar. 2007.

CAVICCHIOLI, V. Q. et al. *Staphylococcus* in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 21, p. 1–5, mar. 2015.

CHEN, X. et al. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. **International journal of food microbiology**, v. 115, n. 3, p. 307–12, 20 abr. 2007.

COCOLIN, L. et al. Microbial ecology of Gorgonzola rinds and occurrence of different biotypes of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1-2, p. 200–205, mai. 2009.

COELHO, M. C. et al. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 191, p. 53–9, 17 nov. 2014.

COKAL, Y. et al. Presence of *L. monocytogenes* and some bacterial pathogens in two Turkish traditional foods, Mihalic cheese and Hosmerim dessert. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 337–340, dez. 2012.

COLAK, H. et al. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 576–579, maio 2007.

COMAN, M. M. et al. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. **International journal of food microbiology**, v. 157, n. 3, p. 346–52, jul. 2012.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777–788, ago. 2005.

DE BUYSER, M.-L. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 1–17, jul. 2001.

DUBEUF, J.-P.; SAYADI, S. Multi-functionality issues for small ruminants: What changes are needed in territorial public policies and training? Report of two round tables on territorial issues and training for the development of goat farming. **Small Ruminant Research**, v. 121, n. 1, p. 136–145, set 2014.

DURANGO, J.; ARRIETA, G.; MATTAR, S. Presencia de *Salmonella* spp. en un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. **Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 24, n. 1, p. 89–96, mai.2004.

EDRINGTON, T. S. et al. Antimicrobial resistance and serotype prevalence of *Salmonella* isolated from dairy cattle in the southwestern United States. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 10, n. 1, p. 51–56, fev. 2004.

EL GALIOU, O. et al. Chemical and microbiological characteristics of traditional homemade fresh goat cheeses from Northern Morocco. **Small Ruminant Research**, v. 129,n.1, p. 108–113, ago. 2015.

EL-SHAROUD, W. M. Developing a time and effort-effective, highly sensitive TaqMan probe-based real-time polymerase chain reaction protocol for the detection of *Salmonella* in milk, yoghurt, and cheese. **International Dairy Journal**, v. 40, p. 62–66, jan. 2015.

EMCH, A. W.; WAITE-CUSIC, J. G. Conventional curing practices reduce generic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. on dry bulb onions produced with contaminated irrigation water. **Food Microbiology**, v. 53, p. 41–47, fev. 2016.

ERTAS, N. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. **International journal of food microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 74–7, 15 ago. 2010.

EUTHIER, S. M. F.; TRIGUEIRO, I. N. S.; RIVERA, F. Condições higienico-sanitárias do queijo de leite de cabra "tipo coalho", artesanal elaborado no carimataú paraibano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 176–178, maio 1998.

FADDA, M. E. et al. Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goat's milk collected in Sardinia. **International journal of food microbiology**, v. 136, n. 3, p. 376–80, 1 jan. 2010.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen **Microbiological Reviews**, 1991. Disponível em:
<<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025951915&partnerID=tZOtx3y1>>

FAVARO, L. et al. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. **Food microbiology**, v. 38, p. 228–39, abr. 2014.

FAVARO, L.; BARRETTO PENNA, A. L.; TODOROV, S. D. Bacteriocinogenic LAB from cheeses – Application in biopreservation? **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 37–48, jan. 2015.

FRANTZEN, C.; KLEPPEN, H. P.; HOLO, H. Use of M17 and a milk-based medium enables isolation of two distinct and diverse populations of *Lactococcus lactis* strains from undefined mesophilic starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 53, p. 45–50, fev. 2016.

FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Diversity and dynamics of antibiotic-resistant bacteria in cheese as determined by PCR denaturing gradient gel electrophoresis. **International journal of food microbiology**, v. 214, p. 63–9, 2 dez. 2015.

- GARCIA, E. F. et al. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 63, n. 8, p. 947–56, dez. 2012.
- GARCÍA, V. et al. Improvements in goat milk quality: A review. **Small Ruminant Research**, v. 121, n. 1, p. 51–57, set. 2014.
- GARCÍA-RUIZ, A. et al. Antimicrobial activity of lacticin 3147 against oenological lactic acid bacteria. Combined effect with other antimicrobial agents. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 477–483, ago. 2013.
- GOLINELLI, L. P. et al. Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 6693–6699, out. 2014.
- GOVARIS, A. et al. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 1240–1244, set. 2011.
- GUSTAFSON, J. E. et al. *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review. **Food Control**, 2014.
doi:10.1016/j.foodcont.2014.10.016
- HAYASHI, T. et al. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. **DNA Research**, v. 8, n. 1, p. 11–22, out. 2001.
- HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815–836, dez. 2012.
- JAKOBSEN, R. A. et al. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. **Food microbiology**, v. 28, n. 3, p. 492–6, maio 2011.
- KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; DA CRUZ, A. G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: A review. **Dairy Science and Technology**, v. 91, p. 283–308, abr. 2011.
- KOUSTA, M. et al. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 805–815, nov. 2010.
- KLOSS, W.E. and SHELEIFER, K.L. GENUS IV *Staphylococcus* ROSEMBACK 1984, 18AL. In: BERGEY. **Manual of Systematic Bacteriology**. v.2, p. 1013-1035, 1984.
- LE, S. et al. Awareness and perceptions of food safety of artisan cheese makers in Southwestern Ontario: A qualitative study. **Food Control**, v. 41, p. 158–167, jul. 2014.
- LEE, H. et al. Quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus aureus* in natural and processed cheese in Korea. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 9, p. 5931–45, set. 2015.

LEVY, S. B. Antibiotic resistance-the problem intensifies. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1446–50, jul. 2005.

LÖFSTRÖM, C. et al. **Encyclopedia of Food and Health.**, 2016. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00607-3

LÜ, X. et al. Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China. **Food Control**, v. 43, n. 1, p. 276–283, mar. 2014.

MAĆKIW, E. et al. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat products in Poland in 2007–2011. **Food Control**, v. 59, n.1, p. 7–11, jan. 2016.

MARTINEZ, R. C. R. et al. Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. **Food microbiology**, v. 48, p. 143–52, jun. 2015.

MASOUD, W. et al. The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 192–202, nov. 2012.

MEDINA, R. B. et al. Sheep and goat's dairy products from South America: Microbiota and its metabolic activity. **Small Ruminant Research**, v. 101, n. 1-3, p. 84–91, nov. 2011.

MELO, J.; ANDREW, P. W.; FALEIRO, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. **Food Research International**, v. 67, n. 1, p. 75–90, jan. 2015.

MISZCZYCHA, S. D. et al. Survival of *Escherichia coli* O26:H11 exceeds that of *Escherichia coli* O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. **International journal of food microbiology**, v. 172, n.4, p. 40–8, 17 fev. 2014.

MONTEL, M.-C. et al. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. **International journal of food microbiology**, v. 177, n.1, p. 136–54, 2 maio 2014.

MOZZI, F. **Encyclopedia of Food and Health.** 2016. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1

MUEHLHERR, J. E. et al. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 12, p. 3849–56, dez. 2003.

MÜHLEMANN, M. **Encyclopedia of Food Safety.** 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-378612-8.00415-7

NORMANNO, G. et al. Coagulase-positive Staphylococci and in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 73–79, mai. 2005.

OLIVEIRA, M. E. G. DE et al. Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 370–379, dez. 2012.

PARKHILL, J. et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. **Nature**, v. 403, n. 6770, p. 665–668, abr. 2000.

PERIN, L. M.; NERO, L. A. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. **BMC microbiology**.2014.doi: 10.1186/1471-2180-14-36

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 546–553, dez. 2007.

PIMENTEL-FILHO, N. DE J. et al. Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. **International journal of food microbiology**, v. 190, n.1, p. 1–8, nov. 2014.

PICON, A. et al. Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. **International Dairy Journal**, v. 117, n. 1, p. 136-54, out. 2015.

PINTO, M. S. et al. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 2, p. 90–96, fev. 2011.

QUEIROGA, R. DE C. R. DO E. et al. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 538–544, mar. 2013.

RANADHEERA, C. S. et al. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, n. 2, p. 619–625, dez. 2012.

RANDAZZO, C. L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **Journal of microbiological methods**, v. 78, n. 1, p. 1–9, jul. 2009.

RAYNAL-LJUTOVAC, K. et al. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small Ruminant Research**, v. 79, n. 1, p. 57–72, set. 2008.

REIS, J. A. et al. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. **Food Engineering Reviews**, v. 2, n. 2, p. 124–140, abr .2012.

RIBEIRO, A. C.; RIBEIRO, S. D. A. Specialty products made from goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 2-3, p. 225–233, abr. 2010.

