

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**MICROBIOLOGIA DO QUEIJO ARTESANAL
PRODUZIDO NA REGIÃO DE ÉVORA**

Maria Eduarda Marques Madeira da Silva Potes

**ÉVORA
2000**

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**MICROBIOLOGIA DO QUEIJO ARTESANAL
PRODUZIDO NA REGIÃO DE ÉVORA**



120928

Dissertação apresentada à Universidade de
Évora para obtenção do grau de Doutor em
Higiene e Sanidade Animal

Maria Eduarda Marques Madeira da Silva Potes

**ÉVORA
2000**

ÍNDICE

| | |
|-----------------------|------|
| Índice | i |
| Índice de Figuras | iii |
| Índice de Quadros | iv |
| Índice de Gráficos | vii |
| Índice de Fotografias | viii |
| Lista de Abreviaturas | ix |
| Resumo | xi |

PARTE I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO I

| | |
|-----------------------|----|
| Perspectiva Histórica | 1 |
| A Alquimia do Queijo | 11 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|-----|
| Microbiologia do Leite | 28 |
| Principais grupos microbianos presentes no leite | 33 |
| Bactérias lácticas | 33 |
| Micrococáceas | 48 |
| Enterobacteriáceas | 53 |
| Leveduras e bolores | 54 |
| Microrganismos responsáveis por alterações de origem alimentar | 58 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 60 |
| <i>Brucella spp.</i> | 63 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 67 |
| <i>Salmonella spp.</i> | 79 |
| Microbiologia do Queijo | 86 |
| Principais grupos microbianos presentes do queijo | 91 |
| Bactérias lácticas | 91 |
| Micrococáceas | 130 |
| Enterobacteriáceas | 133 |
| Leveduras e Bolores | 136 |
| Microrganismos responsáveis por alterações de origem alimentar | 141 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 142 |
| <i>Brucella spp.</i> | 146 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 146 |
| <i>Salmonella spp.</i> | 152 |

PARTE II - TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III

| | |
|---|-----|
| Variabilidade Microbiológica do Queijo Artesanal Produzido na Região de Évora, ao Longo do Processo de Maturação | 156 |
|---|-----|

CAPÍTULO IV

| | |
|---|-----|
| Identificação de Bactérias Lácticas Presentes no Queijo Artesanal Produzido na Região de Évora | 171 |
|---|-----|

CAPÍTULO V

| | |
|---|-----|
| Viabilidade de Agentes Patogénicos (<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A e <i>Salmonella Enteritidis</i>) no Queijo, ao Longo do Processo de Maturação | 202 |
|---|-----|

CAPÍTULO VI

| | |
|---|-----|
| Inibição de <i>Listeria Monocytogenes</i> e <i>Salmonella Enteritidis</i> por Bactérias Lácticas | 223 |
|---|-----|

CAPÍTULO VII

| | |
|-------------------|-----|
| Conclusões Gerais | 238 |
|-------------------|-----|

| | |
|-----------------------------------|-----|
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 241 |
|-----------------------------------|-----|

ANEXOS

| | |
|----------------|-----|
| ANEXO I | 271 |
|----------------|-----|

| | |
|-----------------|-----|
| ANEXO II | 281 |
|-----------------|-----|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| FIGURA II-1 - Metabolismo da Lactose pelos Lactococos, <i>Leuconostoc</i> e Culturas Termófilas. | 95 |
| FIGURA II-2 - Vias Metabólicas Alternativas para a Utilização do Ácido Pirúvico. | 106 |
| FIGURA II-3 - Modelo Esquemático do Sistema Proteolítico dos Lactococos. | 116 |
| FIGURA II-4 - Transformação dos Ácidos Gordos por β -oxidação. | 139 |
| FIGURA IV-1 - Dendrograma Obtido por UPGMA Utilizando o Coeficiente Jaccard a partir de 30 Testes de Utilização de Fontes de Carbono Realizados às Estirpes de Bactérias Lácticas Pertencentes ao Género <i>Enterococcus</i> . | 184 |

ÍNDICE DE QUADROS

| | |
|--|-----|
| QUADRO I-1 - Composição Química Média do Leite Proveniente de Algumas Espécies Produtoras mais Comummente Utilizadas na Alimentação Humana. (g/100g) | 17 |
| QUADRO I-2 - Composição Química Média de Diferentes Variedades de Queijo Fabricadas a partir de Leite de Vaca, Ovelha e Cabra, respectivamente. (g/100g) | 18 |
| QUADRO II-1 - Características Fenotípicas de Alguns Géneros de Bactérias Lácticas. | 40 |
| QUADRO II-2 - Características Fenotípicas das Espécies Representativas dos Diferentes Grupos de <i>Lactobacillus</i> . | 41 |
| QUADRO III-1 - Contagens dos Diferentes Grupos Microbianos Presentes no Leite, Coalhada e Queijos com Diferentes Idades de Maturação, Fabricados em Três Anos Consecutivos, Durante a Época de Primavera. (médias \pm desvios padrão de quatro e seis semanas, respectivamente no primeiro e nos segundo e terceiro anos, em log ufc/ml ou log ufc/g). | 160 |
| QUADRO III-2 - Contagens dos Diferentes Grupos Microbianos Presentes no Leite, Coalhada e Queijos com Diferentes Idades de Maturação, Fabricados em Três Anos Consecutivos, Durante a Época de Inverno. (médias \pm desvios padrão de quatro semanas, em log ufc/ml ou log ufc/g). | 165 |
| QUADRO III-3 - Contagens dos Diferentes Grupos Microbianos Presentes no Leite, Coalhada e Queijos com Diferentes Idades de Maturação, Fabricados Durante a Época de Primavera. (médias \pm desvios padrão de seis semanas, em log ufc/ml ou log ufc/g). | 167 |
| QUADRO IV-1 - Estirpes Isoladas de Queijos com 3 e 45 Dias de Maturação. | 177 |

| | |
|--|-----|
| QUADRO IV-2 - Estirpes Lácticas Identificadas a Partir das Estirpes Isoladas de Queijos com 3 e 45 Dias de Maturação. | 177 |
| QUADRO IV-3 - Distribuição das Estirpes Isoladas pelos Diferentes Meios de Cultura, em Condições de Aerobiose, Provenientes de Queijos com 3 e 45 Dias de Maturação | 179 |
| QUADRO IV-4 - Distribuição das Estirpes Isoladas pelos Diferentes Meios de Cultura, em Condições de Anaerobiose, Provenientes de Queijos com 3 e 45 Dias de Maturação | 180 |
| QUADRO IV-5 - Distribuição por Géneros das Estirpes de Bactérias Lácticas Isoladas de Queijos nas Duas Fases de Maturação Consideradas (3 e 45 dias). | 181 |
| QUADRO IV-6 - Frequência de Isolamento das Espécies de <i>Enterococcus</i> Isoladas de Queijos com 3 e 45 Dias de Maturação. | 190 |
| QUADRO IV-7 - Distribuição dos Diferentes Géneros de Bactérias Lácticas Provenientes de Queijos com 3 Dias de Maturação, pelos Diferentes Meios de Cultura Utilizados para o seu Isolamento | 198 |
| QUADRO IV-8 - Distribuição dos Diferentes Géneros de Bactérias Lácticas Provenientes de Queijos com 45 Dias de Maturação, pelos Diferentes Meios de Cultura Utilizados para o seu Isolamento | 199 |
| QUADRO V-1 - Valores Médios de pH Medidos, ao Longo da Maturação, nas Amostras de Coalhada e Queijos Inoculados com <i>Listeria monocytogenes</i> . | 213 |
| QUADRO V-2 - Valores Médios de pH Medidos, ao Longo da Maturação, nas Amostras de Coalhada e Queijos Inoculados com <i>Salmonella</i> Enteritidis. | 219 |
| QUADRO VI-1 - Tipos de Antagonismo Evidenciados pelas Bactérias Lácticas em Relação a <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A e a <i>Salmonella</i> Enteritidis, após 24 e 48 horas de Incubação. | 230 |