ROLIM, F. R. L. et al. 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**, v. 63, n. 2, p. 807–813, out. 2015.

ROSSI, F. et al. Horizontal gene transfer among microorganisms in food: Current knowledge and future perspectives. **Food Microbiology**, v. 42, n.2, p. 232–243, mar. 2014.

SCHODER, D. et al. Population diversity of *Listeria monocytogenes* in quargel (acid curd cheese) lots recalled during the multinational listeriosis outbreak 2009/2010. **Food microbiology**, v. 39, n. 2, p. 68–73, maio 2014.

SCHODER, D. et al. How safe is European Internet cheese? A purchase and microbiological investigation. **Food Control**, v. 54, n.1, p. 225–230, fev. 2015.

SERHAN, M. et al. Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. **Food microbiology**, v. 26, n. 6, p. 645–52, set. 2009.

SERIDAN, B. et al. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 465–470, abr. 2012.

SILVA, G. S. DA; et al. Microbiological and physical-chemical profile of goat milk in the semiarid region of the San Francisco Valley. **Veterinária Notícias**, v. 19, n. 1983-0777, p. 14–22, jan.2013.

SILVA, N. J.; HELLO, S. LE. Salmonelloses en France , 2002-2010 : tendances en épidémiologie humaine , émergence de la souche monophasique , principaux aliments impliqués dans les dernières épidémies. v. 139, n. 2, p. 2008–2011, mai. 2011.

SKEIE, S. B. Quality aspects of goat milk for cheese production in Norway: A review. **Small Ruminant Research**, v. 122, n. 1-3, p. 10–17, nov. 2014.

SOUSA, W. H. et al. Genetic improvement of goats in Brazil: Experiences, challenges and needs. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 147–156, jun. 2011.

SPANU, V. et al. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **International journal of food microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 53–7, 1 fev. 2012.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 9, n. 10, p. 1236–43, ago. 2007.

STEBBINS, N. D.; OUIOMET, M. A.; UHRICH, K. E. Antibiotic-containing polymers for localized, sustained drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 78, p. 77–87, 30 nov. 2014.

STEPHAN, R. et al. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 7, p. 2561–5, jul. 2008.

TAMAGNINI, L. M. et al. Behavior of *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese. **International journal of food microbiology**, v. 99, n. 2, p. 129–34, 15 mar. 2005.

TAMAGNINI, L. M. et al. Behavior of *Enterobacter amnigenus* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese: Influence of fluctuating storage temperature. **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 3, p. 177–182, maio 2008.

TANG, S. S.; APISARNTHANARAK, A.; HSU, L. Y. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. **Advanced drug delivery reviews**, v. 78, p. 3–13, 30 nov. 2014.

TEKINŞEN, K. K.; ÖZDEMİR, Z. Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlu (Herb) cheese. **Food Control**, v. 17, n. 9, p. 707–711, 2006.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 11–19, jan. 2006.

UBEDA, J. L. et al. Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. **Theriogenology**, v. 80, n. 6, p. 565–70, out. 2013.

VÄLIMAA, A.-L.; TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; VIRTANEN, E. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain – a review. **Food Control**, v. 55, n. 3, p. 103–114, mar. 2015.

VERNOZY-ROZAND, C. et al. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. **International journal of food microbiology**, v. 105, n. 1, p. 83–8, 15 nov. 2005.

VERRAES, C. et al. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 4, p. 360–363, jun. 2015.

XIONG, M.-H. et al. Delivery of antibiotics with polymeric particles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 78, n. 6, p. 63–76, fev. 2014.

YANG, X. et al. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Salmonella* isolated from retail ready-to-eat foods in China. **Food Control**, v. 60, n. 1, p. 50–56, fev. 2016.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K.-H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, n. 11, p. 201–215, maio 2016.

ZELÉNY, R. et al. Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. **Food chemistry**, v. 168, n. 1, p. 241–6, fev. 2015.

2.2. CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO

Caracterização microbiológica do queijo caprino artesanal produzido no semiárido nordestino brasileiro e adição de bactérias lácticas para o controle de *Staphylococcus aureus*

Resumo

Queijo de coalho caprino artesanal é um dos principais produtos que geram renda para os pequenos agricultores no semiárido nordestino brasileiro. Este derivado lácteo tem importância social e econômica na região. Por esta razão, é fundamental a caracterização microbiológica dos queijos de cabras produzidos artesanalmente para a sua inserção no mercado. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar micro-organismos bacterianos em queijo caprino artesanal produzido no semiárido nordestino brasileiro, analisar o perfil de resistência dos patógenos detectados e avaliar a adição de bactérias lácticas para controle de *Staphylococcus aureus*. Coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Listeria* foram detectados em queijo de cabra. Nas amostras analisadas: 8, 12, 6 e 9 dos isolados de *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* e *S. aureus*, respectivamente, foram classificados como Resistentes a Múltiplas Drogas (MDR). O patógeno mais comumente encontrado em queijo de cabra foi *Staphylococcus*. Contudo, este estudo demonstrou que um coquetel de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) selecionadas (UNIVASF CAP) a partir de queijo caprino foram capazes em reduzir aproximadamente 3 unidades log do patógeno *S. aureus* MDR, isolado de queijo de cabra artesanal.

Palavras-chaves: patógenos, queijo coalho, resistência a múltiplas drogas, semiárido

2.2.1. Introdução

O Brasil é o maior produtor de leite de cabra na América do Sul e a região Nordeste concentra 93% da população caprina. A caprinocultura se apresenta como atividade promissora, devido às mudanças na cadeia de suprimento de alimentos e diversificação de mercado (CAVALCANTE et al., 2007; SOUSA et al., 2011). Entre os produtos de destaque da cadeia caprina, há o queijo coalho artesanal, produto tradicional no Nordeste e muito apreciado pelos consumidores (BEZERRA et al., 2016).

Embora o queijo coalho seja um dos principais produtos responsáveis pela geração de renda para os pequenos agricultores, ainda é feito de forma artesanal, sem acesso às instalações, portanto, não há padronização do processo de elaboração, sendo comum a utilização de leite cru, o que põe em risco a saúde dos consumidores (CAVALCANTE et al., 2007; QUEIROGA et al., 2013). A ausência de normas para controle da qualidade do leite e produtos lácteos a partir do leite de cabra é um dos principais obstáculos para o agronegócio especializado em caprinos leiteiros. O acesso ao mercado para estes produtos está fortemente ligado à melhoria da aplicação de tecnologia apropriada para os padrões de qualidade exigidos pela legislação (CARTAXO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011).

Quanto ao risco microbiológico do queijo de cabra, em outros países há relatos do produto como veículo de micro-organismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes* (OLARTE et al., 2002), *Salmonella* (TAMAGNINI et al., 2008) e *Escherichia coli* O157:H7 (VERNOZY- ROZAND et al., 2005). No Brasil, existem poucos estudos e os principais micro-organismos relatados são coliformes e *Staphylococcus aureus* (PICOLI et al., 2006; EUTHIER et al., 1998). *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais importantes de origem alimentar em queijos devido ao contato direto do manipulador durante a elaboração do produto (BASANISI et al., 2015).

Uma opção para aumentar a segurança microbiológica dos queijos de cabra artesanais seria a adição de culturas iniciadoras, as Bactérias do Ácido Lático (BAL) selecionadas. A inserção destas culturas no produto é crucial não apenas para garantir a segurança microbiológica com inibição de agentes patogênicos, mas também para melhorar as propriedades tecnológicas e funcionais e intensificar o sabor dos queijos (BERNINI et al., 2015; ROLIM et al., 2015).

Para o interior da região do semiárido nordestino é fundamental caracterizar a microbiologia do queijo caprino artesanal produzido e contribuir para uma maior qualidade microbiológica e tecnológica do mesmo, pois existe a possibilidade de registro de Indicação

Geográfica emitido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, Brasil), regulamentado através da Instrução Normativa nº 30, de 7 de Agosto de 2013 (BRASIL, 2013), onde se permite que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por menos de 60 dias, quando os estudos técnicos e científicos comprovarem que redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto.

Além disso, os pequenos produtores poderão atender ao PAA (Programa de Aquisição de Alimentos - Brasil), onde o governo brasileiro adquire produtos alimentares oriundos da caprinocultura para abastecer creches, hospitais e outras instituições de assistência governamental (BRASIL, 2015). Assim, este estudo objetivou investigar micro-organismos bacterianos em queijos de cabra artesanal produzidos no semiárido nordestino brasileiro e avaliar a adição de bactérias lácticas para controle de *Staphylococcus aureus*.

2.2.2. Material e Métodos

2.2.2.1 Obtenção das Amostras

Um total de 40 queijos de cabra foram adquiridos em feiras e associações de criadores de caprinos em oito municípios do semiárido nordestino: Petrolina, Santa Maria da Boa Vista, Lagoa Grande, Cabrobó, Dormentes, Afrânio, Casa Nova e Sento Sé. Cinco amostras de cada cidade foram analisadas. As amostras foram transportadas para o laboratório em caixas isotérmicas sob refrigeração e analisadas imediatamente.

2.2.2.2 Análise Microbiológica

Vinte e cinco gramas foram assepticamente removidos por meio de cortes radiais de cada queijo caprino e depois homogeneizados no Stomacher® (Mayo homogenius HG 400) com 225 ml de água peptonada a 1% (Himedia) (IDF, 1995). Diluições decimais (10^{-1} a 10^{-10}) foram preparadas e transferidas para placas com cada meio específico para detecção de Bactérias Aeróbias Mesófilas (BAM), Bactérias do Ácido Láctico (BAL), coliformes termotolerantes e *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*.

As BAM e BAL foram enumeradas no Ágar Padrão para Contagem (APC, Himedia) e Ágar “Man Rogosa Sharpe” (MRS, Himedia), respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas para as BAM e 37°C durante 72 - 96 horas para BAL. A

classificação básica dos isolados de BAL foi efetuada através da reação de Gram, morfologia, motilidade, catalase (H₂O₂, 3% vol/vol) e atividade de citocromo-oxidase.

Para enumeração de coliformes termotolerantes e detecção de *E. coli*, o fluorocult LMX “Broth Modifiel acc. to Marrafi and Osmer” foi utilizado. Nos tubos indicativos de *E. coli* foram adicionados o reagente de Kovac`s. Os tubos positivos foram semeados no Ágar Eosina Azul de metileno (EMB) (Himedia). Tubos Eppendorf positivos para cada diluição foram anotados para posterior cálculo do Número Mais Provável (NMP) por mL de amostra, usando a Tabela McCrady. Para confirmação de *E. coli*, colônias confirmadas como Gram-negativas, oxidase negativas e catalase positivas foram semeadas em agar PCA e incubadas a 37 °C durante 24 horas para os testes bioquímicos de indol, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e citrato (IMViC). A partir dos resultados dos testes IMViC, *E. coli* foram classificadas como biotipo 1: indol (+), VM(+), VP (-) e citrato (-) e biotipo 2: indol (-), VM (+), VP (-) e citrato (-) conforme descrito por Anderson e Baird-Parker (1975).

Para o gênero *Staphylococcus*, os procedimentos analíticos de isolamento seguiram a técnica descrita por Brasil (2003). Alíquotas de 0,1 ml de diferentes diluições foram semeadas, em duplicata, na superfície de Ágar Baird-Parker. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24-48 horas. Colônias típicas foram selecionadas. Para caracterizar o gênero foram realizados os testes: método de Gram, catalase, coagulase, oxidação e fermentação (O / F) de glicose e manitol e detecção de atividade da enzima DNase e termonuclease.

Salmonella spp. foram detectadas conforme descrito por Pignato et al. (1995). Para a identificação e isolamento, 25 g de cada amostra foram transferidas assepticamente para 225 mL de caldo base pré-enriquecido "Salmosyst" (peptona universal 10 g, cloreto de sódio 5 g, carbonato de cálcio 10 g, e água destilada 1000 mL), homogeneizada em Stomacher durante 4 min e incubada a 37 °C por 6 horas. Para o enriquecimento seletivo, em 10 mL de caldo base pré-enriquecido foi adicionado caldo tetracionato suplementado com iodo e solução verde brilhante e incubado durante 18 horas a 37 °C. A partir de cada tubo, uma alça de cultivo foi semeada em ágar Rambach (Merck) e as placas foram incubadas a 37 °C / 24 horas. As colônias típicas em ágar Rambach foram selecionados e transferidos para tubos contendo ágar “Triplo Açucar Ferro” (TSI) (Himedia) e “Ágar Lisina Ferro” (LIA) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Cepas características de *Salmonella spp.* foram testadas para a coloração diferencial de Gram, catalase, oxidase, teste de motilidade, produção de sulfetos de indol. Resultados indicativos de *Salmonella* foram confirmados através do teste sorológico, utilizando o Soro *Salmonella* Polivalente Somático com anti-soro “O”, “Vi” e “H”. (Probac, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

A detecção de *L. monocytogenes* foi realizada como previamente descrito por Capita et al. (2001), 25 g de cada amostra foram homogeneizados em 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB, Himedia) e incubou a 30 °C durante 24 horas. Depois de pré-enriquecimento, 0,1 ml foi transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo Fraser (Himedia) e incubou-se a 35°C durante 24-48 horas até se observar um enegrecimento do meio. Os tubos com escurecimento foram, em seguida, semeados em Agar Palcam (Himedia) e incubados a 35°C, durante 24 a 48 horas. As colônias suspeitas de *Listeria* spp. foram semeadas em placas com “Ágar Soja Trypticase” (TSA) contendo 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE; Himedia) e incubadas a 37 °C durante 24-48 horas. Em seguida, os testes bioquímicos foram conduzidos para isolados Gram-positivos, os quais pode observar a produção de catalase, fermentação de hidratos de carbono, hemólise em placas de Ágar sangue de ovelha e motilidade a 25 °C.

Na análise microbiológica quantitativa, placas com 30-300 colônias foram enumeradas. Os dados microbiológicos foram transformados em logaritmos na base 10 do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g). Na análise qualitativa, foi detectada a presença ou ausência de micro-organismos.

2.2.2.3 Resistência antimicrobiana

Com base nas recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI 2012), os seguintes agentes antimicrobianos foram utilizados para micro-organismos Gram-negativos (*E. coli* e *Salmonella*): da classe das fluroquinonas foi utilizado a ciprofloxacina (5 µg/mL); da classe dos inibidores da via de folato utilizou-se o sulfazotrim (25 µg/mL); da classe dos aminoglicosódeos foram testadas a gentamicina (10 µg/mL) e a amicacina (20 µg/mL); da classe dos cefens, os antibióticos foram a cefalotina (30 µg/mL), ceftazidima (30 µg/mL), cefepime (30 µg/mL), cefoxitina (30 µg/mL) e cefuroxima (30 µg/mL); da classe da penicilina foi utilizado a ampicilina (10 µg/mL); dos β-lactâmicos, o antimicrobiano foi a amoxicilina+clavulanato (30 µg/mL); da classe dos carbopenams, foi testado o meropenem (10 µg/mL). Para isolados Gram-positivos (*Staphylococcus* e *Listeria*), os agentes antimicrobianos utilizados foram: da classe das penicilinas foram utilizados a oxacilina (1 µg/mL) e a penicilina (10 µg/mL); da classe dos glicopeptídeos foi testado a vancomicina (30 µg/mL); das fluoroquinolonas foi usado a ciprofloxacina (5 µg/mL); da classe das

tetraciclina utilizou-se a tetraciclina (30 µg/mL); da classe dos fenicóis foi testado o clorofenicol (30 µg/mL); da classe dos licosamídeos foi testado o antibiótico clidamicim (2 µg/mL); dos aminoglicosídeos foi utilizado a gentamicina (10 µg/mL); da classe dos macrolídeos foi testada a eritromicina (15 µg/mL); da classe dos cefens foi testado o cefepime (30 µg/mL); da classe das ansamicinas foi usada a rifanpim (5 µg/mL) e da classe dos inibidores das vias de folato foi testado a sulfazotrim (25 µg/mL). Os micro-organismos foram cultivados em caldo “Tryptone Soya Broth” (TSB, Himedia®) suplementado com 0,6% de extrato de levedura durante 24 horas a 37 °C. Os cultivos com crescimento foram emulsionados com 4 mL de água destilada esterilizada e padronizou-se a suspensão por comparação de turvação ao padrão nº 0,5 da escala de McFarland (Probac, Brasil). Um suabe esterilizado foi utilizado para espalhar o inóculo através da superfície do ágar Muller Hinton (Himedia) e os discos de antimicrobianos (Multidiscos gram negativos 12®; Multidiscos Gram Positivos 12®, InterLab, Brasil) foram aplicados à placa. Os perfis de resistência das estirpes foram analisados por uma medição da inibição do crescimento de bactérias após incubação durante 24 horas a 37 °C. O perfil de resistência a múltiplos fármacos foi calculado pelo índice de Múltipla Resistência aos Antibióticos (MAR). As cepas com um índice igual ou superior a 0,5 e resistentes a três ou mais antimicrobianos testados foram classificadas como tendo um alto índice de MAR (HANON et al, 2015). *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram utilizados como controles para a qualidade do teste.