| | |
|---|------------|
| QUADRO VI-2 - Distribuição dos Diferentes Tipos de Antagonismo Evidenciado pelas Estirpes de Bactérias Lácticas sobre <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A. | 233 |
| QUADRO VI-3 - Distribuição dos Diferentes Tipos de Antagonismo Evidenciado pelas Estirpes de Bactérias Lácticas sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis. | 234 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|-----|
| GRÁFICO III-1 - Evolução dos Diferentes Grupos Microbianos Presentes no Queijo Durante a Maturação na Época de Inverno. | 166 |
| GRÁFICO III-2 - Evolução dos Diferentes Grupos Microbianos Presentes no Queijo Durante a Maturação na Época de Primavera | 168 |
| GRÁFICO V-1 - Evolução de <i>Listeria monocytogenes</i> e das Bactérias Lácticas Presentes no Queijo Durante a Maturação. | 212 |
| GRÁFICO V-2 - Evolução de <i>Salmonella</i> Enteritidis e das Bactérias Lácticas Presentes no Queijo Durante a Maturação. | 218 |

ÍNDICE DE FOTOGRAFIAS

| | |
|--|-----|
| FOTO I-1 - “Coadora”. Dispositivo Utilizado para a Filtração do Leite na Queijaria. | 23 |
| FOTO I-2 - Flor de Cardo. | 24 |
| FOTO I-3 - Esmiuçamento da Massa da Coalhada e Encinchamento. | 25 |
| FOTO I-4 - Salga do Queijo. | 25 |
| FOTO I-5 - Queijos Produzidos Artesanalmente na Região de Évora. | 26 |
| FOTO VI-1 - Inibigrama de Selecção | 225 |
| FOTO VI-2 - Determinação do Mecanismo de Acção Inibitória | 227 |

LISTA DE ABREVIATURAS

β gal - β -galactosidase
6PG/PK - Via 6-fosfogluconato-fosfocetolase
AcO - Efeito dos ácidos orgânicos
AcO + H₂O₂ - Efeito associado dos ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogénio
a_w - actividade da água
BL - Bactérias lácticas
Br. - *Brucella*
BVT - Bactérias viáveis totais
C. - *Candida*
cit⁺ - citrato positivo
Colif. - coliformes
D. - *Debaryomyces*
DHAP - dihidroxiacetona fosfato
DTA - Dextrose Triptona Agar
DTA-F - Dextrose Triptona Agar incubado a 10°C durante 7 dias.
Ent. - *Enterococcus*
Entb - Enterobactérias
FDP - Frutose 1,6-Difosfato
GAP - gliceraldeído 3 fosfato
GK - galactoquinase
HTST - High Temperature Short Time
K. - *Kluyveromyces*
KA₃ - Kanamicina Azida de Sódio Esculina Agar
L. - *Listeria*
Lb. - *Lactobacillus*
Lc. - *Lactococcus*
LDH - Lactato Desidrogenase
Lev - Leveduras
Lm - *Listeria monocytogenes*
Ln. - *Leuconostoc*
LP - Lactoperoxidase
Mc. - *Micrococcus*
m-DAP - Ácido meso-diaminopimélico
MHA - Mueller Hinton Agar
MRS - de Man, Rogosa e Sharpe

ND - Não Determinado
NI - Não Identificado
P. - *Pediococcus*
p β gal - fosfo- β -galactosidase
PCA - Plate Count Agar
PDH - Piruvato Desidrogenase
PFL - Piruvato Formato Liase
Pi - Fosfato Inorgânico
PMF - Força Protão Motriz
PO - Piruvato Oxidase
Ps. - *Pseudomonas*
PTS/PEP - Sistema da fosfotransferase dependente do fosfofenolpiruvato
rRNA 16S - fragmento de RNA ribossômico com coeficiente de sedimentação 16 Svedberg.
SE - *Salmonella* Enteritidis
séc. - século
SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SLP - Sistema da Lactoperoxidase-Tiocianato-Peróxido de Hidrogénio
Staph. - *Staphylococcus*
Strep. - *Streptococcus*
SuspBact - Efeito da Suspensão bacteriana
TNase - Termonuclease
TPP - Tiaminapirófosfato
TSYE - Tryptone Soya Yeast Extract Broth
ufc - unidade formadora de colónia
UPGMA - Unweighted Pair-group Arithmetic Average Clustering
VIH - Virus da Imunodeficiência Humana
VP - Teste de Voges-Proskauer
W. - *Weissella*

RESUMO

O queijo artesanal produzido na região de Évora é um queijo curado, de pasta dura ou semi-dura, fabricado com leite cru de ovelha, segundo técnicas artesanais. É um queijo pequeno com cerca de 60 a 90 g de peso e forma cilíndrica achatada com cerca de 6 cm de diâmetro e 2 a 3 cm de altura, ou com peso entre 120 a 200 g ou 200 a 300 g, com a mesma forma cilíndrica achatada mas diâmetro maior sendo, então, designado por merendeira. A época da sua produção inicia-se em Dezembro e decorre até Maio/Junho.

As análises microbiológicas realizadas ao leite destinado ao fabrico deste queijo revelaram a presença de elevados teores microbianos, nomeadamente enterobactérias e coliformes (entre 3 e 4,5 log ufc/ml).

O diferente comportamento dos vários grupos microbianos ao longo da maturação evidencia a existência de duas épocas de produção do queijo de Évora. A população láctica atinge, precocemente, valores mais elevados na Primavera (8,92 log ufc/g aos 7 dias de maturação), enquanto que no Inverno os valores máximos são menores e atingidos apenas no final da maturação (8,10 log ufc/g aos 60 dias). Também as enterobactérias e os coliformes revelaram um comportamento diferente nas duas épocas de fabrico, observando-se um decréscimo, ao longo da maturação, que era mais acentuado na época de Primavera que na época de Inverno. A população de leveduras, apresentando essencialmente actividade lipolítica, desempenha, provavelmente, um papel importante na maturação do queijo, que em condições normais é caracterizada por uma intensa lipólise.

De entre as bactérias lácticas presentes neste queijo, os géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus*, representados por estirpes que revelaram características próprias, constituem cerca de 95% da flora láctica natural. *Ent. faecium* foi a espécie predominante, sendo também numerosa a população de *Ent. faecalis* e do complexo *Ent. hirae/Ent. durans*. *Lb.*

paracasei subsp. *paracasei*, *Lb. casei* e *Lc. lactis* estão também presentes em populações numerosas, sendo o género *Lactobacillus* mais frequente no final da maturação, ao contrário do que sucede com o género *Lactococcus*.

Nas amostras analisadas não foram detectadas, entre outros microrganismos indesejáveis, *Listeria monocytogenes* nem *Salmonella* spp. O estudo da sua viabilidade ao longo da maturação indica que, provavelmente, as características físico-químicas do produto aliadas à actividade metabólica da população láctica presente em números elevados contribuem para o declínio daqueles microrganismos, caso sejam submetidos às condições em que normalmente decorre a maturação.