2.2.2.4 Identificação molecular

O DNA de isolados dos agentes patogênicos com índice MAR igual ou superior a 0,5 e resistentes a três ou mais agentes antimicrobianos testados, foi extraído utilizando o minikit DNA QIAamp (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A análise da Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 25 µL de mix TopTaq master (Qiagen), 1 µL de cada iniciador (27f / 1512r), 2 µL de DNA e 21 µL de RNase livre de água. A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C, por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C, por 1 minuto, 52 °C, por 45 segundos, e 72 °C, por 1 minuto. Uma extensão final a 72 °C foi realizada por 7 minutos. Após a amplificação, as amostras foram armazenadas a 4 °C. Os produtos não purificados da PCR foram sequenciados pela empresa BPI Biotecnologia Pesquisa e Inovação Ltda EPP (Botucatu, São Paulo, Brasil), e as sequências foram então

comparadas com às disponíveis na base de dados GenBank utilizando o algoritmo BLAST (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, Maryland, EUA).

2.2.2.5 Inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo caprino artesanal

Os queijos de cabra foram fabricados para avaliar a ação inibitória das BAL contra *Staphylococcus aureus*. O inóculo de BAL utilizado refere-se a um coquetel de seis isolados autóctones de queijo caprino: UNIVASF CAP 1, 4, 13, 14, 18 e 19. Estas cepas foram selecionadas de acordo com as propriedades tecnológicas e probióticas e atividade antibacteriana (especialmente *S. aureus*). O inóculo *S. aureus* corresponde ao isolado a partir de queijo de cabra foi QCSA24. Os queijos foram fabricados em conformidade com o procedimento tradicional empregado pelos pequenos agricultores na região do semiárido de Pernambuco, como uma modificação da temperatura de pasteurização do leite (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015). No primeiro queijo (queijo 1), um inóculo contendo a bactéria patogênica, *S. aureus*, suspenso em leite a 1%, foi usado na preparação de queijo em água destilada estéril, com uma população de 10^8 UFC/mL e foi adicionado como controle positivo. No segundo tipo de queijo (queijo 2), o mesmo volume de água destilada esterilizada contendo 10^8 UFC/mL de *S. aureus* e 10^8 UFC/ mL de uma mistura de BAL selecionadas foi analisada. No terceiro queijo, não houve inoculação microbiana: o queijo foi o controle negativo. A massa de queijo foi distribuída em formas perfuradas para queijo de 250g pressionados durante 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os produtos foram embalados em sacos de plástico estéreis (Cryovac, Brasil) e armazenados a 4°C durante um total de 20 dias. A enumeração bacteriana e o pH foram realizadas nos dias 0, 5, 10, 15 e 20, após a preparação de queijos.

2.2.2.6 Enumeração bacteriana e determinação do pH

Vinte e cinco gramas foram assepticamente removidos através da realização de cortes radiais de cada queijo e homogeneizados no Stomacher® (Mayo homogenius HG 400) com 225 mL de água peptonada a 1% (himedia (FDI), 1995). As diluições em série foram preparadas. A enumeração de BAL foi efetuada utilizando o meio de cultura MRS e as placas foram incubadas a 37 °C durante 24-72 horas. Para enumeração de *S. aureus*, alíquotas de 0,1 mL de diferentes diluições foram semeadas, em duplicata, na superfície do Ágar Baird-

Parker. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24-48 horas. As colônias típicas de cada meio foram enumeradas.

O valor de pH foi determinado por homogeneização de 10 g de queijo em 10 mL de água destilada usando um medidor de pH (PHS-3B, Labmeter Modelo PH equipado com um eletrodo T818-A, Xangai, China).

2.2.2.7 Análise estatística

Para verificar a inibição de *S. aureus* em queijo de cabra foi utilizado um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) e os tratamentos foram dispostos em um esquema fatorial, 3 x 5: 3 queijos (um queijo com um inóculo de *S. aureus*, um queijo com um inóculo de *S. aureus* e inóculo de BAL e um sem inóculo) e 5 pontos de tempo (0, 5, 10, 15 e 20 dias). Os dados foram analisados por meio de análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott. Os dados quantitativos foram analisados por meio de regressão. A análise estatística foi realizada utilizando o software SISVAR® (Lavras, Brasil), versão 4.5.

2.2.3 Resultados e discussão

2.2.3.1 Análises Microbiológicas

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ), queijo de coalho é obtido pela coagulação do leite por coalho ou de outras enzimas coagulantes adequadas, complementado ou não pela ação de bactérias do ácido láctico selecionadas, armazenado sob temperatura média de 10-12 °C e comercializados normalmente até dez (10) dias fabricação. Ainda de acordo com a legislação, é um produto de média a alta umidade, de massa semicozida ou cozida ou preparado a partir de massa crua (sem aquecimento) (BRASIL, 2000).

As contagens totais de bactérias aeróbias mesófilas (BAM) e bactérias do ácido láctico (BAL) nos queijos permaneceram em uma população de 6,737 e 6,545 log₁₀ UFC/g, respectivamente (Tabela 1). Os resultados, em geral, foram superiores aos encontrados em outras variedades de queijo de cabra (PSONI et al, 2003; El GALIOU et al, 2015; PICON et al, 2015). As BAL isoladas de queijos de cabra apresentaram reação Gram-positiva (cocos e

bacilos) e catalase, motilidade e oxidase negativas. Os *Lactobacillus* mesófilicos, também chamados de “Non Starter *Lactic Acid Bacteria*” (NSLAB), *bactérias do ácido lático* não iniciadoras, são comumente encontrados compondo a microbiota de queijos (FAVARO; BARRETTO PENNA; TODOROV, 2015). Estes micro-organismos podem fornecer benefícios ao queijo, ou seja, as propriedades tecnológicas dos isolados selecionados de BAL podem ser úteis no desenvolvimento e manutenção de suas características sensoriais diferenciadas e antagonismo aos patógenos (FAVARO et al, 2014; PICON et al., 2015).

Tabela 1. Enumerações logarítmicas de grupos microbianos e determinação de pH (média \pm DP) de queijos de cabra comercializados em municípios do semiárido nordestino.

Amostras	Municípios	BAM ¹	BAL ¹	Coliformes Termotolerantes ²	<i>Staphylococcus spp.</i> ¹	pH
QC1	Petrolina	7,90	5,47	6,38	6,91	5,54 \pm 0,28
QC2		6,68	7,85	7,66	6,34	5,13 \pm 0,22
QC3		4,43	4,54	-	6,71	5,23 \pm 0,13
QC4		6,68	7,14	8,04	6,91	5,43 \pm 0,14
QC5		7,64	7,62	6,04	7,54	5,48 \pm 0,05
Média		6,66	6,52	5,62	6,88	5,36
QC6	Santa Maria da Boa Vista	7,43	2,10	8,66	5,97	5,49 \pm 0,15
QC7		7,50	7,57	9,04	6,16	5,83 \pm 0,41
QC8		7,76	7,30	8,66	6,54	5,6 \pm 0,09
QC9		7,68	6,99	-	8,00	6,07 \pm 0,24
QC10		7,64	6,98	-	6,69	5,7 \pm 0,08
Média		7,60	6,18	5,27	6,67	5,73
QC11	Lagoa Grande	5,49	5,85	5,32	-	5,94 \pm 0,08
QC12		6,82	6,25	7,04	-	6,1 \pm 0,2
QC13		7,39	5,47	1,10	-	5,61 \pm 0,5
QC14		7,39	7,00	1,10	5,44	5,43 \pm 0,2
QC15		7,39	5,44	1,10	7,00	5,49 \pm 0,12
Média		6,89	6,00	3,13	2,48	5,71
QC16	Cabrobó	5,30	5,30	1,10	6,90	5,55 \pm 0,12
QC17		5,44	7,00	1,10	5,77	5,5 \pm 0,11
QC18		5,74	6,90	1,10	5,60	5,57 \pm 0,07
QC19		6,74	6,90	1,10	5,60	5,4 \pm 0,08
QC20		6,74	6,83	1,10	7,47	5,25 \pm 0,10
Média		5,99	6,58	1,10	6,26	5,45
QC21	Casa Nova	7,89	6,88	1,10	6,00	4,81 \pm 0,52
QC22		7,30	6,90	1,10	5,84	5,38 \pm 0,06
QC23		5,83	6,82	1,10	5,80	5,21 \pm 0,04
QC24		6,54	6,36	1,10	5,73	5,31 \pm 0,05
QC25		7,47	7,96	1,10	5,74	5,14 \pm 0,08

Média		7,00	6,98	1,10	5,82	5,17
QC26		5,64	6,47	1,10	6.,69	5,37 ± 0,12
QC27		6,73	7,49	1,10	-	5,29 ± 0,18
QC28	Sento Sé	6,82	7,50	1,10	-	5,1 ± 0,09
QC29		7,00	6,8	1,10	-	5,23 ± 0,06
QC30		6,67	6,84	1,10	5,44	5,19 ± 0,02
Média		6,57	7,02	1,10	2,42	5,23
QC31		6,67	6,47	1,10	5,44	5,1 ± 0,08
QC32		5,47	6,36	1,10	5,53	5,23 ± 0,05
QC33	Dormentes	5,00	5,66	1,10	-	5,18 ± 0,03
QC34		6,63	5,79	1,10	-	5,15 ± 0,05
QC35		6,74	6,94	1,10	5,36	5,28 ± 0,02
Média		6,10	6,24	1,10	3,26	5,18
QC36		6,78	5,81	1,10	7,70	5,3 ± 0,09
QC37		5,69	5,47	1,10	5,47	5,22 ± 0,04
QC38	Afrânio	7,80	7,55	1,10	6,59	5,27 ± 0,05
QC39		7,50	7,50	1,10	7,63	5,8 ± 0,33
QC40		7,53	7,73	1,10	6,71	5,11 ± 0,48
Média		7,06	6,81	1,10	6,82	5,34
Total Média		6,73	6,54	2,44	5,08	5,40

¹ log₁₀ UFC / g: Unidade Formadora de Colônia; ² log₁₀ NMP / g: Número Mais Provável; -: Não detectada
 QCn°: Queijo, cidade e número de identificação

De acordo com a legislação vigente no Brasil, para os critérios microbiológicos de queijos de médio a alto teor de umidade, tanto o Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, através da legislação RDC n°12 (BRASIL,2001) e Portaria n° 46 (BRASIL,1998), respectivamente, estão de acordo com o plano de amostragem do produto. Para coliformes termotolerantes, na análise de 5 amostras, 2 podem apresentar entre 3 e 3,7 log₁₀ UFC / g. Para os *Staphylococcus* coagulase-positivos, de 5 amostras, 2 podem apresentar de 2 a 3 log₁₀ UFC / g. Para os micro-organismos *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* devem estar ausentes em 25 g.

Neste estudo, as amostras 4, 3 e 2 de municípios de Petrolina, Santa Maria da Boa Vista e Lagoa Grande, respectivamente, não estavam de acordo com a legislação (Tabela 1). Elevadas contagens de coliformes é comum em queijos caprinos elaborados a partir de leite cru (OLARTE et al, 2000;. PSONI et al, 2003;. EL GALIOU et al, 2015). A presença de alta população do grupo coliformes é indicativa de más condições de higiene relacionadas com a produção do queijo e a qualidade do leite cru. As bactérias coliformes são responsáveis pelo

início do estufamento precoce em queijos e também podem causar um sabor desagradável ao produto. Entre as 37 amostras positivas para coliformes termotolerantes, em 11 e 10 amostras, houve a confirmação fenotípica de *E. coli* biótipo 1 e *E. coli* biótipo 2, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Confirmação bioquímica de patógenos (destacado em cinza) isolados de queijos de cabra comercializados em municípios do semiárido nordestino.

Isolados	Municípios	<i>E. coli</i> ¹	Coagulase negativo <i>S.</i>	Coagulase positivo <i>S.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.
QC1	Petrolina		+			+	
QC2		+				+	
QC3						+	
QC4						+	
QC5				+			+
QC6	Santa Maria da Boa Vista		+			+	
QC7					+	+	
QC8					+	+	
QC9						+	
QC10						+	
QC11	Lagoa Grande				+	+	+
QC12			+			+	+
QC13		+					
QC14		+			+		
QC15		+			+		
QC16	Cabrobó			+			
QC17				+		+	
QC18		+			+	+	
QC19		+			+		+
QC20		+				+	
QC21	Casa Nova	+		+			
QC22		+		+			

QC23		+		+		
QC24		+			+	+
QC25				+		
QC26				+		
QC27				+		
QC28	Sento Sé	+			+	
QC29		+		+		+
QC30		+		+		
QC31		+		+		
QC32					+	+
QC33	Dormentes	+		+		
QC34		+			+	
QC35		+				
QC36		+				+
QC37	Afrânio	+				
QC38				+		
QC39		+				+
QC40				+		+

1: célula realçada em cinza escuro: *E. coli* biótipo 1; Célula em realçada em cinza claro: *E. coli* biótipo 2

Quanto à enumeração de *Staphylococcus spp.*, a maior população encontrada foi correspondente ao município de Petrolina com média de 6,882 log₁₀ UFC / g. A média geral dos municípios foi 5,085 log₁₀ UFC/ g. As contagens foram elevadas e maiores que a recomendação vigente pelas legislações (Tabela 1). Na identificação bioquímica, 4 isolados foram confirmados *S. coagulase* negativos, 18 como *S. coagulase* positivos e 9 como *S. aureus* (Tabela 2).

Staphylococcus aureus é considerado como uma das principais causas de doenças de origem alimentar. Leite e produtos lácteos são muitas vezes contaminados por cepas enterotoxigênicas desta bactéria. A contaminação dos alimentos pode ocorrer diretamente de animais infectados ou podendo resultar de falta de higiene durante os processos de produção, ou do fracionamento e/ou armazenagem dos alimentos, uma vez que os seres humanos podem

carrear o microrganismo (NORMANNO et al., 2007). Spanu et al. (2012) afirmou que a contaminação do queijo de ovelha tradicional e artesanal com *S. aureus* é de origem animal e que a detecção do biótipo de origem humana é esporádica. Esta espécie em queijos de leite cru é uma preocupação para segurança microbiológica somente quando ela está presente em quantidade superior a de $4 \log_{10}$ UFC / g e produz enterotoxinas. Geralmente, a quantidade de enterotoxinas estafilocócicas exigidas para o estabelecimento de sintomas característicos de intoxicação alimentar é muito baixa, variando entre 20 ng a 1 µg (YON et al., 2016; NORMANNO et al., 2007).

A média do valor de pH em municípios variou de 5,17 para 5,738, e a média geral foi de 5,4 (Tabela 1). Valores de pH semelhantes aos do queijo de cabra desse estudo foram relatados por Psoni et al. (2003) e Terzic-Vidojevic et al. (2013). Em geral, os pH dos derivados de leite de cabra apresentam uma capacidade de tamponamento e alcalinidade mais pronunciada que em leite de vaca. No entanto, diferentes fatores, como a microbiota autóctone, composição química, tempo de maturação e a tecnologia tradicional podem afetar o pH dos queijos (PARK et al, 2007; TERZIC-VIDOJEVICET al, 2013).

Salmonella spp. foram detectadas em 18 amostras de queijo de cabra (45%) (Tabela 2). O fator predisponente de contaminação pode ser explicado pelo uso de leite cru na produção de queijo, fontes ambientais, tais como utensílios e equipamentos de manuseio incorreto durante o processamento de queijo. Tekinşen e Özdemir (2006) também detectaram *Salmonella spp.* em 6% dos queijos Van otlu, um queijo tradicional turco elaborado artesanalmente a partir de leite integral não-pasteurizado de ovelha, vaca e/ou cabra (TEKINŞEN; ÖZDEMİR, 2006). *Salmonella* pode sobreviver por longos períodos em queijos e representa um perigo potencial para a saúde do consumidor (TAMAGINI et al., 2005). Infecções por *Salmonella* têm sido associadas a surtos ligados ao consumo de vários tipos de queijos e indicado que o baixo nível de contaminação pode causar surtos que podem ser difíceis de detectar (KOUSTA et al., 2010). No Brasil, existe escassa informação disponível sobre a prevalência de *Salmonella* em leite de cabra e seus derivados. Oliveira et al. (2011) relataram que entre 96 amostras de leite caprino, duas foram positivas para *S. enterica* em propriedades localizadas na região do Cariri, no estado nordestino da Paraíba, Brasil.

Listeria spp. foi detectada em 6 amostras de queijo de cabra (15%) (Tabela 2), representando assim um grande risco para os consumidores deste produto na região. A presença do patógeno em amostras de queijo de cabra é alarmante (EL GALIOU et al., 2015; SILVA et al., 2013). De acordo com Melo et al. (2015), produtos lácteos, em particular os

queijos frescos, representam uma grande preocupação para as autoridades do setor de laticínios e de saúde pública já que são a principal fonte de surtos de listeriose, uma infecção grave de origem alimentar que afeta as mulheres grávidas, crianças, idosos e imunocomprometidos, com uma elevada taxa de mortalidade (20-30%).