Entre os mecanismos antagonistas desenvolvidos pelas espécies de bactérias lácticas presentes no queijo, verificou-se que o efeito associado das diversas substâncias produzidas pelo metabolismo dessas bactérias constitui o principal mecanismo inibitório. Também é expressiva actividade inibitória desenvolvida pela suspensão bacteriana embora tenha sido escassa a actividade inibitória devida exclusivamente quer à produção de ácidos orgânicos quer à produção de peróxido de hidrogénio.

AGRADECIMENTOS

Ao terminar a redacção desta dissertação não posso deixar de recordar e agradecer a colaboração, o apoio e a solidariedade manifestada por colegas e amigos ao longo da realização do trabalho que a suporta e da sua redacção.

Ao Sr. Prof. Artur Marinho agradeço reconhecidamente a disponibilidade que demonstrou ao aceitar ser o orientador desta dissertação, bem como as sugestões e críticas que foi fazendo e que valorizaram este trabalho. Recordo também a paciência com que me apoiou quando tudo levava a crer que não havia final à vista.

Ao Sr. Prof. Vítor Caeiro, meu orientador pedagógico, agradeço a simpatia e amizade com que me distinguiu desde que iniciei a minha actividade na Universidade de Évora e o incentivo e alento que, da forma bem-humorada que o caracteriza, sempre me ofereceu.

À Sra Prof. Ivone Clara devo agradecer as facilidades que me concedeu, enquanto Presidente do Conselho do Departamento de Sanidade Animal, que se revelaram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À minha colega Cristina Queiroga, uma grande Amiga, agradeço as inúmeras ajudas concedidas, facilitando a minha actividade docente e, como é próprio de uma Amiga, resolvendo alguns “dramas de logística familiar”.

À minha colega Cristina Pinheiro devo agradecer as ideias, as sugestões e as discussões que fomos mantendo ao longo da realização deste trabalho.

À Sra Doutora Teresa Crespo e à sua equipa do IBET/ITQB, nas pessoas das Sras Dras Cristina Pereira, Fátima Silva e Fernanda Rodrigues, manifesto o meu apreço pelos ensinamentos que me transmitiram e pela enorme simpatia e espírito de colaboração com que sempre me receberam no seu laboratório.

Ao Sr. Prof. Doutor Fernando Bernardo agradeço a cedência das estirpes de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* Enteritidis sem as quais parte deste trabalho não teria sido realizada.

Aos alunos estagiários, nomeadamente à Teresa Matos, à Carla Reis, à Paula Casaca, ao Pedro Fonseca, à Ana Margarida Cardoso, à Matilde Belo, à Manuela Guerra, à Marta Pereira, à Vanda, à Sofia Rosa e à Susana Dias, agradeço a colaboração nalguns trabalhos preliminares, geralmente duros, discretos mas imprescindíveis.

Devo um agradecimento especial à Ana Paula Saraiva, que entretanto se tornou Técnica Superior do Departamento de Sanidade Animal e Vegetal, pela sua inestimável ajuda na realização de algumas análises que passaram a ser rotina no nosso laboratório.

À Guilhermina Pias, Técnica de Laboratório no Departamento de Sanidade Animal e Vegetal, agradeço a preciosa colaboração na preparação e manutenção de material, tarefas árduas em trabalhos de Microbiologia.

À Susana Rodrigues agradeço a prontidão que dispunha sempre que foram necessárias aquelas fotografias urgentíssimas!

Por fim, agradeço profundamente à minha Mãe a disponibilidade, o ânimo e a força que me dispensou em todos os momentos em que parecia que o Mundo ia acabar... Além disso, as fotografias do cardo estão lindíssimas! Foi difícil escolher a mais bonita.

À minha irmã Teresa agradeço o desembaraço com que me resolveu um bocado problema gráfico que eu teria levado meses a solucionar.

Ao Zé agradeço a paciência e a resignação com que aturou o mau humor e a coragem com que foi capaz de manter a benevolência nos momentos mais complicados.

À Madalena agradeço a compreensão que manifestou quando o tempo escasseava e não era possível dedicar-lhe a atenção que a sua idade exigia. Foi por ela que a palavra “desistir” foi eliminada do vocabulário da Mãe.

PARTE I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO I

PERSPECTIVA HISTÓRICA

Embora se assuma que o queijo é originário do Próximo-Oriente, não são conhecidos nem o seu autor nem a data da sua criação. Contudo, a história do queijo é frequentemente associada à história da domesticação dos animais e da pecuária e a descobertas tecnológicas importantes feitas pelo Homem.

Além da salga, da secagem, da fumagem, da conservação em azeite, da transformação em vinho etc., a transformação do leite noutros produtos foi das primeiras técnicas de conservação de alimentos descobertas pelo Homem (Jay, 1991). Os principais constituintes do leite eram convertidos em queijo, criando-se um novo alimento, de maior estabilidade de armazenamento e facilidade de transporte (Fox, 1993).

Por volta do ano 5 000 a.C., o Homem dispunha dos elementos necessários à produção de leite e ao fabrico de lacticínios - animais domesticados e potes de cerâmica. Foram encontrados, na Grécia e em Creta, coadores de cerâmica, remontando ao Neolítico e à Idade do Bronze, que provam que o fabrico do queijo era já conhecido nessas épocas (Brothwell e Brothwell, 1969). Há 4 000 anos, os dinamarqueses eram já grandes consumidores de

leite. Não fabricavam queijo, no sentido em que o entendemos hoje, utilizando coagulante, mas sujeitavam o leite ao início de uma transformação, deixando-o fermentar. Igualmente, os povos de origem germânica que inicialmente ocuparam a Holanda também conheciam o queijo na sua concepção mais simples: leite ácido e queijo branco. Na Europa, os cinchos, atestando indubitavelmente o fabrico de queijo, datam do ano 2 800 a.C. e foram encontrados em França (Borgonha), Itália (Lombardia) e também na Holanda, em vestígios de habitats pré-romanos (Nantet, 1994).

No Antigo Egipto, o queijo era um alimento digno de faraós, figurando entre os ingredientes depositados nas suas tumbas. Na Grécia, era partilhado por mortais e pelos deuses da Antiguidade, acreditando-se, hoje em dia, que o fabrico do queijo Feta remonta a essa época (Nantet, 1994).

Para os antigos Romanos, o queijo, além de constituir um alimento quotidiano do povo, era utilizado com finalidades terapêuticas, recomendado contra perturbações digestivas, frequentes então nesse povo. Da ração quotidiana dos legionários romanos fazia parte o queijo, principalmente de pasta dura, como o Parmesão e o Pecorino, que se conservavam facilmente e suportavam as grandes viagens a que deviam ser submetidos ao atravessarem o extenso Império Romano. Este hábito facilitou a divulgação do consumo de queijo através do mundo então conhecido (Fox, 1993; Nantet, 1994).

Os legionários romanos desmobilizados, que ocuparam as terras conquistadas, ensinaram às populações locais que a melhor forma de conservar o leite consistia em transformá-lo em queijo, particularmente de pasta dura. Alguns povos adoptaram este tipo de pastas duras mas outros mantiveram-se fiéis aos produtos frescos ou pouco curados (Gales, Escócia, Irlanda) (Nantet, 1994).

Em Portugal, a divulgação das técnicas de fabrico do queijo data da época das invasões e da ocupação da Península pelos romanos. A partir dos

Montes Hermínios, onde adquiriram características locais, estas técnicas espalharam-se, através das migrações periódicas da transumância dos efectivos, pelas regiões de Castelo Branco e Alentejo (Antunes e Santos 1943). Contudo, também se suspeita que o fabrico do queijo Serpa tenha sido iniciado no tempo em que os mouros ocuparam a região, suportando tal tese o facto de alguma da terminologia ligada ao maneio dos animais e ao fabrico do queijo e ainda em uso na zona ser de origem árabe (Oliveira, 1994).