2.2.3.2 Resistência antimicrobiana e confirmação molecular

De acordo com Schwarz et al. (2010), a resistência a três ou mais classes de agentes antimicrobianos pode ser referida como a Resistência a Múltiplas Drogas (MDR). Neste estudo, apenas um isolado de *E. coli* biótipo 1, QCE2, foi resistente a duas classes de antimicrobianos. Os demais isolados foram resistentes a três ou mais classes (Tabela 3).

Quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos chama a atenção o elevado índice de MAR dos isolados de *E. coli* biótipo 1. Entre os 11 isolados, 8 obtiveram índice MAR maior do que 0,5. O isolado QCE18 foi resistente a todos os antibióticos testados (Tabela 3). Guillen e Araque (2014) relataram 5 estirpes *E. coli* MDR isoladas a partir de produtos lácteos. Ahmed e Shimamoto (2015) destacaram em seu estudo os produtos lácteos como sendo fontes potenciais de *E. coli* O157:H7 MDR abrigando genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos.

Em relação aos isolados de *Salmonella*, 12 foram resistentes a três ou mais agentes antimicrobianos (Tabela 3). Os isolados QCS5, QCS7 e QCS9 apresentaram índice MAR superior a 0,50. Guimarães et al. (2012) relataram *Salmonella* MDR presentes em queijo de coalho comercializado na orla de Salvador (BA), Brasil.

O isolado QCL19 apresentou o maior índice MAR entre os isolados de *Listeria* spp. (Tabela 3). Apenas um isolado apresentou índice MAR abaixo de 0,50 e 6 isolados foram classificados como MDR. Esse resultado corrobora com Allen et al. (2016), que afirmou maior tolerância aos agentes antimicrobianos clinicamente relevantes deste patógeno quando oriundo de matriz alimentar. Considerando que a listeriose humana é adquirida através da transmissão predominantemente de origem alimentar e que o microrganismo é um patógeno pouco frequente, mas ligado à níveis desproporcionalmente elevados de morbidade e mortalidade em indivíduos susceptíveis, este dado é preocupante. Isolado QCSA34 *S. aureus* apresentou índice MAR 0,91 (Tabela 3). Entre os isolados, 77,8% apresentaram índice MAR superior a 0,50 e 9 isolados mostraram-se resistentes a três ou mais classes de agentes antimicrobianos. Spanu et al. (2012) encontrou em seus estudos um número elevado de isolados de *S. aureus* com fenótipo MDR. A presença de cepas resistentes aos

antimicrobianos de *S. aureus* em queijo constitui um risco potencial para a saúde pública. Além disso, no que diz respeito à vigilância sanitária, é necessário identificar os alimentos que podem representar risco para a saúde e para garantir o tratamento eficaz de infecções alimentares, a prevalência de *S. aureus*, bem como a sua resistência aos antimicrobianos. Esses resultados mostraram que o queijo de leite cru pode atuar como veículo para a transmissão de cepas resistentes aos antimicrobianos de *S. aureus*, e constituem um risco potencial para a saúde pública. Portanto, os consumidores devem evitar o consumo de queijo de leite cru.

Tabela 3. Índice de Múltipla Resistência aos Antibióticos (MAR) de patógenos isolados de queijo de cabra.

Patógenos	Número de isolados	Índice MAR										
		0.08	0,25	0.33	0,42	0,5	0.58	0,67	0,75	0.83	0.91	1
<i>E. coli</i> biótipo 1	11	0	0	2	1	0	2	0	0	3	2	1
<i>Salmonella spp.</i>	18	4	0	5	5	1	3	0	0	0	0	0
<i>Listeria spp.</i>	6	0	0	1	0	0	1	0	3	1	0	0
<i>S. aureus</i>	9	0	0	1	1	0	2	1	2	1	1	0

Os isolados com um índice igual ou superior a 0,5 e resistentes a três ou mais antimicrobianos testados foram identificados molecularmente. Assim, 5, 4, 4 e 9 isolados identificados bioquimicamente como *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* e *S. aureus*, respectivamente, foram sequenciados. Os isolados foram identificados com 99% de similaridade pelo sequenciamento do gene 16S RNAr como *E. coli* (GU594316.1/GU811877.1), *Salmonella* Typhi (DQ480723.1), *S. aureus* (NR037007.1/NR113956.1). Para o gênero *Listeria*, 2 isolados (QCL5 e QCL12) foram identificados como *L. monocytogenes* (NR044823.1) e os demais como *Listeria ivanovii* (NR036809.1) com 98 % de similaridade. *Listeria ivanovii* também é um patógeno entérico oportunista.

3.3 Inibição de *S. aureus* e valor de pH no queijo caprino artesanal

O queijo artesanal foi produzido a partir de leite de cabra com uma acidez de 18 °D e índice crioscópico de -0,553 °H. Após o tratamento térmico do leite, o patógeno *S. aureus* e BAL não foram detectados no queijo 3, o controle negativo. As BAL também não foram detectadas no queijo 1, o controle positivo (queijo inoculado com *S. aureus*). A elevada

temperatura foi utilizada no processamento térmico para eliminar a microbiota do produto, particularmente BAL autóctone, para que apenas a inoculação *dos Lactobacillus* selecionados fosse avaliada quanto a inibição de *S. aureus* patogênico em queijo de cabra artesanal.

Houve interação significativa ($P < 0,05$) nos queijos e tempo de estocagem para a enumeração de *S. aureus* (Figura 1). Ao longo do tempo, uma menor população do patógenos foi enumerado no queijo adicionado do coquetel de BAL (queijo 2). As populações de *S. aureus* diferiram entre os queijos a partir do 5º dia de armazenamento ($P < 0,05$).

No queijo 1, houve uma diminuição quadrática da população microbiana em função do tempo com a menor contagem no dia 14, a população de *S. aureus* foi de 7,78 \log_{10} UFC / g (Figura 1). Em geral, houve uma diferença de 0,44 unidades log na população inicial e final de *S. aureus* no queijo controle positivo (queijo 1). Esta pequena diminuição do controle positivo pode ter sido influenciada pela temperatura de armazenamento do produto, em conformidade com Jakobsen et al. (2011).

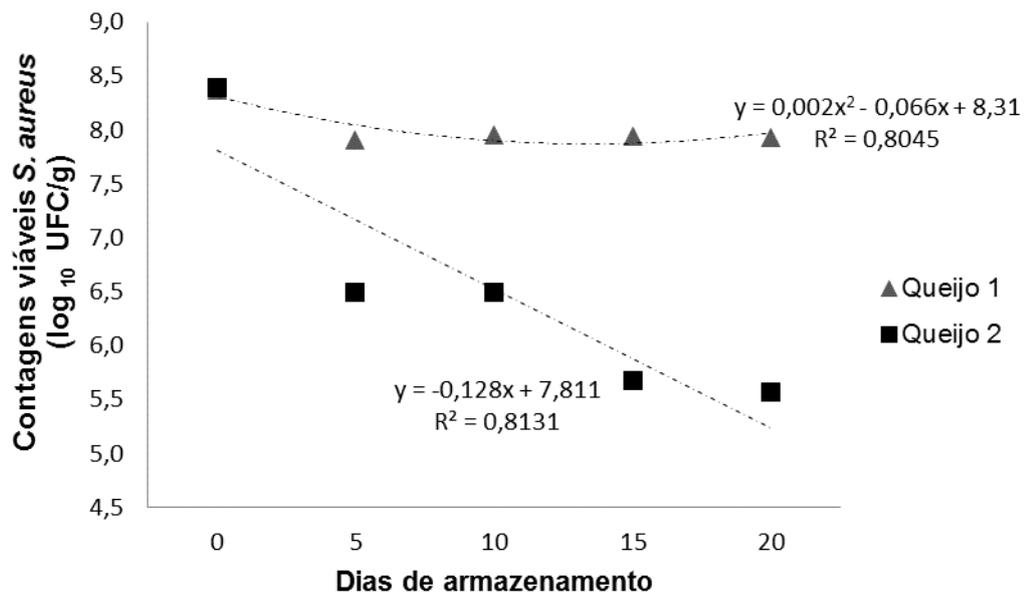


Figura 1. Contagem de *S. aureus* viáveis (\log_{10} UFC / g) em queijos sem (queijo 1) e com (queijo 2) inóculo de BAL durante o armazenamento por 20 dias a 4 °C.

No queijo 2, a população de *S. aureus* diminuiu linearmente com o tempo, especificamente, 0,128 unidades log por dia (Figura 1). Durante o período de avaliação, houve uma redução de aproximadamente 3 unidades log da população de *S. aureus*. Seridan et al. (2012) e Rolim et al. (2015) também relataram o efeito antagonista de BAL frente a *S. aureus* em queijo de coalho artesanal brasileiro. Devido ao crescente interesse sobre o

efeito antagonista de BAL frente a *S. aureus* e as fermentações na matriz alimentar serem facilmente reproduzidas e controladas em condições de laboratório, muitas hipóteses sobre mecanismos envolvem o fenômeno desta inibição bacteriana (acidificação, produção de bacteriocina, produção de H_2O_2) (Charlier et al., 2009). Delpech et al. (2015) afirmam que o crescimento do patógeno de origem alimentar *Staphylococcus aureus* pode ser inibido no leite e em queijo por cepas de *Lactobacillus* produtoras de peróxido de hidrogênio.

Em relação à população de BAL selecionadas a partir de queijo de cabra, o inóculo aumentou linearmente ao longo do tempo (0,0662 unidade log por dia), como pode ser explicada pela equação de primeiro grau na Figura 2. O inóculo de BAL permaneceu viável até o final do período de avaliação e foi eficiente na redução da população de *S. aureus* em queijo caprino. As BAL selecionadas (UNIVASF CAP) e *S. aureus* foram originados a partir de queijo de cabra. Os nossos isolados UNIVASF CAP inibiram *S. aureus* (isolado MDR) tanto *in vitro* como no produto. O mesmo resultado foi mostrado por Guedes Neto et al (2005) que reportaram o sucesso de BAL selecionadas contra *Staphylococcus*, ambos micro-organismos também isolados a partir do queijo.

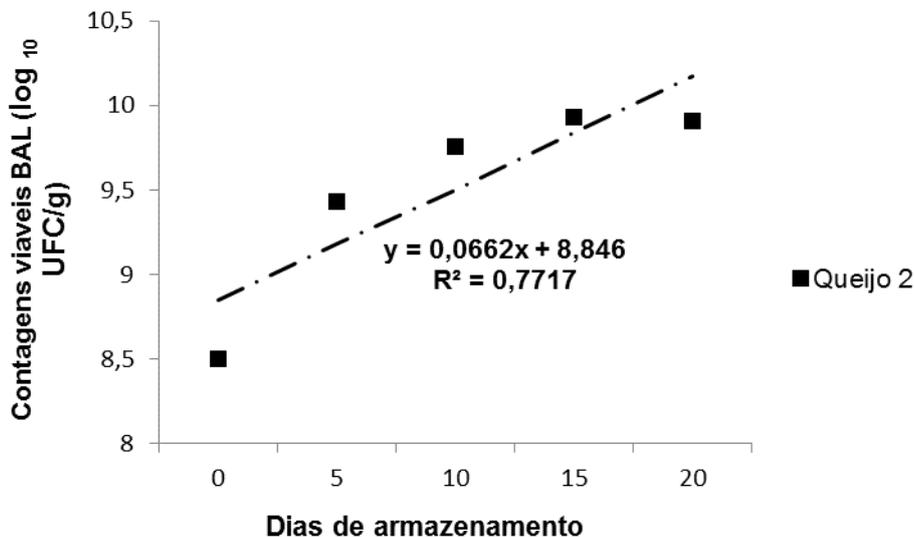


Figura 2. Contagem de BAL viáveis (\log_{10} UFC / g) do inóculo de UNIVASF CAP no queijo (queijo 2) durante o armazenamento por 20 dias a 4 °C.

Vale ressaltar, que a presença de BAL também contribui essencialmente para o sabor, textura e valor nutricional dos queijos (FAVARO et al., 2014). Neste estudo foi relatada a média de 5.085 \log_{10} UFC / g de *Staphylococcus spp.* em queijo de cabra comercializado na região semiárida, portanto, a adição do inóculo de BAL poderia ser uma

opção para que o produto atenda a legislação brasileira, ou seja, que não tenha população suficiente do agente patogênico para produzir enterotoxina.

Houve uma correlação significativa ($P < 0,05$) entre o pH e o tempo de avaliação dos queijos (Figura 3). Onde, no queijo 1, o pH seguiu uma equação quadrática (Figura 3), alcançando maior valor c no dia 12 (6,77), seguido por uma redução mínima ao fim do período de avaliação. Já no queijo 2, o valor do pH diminuiu linearmente ao longo do tempo em 0,052 unidades por dia. Embora o *S. aureus* possua proteases bacterianas que induzem degradação proteolítica, gerando radicais alcalinos (aminas e amônia), a produção de ácidos orgânicos liberados pelos isolados UNIVASF CAP neste estudo contribuiu de forma eficaz para a diminuição do pH.

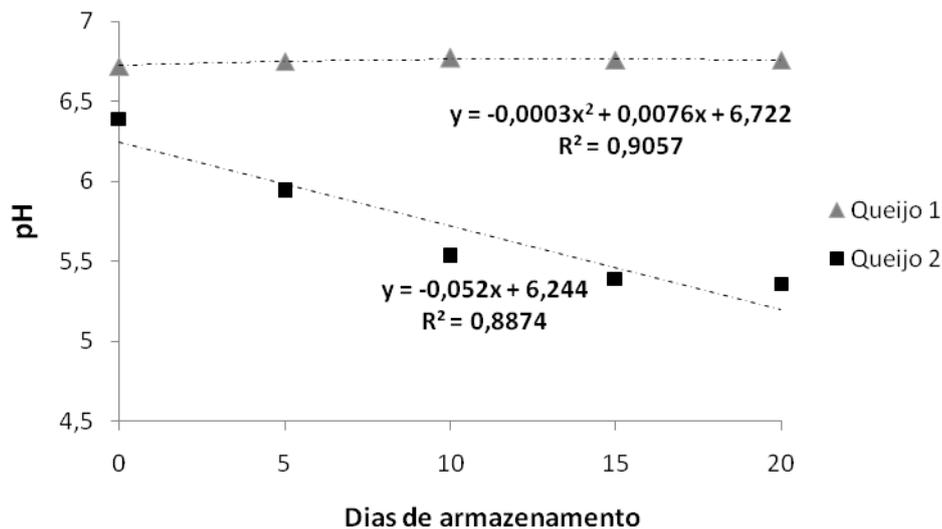


Figura 3. Valores de pH nos queijos sem (queijo 1) e com (queijo 2) inóculo de BAL durante o armazenamento por 20 dias a 4 °C.

2.4. Conclusão

Os queijos comercializados na região semiárida nordestina são veículos de patógenos. Estirpes MDR de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi* e *Listeria monocytogenes e inovanii* circulam no produto. O patógeno mais comumente encontrado em queijo de cabra foi *Staphylococcus*. No entanto, este estudo demonstrou que os isolados UNIVASF CAP autóctones selecionados de queijo caprino foi capaz de reduzir em aproximadamente 3 unidades log do patógeno MDR *S. aureus* isolado também do produto. Assim, o inóculo BAL selecionado pode ser uma opção para os pequenos agricultores

produzirem queijos com maior qualidade microbiológica, conjuntamente aliado às boas práticas agrícolas.

2.2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, K. J., WALECKA-ZACHARSKA, E., CHEN, J. C. et al. *Listeria monocytogenes* e An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v. 54, n.1, p. 178-189, ago. 2016.
- ALMEIDA, G., MAGALHÃES, R., CARNEIRO, L. et al. Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n.3, p. 303-309, nov. 2013.
- ALMEIDA JÚNIOR, W. L. DE G. et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, 2015. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.01.013
- ANDERSON, J. M., BAIRD-PARKER, A. C. A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype I in food. **Journal Applied Bacteriology**, v. 39, n. 1, p. 7-111, 1975.
- ASHRAF, M., AHMED, A., SHIMAMOTO, T. Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.193, n.1, p. 68–73, mai.2015.
- BASANISI, M.G., NOBILI, G., LA BELLA, G. et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. **Small Ruminant Research**. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.024>
- BRASIL.Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n. 46, de 10 de fevereiro de 1998. Institui o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle: APPCC a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 fev. 1998. Seção 1.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 25 de Junho de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo Coalho e Queijo de Manteiga, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Seção 1, p. 10, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 6, 05 abril de 2003. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013. Dispõem sobre queijos artesanais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 19, 08 de agosto de 2013. Seção 1.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. Programa de Aquisição de Alimentos. Disponível em: <<http://www.mds.gov.br/segurancaalimentar/aquisicao-e-comercializacao-da-agricultura-familiar/entenda-o-paa/modalidades-1/compra-institucional>>.