De facto, segundo o Conde de Ficalho (1979), o pastor alentejano, além de utilizar para com os seus animais práticas de maneio muito semelhantes às que eram utilizadas pelos árabes, inclui, no seu vocabulário, termos de indiscutível origem árabe. Entre outros, apenas referimos aqueles mais directamente relacionados com o fabrico do queijo, como alavão, cuja origem é *al-habban* que significa leite e que é o nome dado ao rebanho que dá leite: “O rebanho começa a chamar-se alavão no dia em que os borregos se apartam e deixa de se chamar alavão no dia em que a ordenha cessa”. Almece é, segundo o mesmo autor, árabe puro, uma vez que chegou sem alterações à linguagem de hoje. Os árabes do Oriente e do deserto chamavam *al-mecl* ao soro de leite, mas os do ocidente de África, com uma pronúncia menos correcta, diziam *al-meic*.

Depois da queda do Império Romano (séc. V) e até ao séc. XIX, estabeleceu-se uma economia fechada. Os estados feudais, como comunidades fechadas que eram, foram obrigados a conservar o excesso de alimento produzido no Verão para utilização no Inverno, sendo o queijo um representante destes alimentos conservados (Fox, 1993).

No início da Idade Média, na Holanda, os queijos de pasta prensada do género Gouda e Edam eram um elemento importante na economia do país e os impostos obtidos com a sua venda revertiam a favor das finanças locais (Nantet, 1994).

Na Idade Média, os principais agentes de divulgação das técnicas de fabrico do queijo foram os monges que, da mesma forma que contribuíram para o desenvolvimento da agricultura, também desempenharam um papel importante no desenvolvimento e melhoramento de diferentes alimentos, permitindo o aparecimento e divulgação de muitas variedades de queijo (Fox, 1993). Pela aplicação de muitas técnicas de fabrico e regras de higiene aos seus produtos, os mosteiros realizaram, sem o saberem, uma prática de denominação controlada, construindo a sua reputação sobre a qualidade dos produtos que vendiam ao exterior para assegurar a sua subsistência (Nantet, 1994).

Também nesta época, as migrações dos povos pela Europa, nomeadamente cruzados e outros peregrinos, permitiram a divulgação das técnicas de fabrico do queijo (Fox, 1993). Albergando estes viajantes, os mosteiros passaram a dar-lhes alimento, constituindo o queijo um alimento ideal para esses fiéis (Nantet, 1994).

Segundo S. Bento, o queijo constituía o principal alimento da população que vivia nas montanhas dos arredores de Roma. Nas comunidades beneditinas, onde o consumo de carne era proibido em favor do leite e seus derivados, os lacticínios e os queijos, em particular, eram considerados como uma alimentação ideal - frugal e energética. Além disso, os seus mosteiros foram os inventores de alguns tipos de queijo: Maroilles, Munster, Port-Salut e Saint-Nectaire (Nantet, 1994).

Desde há vários séculos que várias personalidades históricas tomaram atitudes decisivas na História do queijo. Carlos Magno, grande apreciador de queijo, tornou a capital da Europa Unida, Aix-la-Chapelle, na capital do queijo. Valorizando os produtos do seu Império, legislou sobre um grande número de queijos conhecidos na época, elogiou o Brie e os de cores azuis e encorajou o fabrico do Comté. O rei Carlos VI protegeu o fabrico do Roquefort desde 1411. O Imperador Carlos V (séc. XVI) reverenciava o Bleu de Gex. No séc. XVI, em Inglaterra, Henrique VIII, inicia a democratização do

queijo, devolvendo o seu fabrico aos agricultores, depois da confiscação dos bens da Igreja. A partir daí multiplicaram-se as variedades regionais. Luís XIV concedeu cartas de nobreza ao Saint-Nectaire e ao Époisses, que também foi alvo de honrarias, mais tarde, pela parte de Napoleão I, outro grande apreciador de queijo. Napoleão III foi apreciador de Camembert, tornando-o num grande sucesso embora a sua difusão esteja, também, estreitamente ligada ao desenvolvimento do caminho de ferro e à invenção da caixa de madeira (Nantet, 1994).

No território português, as actividades artesanais (precursoras da indústria) desenvolveram-se tarde e, na Idade Média, a sua produção era insignificante quando comparada com a de outros estados europeus, tratando-se apenas de pequenas unidades de cariz artesanal e doméstico orientadas para o consumo local (Teixeira, 1994). Por outro lado, não parece que os portugueses consumissem leite ou os seus derivados em quantidades significativas, não sendo referido como alimento habitual nem como complemento da alimentação dos adultos nem sequer das crianças. Os produtos nacionais eram de fraca qualidade, havendo importação de manteiga da Holanda e da Irlanda e de queijo da Holanda. O consumo de queijo nacional devia estar limitado ao meio rural próximo da área de fabrico e os queijos de ovelha nem sempre eram apreciados favoravelmente pelos visitantes estrangeiros. Nos finais do séc. XVIII, Link, nos relatos da sua viagem a Portugal de 1797 a 1799, refere que o queijo fabricado próximo de Serpa era geralmente de má qualidade, ficando “muito melhor transformado em creme doce, comido com vinho e açúcar. Passa a chamar-se assim requeijão....”, mas elogia o queijo Serra da Estrela dizendo que “é muito superior ao queijo de ovelha do Alentejo” (Veloso, 1992).

A divulgação do queijo através do mundo resultou da colonização da América do Norte e do Sul, Oceânia e África pelos colonos europeus que levaram com eles os seus conhecimentos sobre o fabrico de queijo. As variedades produzidas eram, principalmente, de origem europeia, modificadas, nalguns casos, para satisfazer as necessidades locais (Fox, 1993).

Por outro lado, na Europa, só depois da revolução dos transportes, é que o comércio de produtos agrícolas de base ganhou uma certa amplitude (Malassis, 1993). A instalação de uma rede ferroviária foi, para o queijo, uma verdadeira revolução, favorecendo a sua difusão por todo o continente europeu (Nantet, 1994).

Do ponto de vista alimentar, o período agro-industrial é marcado pelo advento de uma nova agricultura, pelo papel crescente das ciências no desenvolvimento agro-alimentar, pela generalização da economia alimentar mercantil e pela participação da indústria no processo de produção agrícola e alimentar (Malassis, 1993).

O desenvolvimento científico modifica as bases da produção agrícola. Começa a haver experimentação e o pensamento científico desenvolve-se em três campos privilegiados da agronomia: selecção, nutrição e higiene das espécies cultivadas e criadas (Malassis, 1993). Os estudos mais antigos a propósito da indústria queijeira foram feitos no séc. XVIII por Parmentier e Dejeux (Grande Enciclopédia Luso-Brasileira). No final do séc. XIX, os trabalhos de Pasteur sobre os microrganismos têm aplicação prática (fermentações, pasteurização, protecção sanitária) (Malassis, 1993) e Hammarstem estudou vários aspectos químicos da tirotecnia (Grande Enciclopédia Luso-Brasileira).

Com efeito, até muito recentemente, o fabrico de queijo permaneceu uma arte em vez de uma ciência e, hoje em dia, com os conhecimentos em química e microbiologia é possível controlar algumas das alterações envolvidas no fabrico de queijo (Fox, 1993).

A revolução industrial origina a criação de empregos na cidade reduzindo, consideravelmente, o número de agricultores e promovendo um crescimento extraordinário dos complexos urbano-industriais. Com a redução da população agrícola e o forte crescimento da população urbana, a economia

de subsistência familiar diminui e a economia alimentar mercantil progride. Tornando-se predominante a partir do final da primeira metade do séc. XIX, origina a comercialização e especialização da agricultura em grande escala (Malassis, 1993).

Os desenvolvimentos científico e industrial determinam a passagem da agricultura tradicional à agricultura mecanizada. A combinação indústria-agricultura no processo de produção agrícola origina um crescimento fantástico da produtividade do trabalho agrícola (Malassis, 1993).

A expansão comercial foi muito facilitada pela aplicação das descobertas industriais aos transportes - máquina a vapor, multiplicação das vias férreas, substituição da marinha à vela pela marinha a vapor e utilização do frio. Com o triunfo do liberalismo, o desenvolvimento dos impérios coloniais e a expansão europeia no mundo aumentaram as transações (Malassis, 1993).

A Europa do séc. XIX foi o local de partida do movimento migratório de longo curso mais importante que a história conheceu e que teve uma expansão grande na produção dos países jovens. Tal como há uns séculos atrás, os emigrantes europeus fabricavam, nos países de destino, produtos adaptados às necessidades locais. Foi o que fizeram os imigrantes italianos que chegaram à Argentina, adaptando os seus queijos preferidos e dando-lhes nomes locais (por exemplo, o Parmesão foi rebaptizado de Trebolgiano). De forma mais ou menos semelhante, ocorreu, nos Estados Unidos da América do Norte e no Canadá, a produção de Cheddar americano, com as variedades Grafton Village, Cabot, Shelburne, e de Cheddar canadiano, respectivamente. O Richelieu canadiano não é mais que o Bel Paese italiano, o mesmo acontecendo com alguns queijos gregos e até com o Serra, na Austrália (Nantet, 1994).

As importações europeias de produtos alimentares de base, provenientes do mundo inteiro, conheceram um desenvolvimento espectacular (Malassis, 1993). Entre os produtos importados conta-se o queijo Cheddar que chegou

a ser importado para Inglaterra, em 1900, do Canadá (85 000 t) dos Estados Unidos (32 000 t) e da Nova Zelândia (4 000 t)! (Nantet, 1994).

No contexto global da industrialização do séc. XIX, a transformação alimentar também se industrializa. N. Appert, a partir do início do séc. XIX, aperfeiçoa a conservação de alimentos, por esterilização. L. Pasteur confere uma base científica a esta prática e a pasteurização tem múltiplas aplicações. A criação da cadeia de frio altera as condições de distribuição e consumo alimentar (Malassis, 1993).

No séc. XX, com o desenvolvimento dos transportes ferroviários e rodoviários e a utilização da pasteurização, o agricultor passa a vender o leite em vez de o transformar em queijo (Nantet, 1994). Contudo, segundo Rodrigues e Sousa (1942) e Antunes e Santos (1943), na Serra da Estrela no início dos anos 40, era raro o criador que vendia o leite em natureza, optando antes pelo fabrico do queijo. Este fabrico ocupava a mulher na exploração caseira da queijaria, indústria doméstica, permitindo-lhe realizar algum dinheiro numa época do ano em que os produtos agrícolas disponíveis para venda eram escassos.

Na Europa, a mecanização, a fabricação em leitarias e a pasteurização produziram pastas mais estáveis, fáceis de comercializar e, por isso, de exportar, mas cujo gosto original foi banalizado. Este tipo de produção trava a fabricação tradicional e artesanal. Na América do Norte, o desenvolvimento dos supermercados provoca o desaparecimento de numerosos queijeiros artesanais que não resistem à concorrência da produção maciça de queijos industriais de leite pasteurizado, mas desprovidos de sabor (Nantet, 1994).

O período agro-industrial originou a formação de um novo modelo de consumo alimentar. O aumento da capacidade de consumo permitiu atingir o consumo em massa, o qual permite a existência de grandes mercados de géneros alimentares diversificados (Malassis, 1993).

Este período foi já atingido, e até ultrapassado, por muitos países que chegaram à “sociedade da saciedade alimentar média”, segundo a designação de Malassis (1993). Neste caso, o consumo calórico não cresce mas as despesas alimentares continuam a crescer devido às substituições qualitativas (produtos originais substituem os produtos de qualidade corrente, etc.).

No final desta evolução predomina, na sociedade agro-industrial, um modelo de consumo alimentar, cujos traços fundamentais podem ser resumidos como sendo um modelo mercantil, uma vez que a economia alimentar está totalmente integrada na economia global e a adaptação do modelo alimentar depende não só de regras nutricionais mas também dos mecanismos de mercado e preços relativos, tendo em conta o orçamento dos consumidores (Malassis, 1993).

Com o desenvolvimento das fábricas de lacticínios, no início do séc. XX e com o desaparecimento dos produtos artesanais, em consequência da Segunda Guerra Mundial, alguns produtos tradicionais desapareceram, para voltarem a aparecer alguns anos mais tarde, atingindo um número significativo nos anos 70/80 (Nantet, 1994).

Na Europa, a adopção de uma agricultura biológica parece conveniente, quer do ponto de vista ecológico quer gastronómico ou económico. Exigindo produtos de qualidade, o consumidor pode contribuir para o melhoramento da sua alimentação e para a reconstituição de um verdadeiro meio rural (Nantet, 1994).

Os produtos tradicionais identificam-se, muitas vezes, com as terras onde são fabricados e traduzem a identidade das suas populações, constituindo bens patrimoniais valiosos (Medeiros, 1994). As suas técnicas de fabrico provém de práticas ancestrais empíricas, transmitidas ao longo de gerações sucessivas. Estes produtos podem contribuir para uma melhoria do rendimento das populações que os fabricam e favorecer o desenvolvimento

das regiões onde se inserem, quer pela fixação das pessoas aos locais, quer pela atracção, a essas zonas, dos apreciadores de tais produtos, que as passam a visitar com o objectivo de os disfrutar.

A sua comercialização terá que se basear numa imagem de marca, em que a principal ideia esteja ligada à “personalidade” dos mesmos, salvaguardando a sua qualidade e tradicionalidade, tornando-os inconfundíveis em relação aos produtos de consumo corrente, massificados e descaracterizados (Oliveira, 1994).

A ALQUIMIA DO QUEIJO

Provavelmente, a produção dos primeiros produtos lácteos fermentados resultou de uma combinação fortuita de acontecimentos. Sendo o leite uma fonte de nutrientes utilizada pelas bactérias que o contaminam, algumas espécies, utilizando a lactose como fonte de energia, produzem ácido láctico como produto final. Este, ao atingir uma determinada quantidade, tem a capacidade de coagular as proteínas do leite formando um gel que aprisiona a gordura. Quando este gel se parte, separam-se o soro e a coalhada. O primeiro pode constituir uma bebida agradável e refrescante, enquanto a segunda pode ser consumida fresca ou armazenada para um consumo mais tardio, tendo-se verificado que a sua durabilidade seria maior se submetida a desidratação ou adição de sal (Fox, 1993).

Conta a tradição que um pastor, quando regressou à sua caverna, onde tinha deixado, cheio de leite, um odre feito do estômago de um animal, querendo vertê-lo, não conseguiu, saindo apenas um líquido aguado e ficando a chocalhar dentro uma massa estranha que não corria para o exterior. Cortando o odre com uma faca, provou o seu conteúdo tendo ficado agradavelmente surpreendido com o seu sabor, o que o levou a tentar repetir a proeza. Este pastor terá sido o primeiro homem a conhecer o queijo.