BRASIL, Anvisa - Agência Nacional De Vigilância Sanitária., p. 48, 2000. Instrução Normativa RESOLUÇÃO - RDC Nº 12, DE 2 DE JANEIRO DE 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES.

BERNINI, V. et al. A multi-sampling approach to evaluate an infrared surface treatment for reducing *Listeria monocytogenes* contamination on whole Gorgonzola cheese rinds. **Food Control**, v. 55, n.1, p. 75–81, set. 2015.

BEZERRA, T. K. A. et al. Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 196, n.3, p. 359–366, abr. 2016.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; PRIETO, M. et al. Comparison of PALCAM and modified Oxford plating media for isolation of *Listeria* species in poultry meat following UVMII or Fraser secondary enrichment broths. **Food Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 555-563, 2001.

CARTAXO, F.Q., LEITE, M. L. M. V., SOUSA, W. et al. Desempenho bioeconômico de cabritos de diferentes grupos genéticos terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 14,n.1, p. 224-232, 2013.

CAVALCANTE, J. F. M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 205–214, mar. 2007.

CHARLIER, C., CRETENET, M., EVEN, S. et al. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n.4, p. 30-39, dez. 2009.

DELPECH, P., BORNES, S., ALATERRE, E. et al. *Staphylococcus aureus* transcriptomic response to inhibition by H₂O₂ – producing *Lactococcus garvieae*. **Food Microbiology**, v. 51, n.1, p. 163 e 170, mai. 2015.

DIAS, F. S., RAMOS, C. L., SCHWAN, R. F. Characterization of spoilage bacteria in pork sausage by PCR-DGGE analysis. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 468-474, mai. 2013.

EUTHIER, S. M. F., TRIGUEIRO, I. N. S., RIVERA, F. Condições higiênico-sanitárias do queijo de leite de cabra “tipo coalho”, artesanal elaborado no Curimataú Paraibano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, 1998.

EL GALIOU, O. et al. Chemical and microbiological characteristics of traditional homemade fresh goat cheeses from Northern Morocco. **Small Ruminant Research**, v. 129,n.1, p. 108–113, ago. 2015.

FAVARO, L., BASAGLIA, M., CASELLA, S. et al. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. **Food Microbiology**, v. 38, n.1, p. 228-239, abr. 2014.

- FAVARO, L.; BARRETTO PENNA, A. L.; TODOROV, S. D. Bacteriocinogenic LAB from cheeses – Application in biopreservation? **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 37–48, jan. 2015.
- GUEDES NETO, L. G. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n.1, p. 245–250, set. 2005.
- GUILLÉN, L.; MILLÁN, B.; ARAQUE, M. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. **Infectio**, v. 18, n. 3, p. 100–108, 2014.
- GUIMARÃES, A. G. et al. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho Profile of susceptibility of bacteria , isolated from curdle cheese. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 259–265, 2012.
- HANON, J., JASPERSB, S., BUTAYEA, P. et al. A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from several livestock species in Belgium. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 122, p. 443-452, dez. 2015.
- IDF (**International Dairy Federation**). Milk and milk products – Guidance on methods of sampling. Standard 50C. Brussels, Belgium. 1995.
- JAKOBSEN, R. A., HEGGEB, R., SUNDE, E. B. et al. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. **Food Microbiology**, v. 28,n.3, p. 492- 496, mai. 2011.
- KOUSTA, M. et al. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 805–815, nov. 2010.
- MEDINA, R. B., OLISZEWSKI, R., ABEIJÓN MUKDSI, M. C. et al. Sheep and goat’s dairy products from South America: Microbiota and its metabolic activity. **Small Ruminant Research**, v. 101, n.1-3, p. 84– 91, nov 2011.
- MELO, J., ANDREW, P. W., FALEIRO, M. L. et al. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: the role of stress responses. **Food Research International**, v.67, n.1, p 75-90, jan. 2015.
- NORMANNO,G., LA SALANDRA, G., DAMBROSIO, A. et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal Food Microbiology**, v.115, n.1, p. 290-296, mai.2007.
- OLAERTE, C., SANZ, S., GONZÁLEZ-FANDOS, E. et al. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat’s cheese (Cameroscheese). **Journal Applied Microbiology**, v.88, n.3, p. 421-429, mar. 2000.
- OLARTE, C., GONZÁLEZ- FANDOS, E., GIMÉNEZ, M. S. et al. The growth of *Listeria monocytogenes* in fresh goat cheese (Cameros cheese) packaged undermodiced atmospheres. **Food Microbiology**, v.19, p. 75 – 82, fev.2002.
- OLIVEIRA, C.J.B., HISRICH, E.R., MOURA, J.F.P. et al. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 98, p. 64–69, jun. 2011.

PARK, Y. W., JUÁREZ, M., RAMOS, M. et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68,n. 1, p. 88 e 117, mar. 2007.

PIGNATO, S.; MARINO, A. M.; EMANUELE, M. C. et al. Evaluation of New Culture Media for Rapid Detection and Isolation of Salmonellae in Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.5, p. 1996–1999, out. 1995.

PICOLI, S. U., BESSA, M. C., CASTAGNA, S. M. F. et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p.64-69, jan. 2006.

PICON, A., GARDE, S., AVILA, M. et al. Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses, **International Dairy Journal**, v. 28, n. 1,p. 1-9, out. 2015.

PSONI, L., TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. **Food Microbiology**, v. 20, n.5,p. 575-582, out. 2003.

QUEIROGA, R. DE C. R. DO E. et al. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 538–544, mar. 2013.

ROLIM, F. R. L. et al. 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**, v. 63, n. 2, p. 807–813, out. 2015.

SILVA, G. S. DA; et al. Microbiological and physical-chemical profile of goat milk in the semiarid region of the San Francisco Valley. **Veterinária Notícias**, v. 19, n. 1983-0777, p. 14–22, 2013.

SCHWARZ, S., SILLEY, P., SIMJEE, S. et al. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 601-604, fev. 2010.

SENA M. J., CERQUEIRA, M. M. O. P., LEOCADIO FILHO G. et al. Salmonellas isoladas de queijo tipo “coalho”: caracterização sorológica e resistência a agentes antimicrobianos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, p.7-13, abr. 1999.

SERIDAN, B., SOUZA, M. R., NICOLI, J. R. et al. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64,n. 2, p. 465-470, set. 2012.

SOUSA, W. H. et al. Genetic improvement of goats in Brazil: Experiences, challenges and needs. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 147–156, jun. 2011.

SPANU, V., SPANU, C., VIRDIS, S. et al. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, p. 53–57,fev. 2012.

- TAMAGNINI, L. M., SOUSA, G. B. de, GONZÁLEZ, R. D. et al. Behavior of *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 129-134, mar. 2005.
- TAMAGNINI, L. M., DE SOUSA, G. B., GONZÁLEZ, R. D. et al. Behavior of *Enterobacter amnigenus* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese: Influence of fluctuating storage temperature. **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 177–182, mai.2008.
- TERZIC-VIDOJEVIC, A., TOLINACKI, M., NIKOLIC, M. et al. Artisanal Vlasina raw goat's milk cheese: evaluation and selection of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures. **Food Technology Biotechnology**, v. 51, p. 554-563, jan. 2013.
- TEKINŞEN, K. K.; ÖZDEMİR, Z. Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlu (Herb) cheese. **Food Control**, v. 17, n. 9, p. 707–711, set.2006.
- VERNOZY-ROZAND, C., MAZUY-CRUCHAUDET, C., BAVAI, C. et al. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, n.15, p. 83– 88, ago. 2005.
- WANG, X., HARUTA, S., WANG, P. et al. Diversity stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. **FEM Microbiological Letters**, v. 57, n.1,p. 106–115, jul.2006.
- YOON, Y., Lee, S., Choi, K. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, n.1, p. 201 e 215, fev. 2016.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do estudo realizado foram detectados micro-organismos patogênicos no queijo coalho produzido artesanalmente, e estes, confirmados para resistência a múltiplas drogas.

A caracterização microbiológica de queijo coalho artesanal para a região é de fundamental importância pois contribui para uma maior qualidade microbiológica e tecnológica do produto, uma vez que existe a possibilidade de registro de Indicação Geográfica tornando formal a comercialização do queijo típico regional e contribuindo para o turismo gastronômico.

Boas práticas de fabricação, pasteurização do leite e o uso de biotecnologias com a adição de cultivos de bactérias do ácido láctico podem assegurar melhor qualidade microbiológica e tecnológica ao queijo coalho de cabra.