A manteiga terá resultado do simples transporte do leite, em recipientes, de um lugar para outro (Brothwell e Brothwell, 1969).

Foi, portanto, desde cedo, reconhecido que o leite armazenado em sacos feitos com estômago de animais podia sofrer coagulação devido à extracção de enzimas coagulantes do tecido do estômago destes animais e, embora estes agentes coagulantes tenham sido os primeiros a ser usados, os coagulantes de origem vegetal (figueira e cardo) já eram conhecidos no tempo dos romanos (Fox, 1993).

Tanto na mitologia como na pintura, escultura e na literatura clássica abundam as representações e citações em que é exaltado o papel atribuído aos animais produtores de leite e aos laticínios, nomeadamente ao queijo, associando-o a alimento de deuses e heróis.

Espalhados pela Europa e pelos locais onde floresciam as antigas civilizações (Tunísia, Egipto, Mesopotâmia, Turquia) encontram-se frescos, iluminuras, manuscritos, gravuras, mosaicos bizantinos, baixos-relevos, esculturas, postais, painéis, etc. mostrando cenas rurais do maneio dos rebanhos, pormenores do fabrico, da exposição, da venda e do consumo de produtos lácteos.

No Antigo Testamento, a Terra Prometida é frequentemente referida como a “terra onde corre o leite e o mel” (Êxodo, 3:17, 13:5, 33:3; Levítico, 20:24; Números, 14:8, 16:13-14; Deuterónimo, 6:3, 11:9, 26:15, 31:20; Josué, 5:6; Jeremias, 11:5, 32:22; Ezequiel, 20:6, 20:15) e quase todas as referências feitas ao leite e aos seus derivados mencionam-nos favoravelmente, considerando-os como produtos utilizados como oferendas e prémios.

O fabrico, o valor nutritivo e a utilização culinária do queijo são também referidos na obra de vários escritores da Antiguidade Clássica. Varro, na obra *Libri Rerum Rusticarum* comenta o valor nutritivo de queijos feitos a partir de leite de diferentes espécies e com diferentes tipos de pasta. Plínio (séc. I d.C.) na sua “História Natural” faz um elogio às pastas prensadas e duras da península italiana, já com séculos de história e exaltou o *caseus helveticus*, um queijo de pasta dura existente nos Alpes com características muito semelhantes às do actual Sbrinz. Columela, autor que também viveu no séc. I d.C., no seu tratado de agricultura *De Re Rustica*, faz descrições mais ou menos precisas sobre o fabrico do queijo e, refere-se, concretamente, ao Caciocavallo (Fox, 1993; Nantet, 1994).

Homero, na Odisseia descreve, com alguma precisão, a vida dos pastores de então e o seu modo de utilizar o leite, quer para a fabricação de queijos, quer

para a sua alimentação e a dos animais jovens (Canto IX - Relatos de Ulisses: Cícones - Lotófagos - Ciclopes). O mesmo autor, na *Iliada* (Canto XI) também refere a oferta de queijo de cabra aos combatentes do cerco de Troia: “Nesta taça, a mulher semelhante às deusas misturou vinho de Pramno; ela ralou lá para dentro queijo de cabra com um ralador de bronze”.

Virgílio nas *Geórgicas*, autêntico Tratado de Agricultura, refere o fabrico de queijos frescos e curados a partir de leite de ovelhas alimentadas com ervas previamente salgadas de modo a que produzam mais leite e que este revele um leve sabor a sal (Livro III).

Mais tarde, Miguel de Cervantes em “*D. Quixote de la Mancha*” designa o queijo como um “alimento rústico”, indicado para ser consumido por cavaleiros andantes, quando Sancho Pança, descrevendo o que traz no seu alforje, refere “uma cebola, um pedaço de queijo e não sei quantos motrecos de pão”, não os considerando “manjares próprios para tão valente cavaleiro” como D. Quixote. É também pão e queijo que Sancho oferece, da sua sacola, a André, o criado injustiçado, quando este os encontra pela segunda vez e quer partir para Sevilha. Quando leva notícias do seu amo a Dulcineia, esta presenteia Sancho Pança com queijo de ovelha, tratando-se, provavelmente, do tão famoso queijo Manchego. Ao terminar a história de Leandra, o cabreiro oferece, a D. Quixote e aos que o acompanham, a sua “choça”, onde tem “fresco leite e saborosíssimo queijo”.

São também feitas citações em obras de La Fontaine. Por exemplo em “O rato que se retirou do mundo”, o rato “cansado das lidas cá do Mundo” foi abrigar-se num queijo de Holanda gozando da sua felicidade “longe do bulício”.

Daniel Defoe, autor de *Robinson Crusoe*, recorda, nas suas memórias, a vila de Stilton, atribuindo a sua fama ao queijo aí produzido, o Stilton, considerado o rei dos queijos ingleses.

Na literatura portuguesa, Ramalho Ortigão em “Holanda” descreve com certo pormenor as casas da aldeia de Broek, onde todos os habitantes se empregam na fabricação dos famosos queijos Edam, referindo que “para cada habitação, um curral e uma queijeira”. Minuciosamente, relata o interior das queijeiras, com os instrumentos e utensílios utilizados na fabricação do queijo e, reportando-se à quantidade de lacticínios produzidos por este país, diz “manteiga para cobrir todo o pão com que almoça a Europa, queijo para dar sobremesa a todo o Mundo”. Mais adiante, percorre a feira semanal dos queijos, em Alkmaar, onde são transaccionadas algumas variedades de queijo como o Edam, o Leida, o Heerenven e os de ovelha da ilha de Texel, narrando a forma como se faz o negócio, o acordo de preços, a pesagem e o embarque dos produtos negociados.

Ao queijo estão associadas várias lendas que favorecem e exaltam o seu valor. Há vários séculos atrás, eram frequentemente utilizados como forma de pagamento de rendas ou dízimos (Nantet, 1994) e, mais recentemente, em Portugal (Alentejo), faziam parte do salário de alguns trabalhadores rurais e constituíam um dos alimentos base do rural alentejano (Picão, 1947).

Picão (1947) no livro “Através dos Campos” relatando os usos e costumes agrícolas alentejanos, conta que, durante todo o ano, o queijo estava presente na merenda ou na ceia e, por vezes, também, no jantar de todo o pessoal. Mesmo em dias de jejum, era um alimento importante, por vezes de recurso: “Em dias de jejum alguns comiam às escondidas pão e queijo, de que se muniam sorrateiramente na ceia anterior”, e também nestes dias aparecia “em vez da habitual merenda de pão e queijo, um farto jantar de feijão branco ou amarelo, muito bem condimentado, frutas e queijo grande de ovelhas”. Este era designado por “queijo bravo” pois, devido à sua qualidade superior, raramente estava ao alcance dos empregados. O queijo fazia também parte da alimentação dos “ratinhos” que “forravam-no todo, para mimosearem as famílias”.

Segundo Nantet (1994), o queijo, por vezes, está também associado a alguns rituais:

Já anteriormente empregado com finalidades terapêuticas pelos romanos, na Idade Média acreditava-se que o consumo de queijo e peixe conferia maior resistência à peste. Segundo os antigos mineiros da região de Cardiff, o Caherphilly combatia eficazmente as consequências da inalação de substâncias tóxicas. Ao Sbrinz era-lhe atribuída capacidade para aliviar problemas de estômago.

Na Suécia, o prästost - queijo do padre - é confeccionado com leite oferecido pelos paroquianos. A sua espessura é variável com a quantidade de leite utilizada a qual, por sua vez, mede a generosidade dos paroquianos.

Os monges da Abadia Abondance forneciam o seu queijo aos cardeais, reunidos em Avignon, para eleger o papa. Estando bem alimentados, demoravam muito tempo a decidir-se, pelo que a ração ia sendo reduzida até que, ao 8º dia, estavam a pão e água!

A propósito do queijo Reblochon, no séc. XV, os camponeses ofereciam aos monges cartuxos, em reconhecimento das suas bençãos, pequenos queijos que davam pelo nome de “queijos de devoção”. Actualmente, este nome deriva do facto de que quando os camponeses pastoreavam os seus rebanhos em terras de outrém, deviam pagar em queijos, cujo peso era proporcional à quantidade de leite produzido pelas suas vacas. No dia da pesagem, faziam a ordenha incompleta e ficavam com o leite que sobrava para fazerem o seu queijo.

Um jovem pastor deteve-se à entrada de uma gruta para almoçar leite coalhado e pão escuro, deixando as suas ovelhas a pastar. Ao ver a sua namorada passar, largou a refeição e seguiu-a. Mais tarde, quando voltou ao local, atacado de uma fome súbita, comeu a fatia de pão abandonada e ficou surpreendido com o seu delicioso sabor. Olhando melhor, observou que o

queijo estava salpicado com pequenas manchas azuladas. Foi o inventor do queijo Roquefort.

Hoje em dia, o leite e os produtos lácteos são considerados indispensáveis na constituição de uma dieta racional. Devido à sua composição equilibrada, (Quadro I-1) ao seu elevado valor nutritivo e alta digestibilidade são considerados como alimentos completos, sendo o leite o primeiro e único alimento consumido nos primeiros tempos de vida dos mamíferos.

A gordura do leite é considerada a mais digestível e a mais facilmente absorvida de entre as várias gorduras dietéticas, devido, principalmente, ao seu estado de dispersão e ao conteúdo relativamente alto em ácidos gordos de cadeia curta e média. O leite é uma fonte importante de proteínas de elevada digestibilidade e de alto valor biológico, ricas em amino-ácidos essenciais e sulfurados, que aumentam, consideravelmente, o valor nutricional de uma dieta quando associadas a outras proteínas. A lactose, não sendo hidrolisada no estômago, chega ao intestino onde é desdobrada em glucose e galactose, constituindo um bom substrato para a flora microbiana. O ácido láctico, resultante da utilização da lactose por esta flora, facilita a absorção dos sais de cálcio, ao aumentar a sua solubilidade, e inibe o crescimento de microrganismos indesejáveis, nomeadamente proteolíticos e putrefactivos (Renner, 1988)

O leite dispõe também de um elevado conteúdo em minerais e microelementos, nomeadamente cálcio e fósforo e iodo, zinco, cobalto, crómio e níquel. A proporção Ca/P 1:1 é equilibrada, em termos de necessidades alimentares do Homem, assegurando um adequado fornecimento de cálcio qualquer que seja a faixa etária considerada. Constitui também uma importante fonte de vitaminas, nomeadamente do grupo B, contendo também quantidades razoáveis de vitamina A, C e E (Renner, 1988).

QUADRO I-1 - Composição Química Média do Leite Proveniente de Algumas Espécies Produtoras Mais Comumente Utilizadas na Alimentação Humana. (g/100g ou g/100ml). (Adaptado de Edelsten, 1988; Giesecke, 1983).

| Espécies | Água | Sól.Totais | Gord. | Prot.Total | Caseína | Lactose | Min. |
|----------|------|------------|-------|------------|---------|---------|------|
| Vaca | 87.5 | 12.5 | 3.8 | 3.3 | 2.7 | 4.7 | 0.7 |
| Ovelha | 80.7 | 19.3 | 7.4 | 5.5 | 4.6 | 4.8 | 1.0 |
| Cabra | 85.2 | 14.8 | 5.6 | 3.8 | 3.1 | 4.8 | 0.7 |

Sól.Totais - Sólidos Totais; Gord. Gordura; Prot.Total - Proteína Total; Min.- Minerais.

Tem sido isolados do leite vários componentes bioactivos como a lactoferrina, uma glicoproteína fixadora do ferro possuindo propriedades antimicrobianas de largo espectro (Tomita, 1994). Estas propriedades provém, essencialmente, de efeitos bacteriostáticos, uma vez que, tendo capacidade de se ligar ao ferro, esta proteína torna-o indisponível para o crescimento de muitos microrganismos. Do ponto de vista nutricional, embora a sua composição em amino-ácidos possa indicar que é uma proteína de alto valor biológico, duvida-se que se possa considerar a lactoferrina como uma fonte de amino-ácidos dietética, uma vez que é resistente a enzimas proteolíticos e, portanto, não digerida no tracto gastrintestinal. Contudo, esta característica torna-a interessante pelo papel que desempenha na biodisponibilidade do ferro presente no leite, funcionando como transportadora deste elemento e, em casos de deficiência dietética, como reguladora do seu metabolismo (Hambraeus e Lönnerdal, 1994).

O Sistema Lactoperoxidase-Tiocianato-Peróxido de Hidrogénio (SLP), outro agente antimicrobiano presente no leite, cataliza a peroxidação do ião tiocianato (SCN^-) produzindo o anião hipotiocianito (OSCN^-) que, não sendo tóxico para as células dos mamíferos, pode ter um efeito bactericida ou bacteriostático para muitas espécies microbianas (Pruitt e Kamau, 1994). Admite-se que exerça uma acção bactericida face a grande número de espécies responsáveis pela deterioração do leite como bacilos Gram negativos (*Enterobacteriaceae* e *Campylobacter jejuni*) e uma acção bacteriostática em relação a bactérias lácticas e *Bacillus cereus* enquanto o

efeito sobre *Listeria monocytogenes* é variável com a estirpe considerada (Stadhouders e Beumen, 1994).

A lisozima desempenha também um papel antimicrobiano, especialmente em relação às bactérias Gram positivas, hidrolizando as ligações glicosídicas do peptidoglicano da parede celular (Mikelsaar e Mändar, 1993; Frank e Hassan, 1998).

A transformação do leite em queijo altera levemente o valor biológico das proteínas, uma vez que a maioria das proteínas presentes no soro, não estará presente no queijo. Contudo, a digestibilidade da proteína do queijo está aumentada, uma vez que a proteólise que ocorre durante a maturação torna disponíveis proteoses, peptonas, polipéptidos, péptidos e amino-ácidos a utilizar posteriormente pelo organismo. O queijo é também um produto com elevado conteúdo em Ca e P, bem como em vitaminas, apesar de uma parte significativa ser eliminada com o soro. De salientar que os queijos curados com bolores são muito mais ricos em vitaminas do grupo B que os outros, uma vez que estes organismos tem a capacidade de as sintetizar (Renner, 1988). (Quadro I-2).

QUADRO I-2 - Composição Química Média de Diferentes Variedades de Queijo Fabricadas a Partir de Leite de Vaca, Ovelha e Cabra, Respectivamente (g/100g). (Adaptado de Marcos et al., 1985).

| Variedade | Humidade | Sól.Totais | Gord. | Prot.Total | Ác.Láct. | Min. |
|-----------|----------|------------|-------|------------|----------|------|
| Edam | 40,3 | 59,7 | 30,3 | 22,8 | 0,9 | 4,7 |
| Manchego | 37,5 | 62,5 | 33,6 | 23,0 | 1,8 | 4,6 |
| Majorero | 45,3 | 54,6 | 23,4 | 25,2 | 1,8 | 5,0 |

Sól.Totais - Sólidos Totais; Gord. - Gordura; Prot.Total - Proteína Total; Ác.Láct. - Ácido Láctico; Min. - Minerais.

Internacionalmente, segundo a convenção de Stresa do início dos anos 50, o queijo é o produto fermentado ou não, obtido por esgotamento, após coagulação do leite, da nata, do leite parcial ou totalmente desnatado ou da

sua mistura, assim como o produto obtido pela concentração parcial do lactosoro (ou do soro de leite coalhado) com exclusão, em todos os casos, de qualquer adição de matéria gorda estranha ao leite (Nantet, 1994).

De uma forma generalizada, podemos dizer que o fabrico do queijo compreende a fase de manufactura, em que se realizam, durante cerca de 24 horas, uma série de operações cujos passos básicos são a acidificação, a coagulação, a desidratação (ou o conjunto das várias operações que contribuem para a sinerese do gel), a enformagem ou a moldagem e a salga. No caso dos queijos frescos, o seu fabrico fica-se por aqui, mas os queijos curados sujeitam-se ainda a uma fase de maturação de duração variável (Fox, 1993).

É assim que, a partir da mesma matéria-prima - o leite -, se pode obter uma enorme variedade de queijos resultante das possíveis combinações dos vários processos que levam à sua fabricação (Linden e Chamba, 1994).

A espécie animal produtora de leite, bem como a região que habita e o sistema de exploração a que está submetida são factores que podem ter influência no tipo de queijo.

De uma maneira geral, podemos dizer que o queijo pode ser fabricado com o leite de quase todas as espécies animais produtoras, dependendo a sua utilização dos costumes de cada região e também das suas condições naturais. Assim, nas regiões mais ricas da Europa do Norte e Central predominam os queijos fabricados com leite de vaca, havendo algumas especialidades fabricadas com leite de rena, na Finlândia (o Ilves) e na Suécia (o Lapparnas renost); na Europa do Sul, Mediterrâneo e em alguns países do Norte de África e Ásia, utiliza-se, com mais frequência, o leite fornecido por ovinos e caprinos e, pontualmente nestas duas últimas regiões, leite de camela, égua e iaque (Tibete). Excepção é o célebre Mozzarella italiano feito com leite de búfala. Segundo Castro (1989), a Itália, a França e a Grécia são os únicos países do mundo, excluindo alguns países de leste,

em que a produção ovina está principalmente voltada para a produção de leite, sendo quase totalmente transformado em queijo (apenas 10% é usado como leite fresco). Nas Américas e Oceânia, onde grande parte da técnica de fabrico dos queijos foi importada da Europa, a maioria dos queijos é feita a partir de leite de vaca e, por vezes, de ovelha e cabra.

A coagulação do leite também é importante para as características do produto final podendo resultar, apenas, de uma acidificação ou utilizar agentes coagulantes, quer de origem animal, como os enzimas digestivos do vitelo, cabrito ou borrego, quer vegetais como a flor do cardo ou a seiva da figueira, entre outros. Também podem ser adicionados diversos aditivos como o sal, especiarias e ervas aromáticas (pimenta, cravinho, cominhos, tomilho, paprika, grãos de sésamo, aniz, salva), que irão condimentar a massa do queijo. É nesta fase que é incorporado um ovo quando se fabrica o Ilves.

A forma como se inicia a desidratação, ou seja, como a coalhada obtida é trabalhada, também é outro factor que interfere no tipo de queijo que está a ser produzido. Ela pode ser cortada em pedaços de tamanhos variados, com faca, lira, grade ou outro dispositivo semelhante, mais ou menos esmiuçada à mão, apertada, comprimida, prensada durante um período de tempo variável, aquecida ou simplesmente sujeita a um dessoramento espontâneo. Pode ser moldada nas mais variadas formas desde os vulgares cilindros mais ou menos altos, esferas, prismas, até outras formas mais originais, cónicas, piramidais ou tronculares, em forma de pera (o Caciocavallo) ou em trança (o Halloumi). Podem, ainda, ser submetidos a operações particulares que lhe dão características únicas: a grelhadura à chama, a que é sujeito o Juustoleipa, antes da maturação; a inoculação de fungos na pasta e/ou na casca de vários queijos com bolores; o aquecimento a que é submetida a coalhada destinada ao fabrico dos queijos de “pasta filata”.

A duração da cura e as condições em que irá decorrer são outros factores de indiscutível influência, podendo ser de alguns dias (apenas 10 dias para o

Neufchatel) até anos (2 anos para o Cheddar). Durante este período, as condições de temperatura, humidade e ventilação e as manipulações a que os queijos estão sujeitos são muito diferentes, recebendo uns a sua influência directa enquanto outros são mantidos em salmoura, fumados ou impregnados com vinho, aguardente, cidra ou azeite, aromatizados ou não com ervas e especiarias. Posteriormente, podem criar a sua crosta natural ou ser envolvidos em cera, parafina, tecido, papel, palha perfumada com genebra ou aguardente, folhas de castanheiro, de plátano ou de vinha, envolvidos em cinza ou acomodados em caixas de lascas de madeira.

É assim que podemos dispor de queijos tão diferentes como os frescos e os curados, uns com escassas centenas de gramas e outros com mais de 100 Kg de peso e com os mais variados aspectos, texturas e sabores.

Em Portugal, dado o carácter predominantemente mediterrânico do seu clima (Brito e Baptista, 1994), os ovinos dominam na área de cultura extensiva do trigo a que estão economicamente associados, e, de um modo geral, nas regiões orientais onde a humidade é mais baixa, ou seja, predominam para o Sul e Leste do país (Ribeiro, 1986). O fabrico de queijo faz-se, principalmente, a partir de leite de ovelha, fazendo jus ao adágio popular “leite de cabra, manteiga de vaca e queijo de ovelha”.

Como referiu Castro (1989) em relação à Itália, França e Grécia, também em Portugal as áreas utilizadas para pastoreio de ovinos são áreas difíceis, marginais e sem grandes alternativas de produção.

Existe uma ampla variedade de queijos de ovelha típica e genuinamente nacionais, sem semelhança com qualquer tipo estrangeiro, de óptimas características e, por isso, muito afamados e apreciados pelos melhores provadores de queijo do mundo (Sá e Barbosa, 1984).

No território continental, os que gozam do estatuto de denominação de origem, cuja utilização foi permitida pelo Decreto-Lei nº 146/84 de 9 de Maio,

são o Serra da Estrela (Decreto-Regulamentar nº 42/85 de 5 de Julho), o Azeitão (Decreto-Regulamentar nº 49/86 de 2 de Outubro), o Serpa (Decreto-Regulamentar nº 39/87 de 29 de Junho), os queijos da Beira Baixa que incluem sob esta denominação o Castelo Branco, o Picante da Beira Baixa e o Amarelo da Beira Baixa (Decreto-Regulamentar nº 22/88 de 25 de Maio), o Nisa (Decreto-Regulamentar nº 6/93 de 16 de Março), o Rabaçal (Despacho nº 12/94 de 26 de Janeiro), o Terrincho (Despacho nº 16/94 de 26 de Janeiro), o Cabra Serrano Transmontano (Despacho nº 20/94 de 31 de Janeiro) e o Évora (Despacho nº 29/94 de 4 de Fevereiro). Menos conhecidos, mas também importantes para a economia das regiões onde são produzidos, existem ainda o Tomar, o Saloio, o Alverca e o Alcobaça.

No Alentejo, a produção ovina, principalmente submetida ao pastoreio extensivo e utilizando alojamentos rudimentares ou nem isso, depende em grande medida das condições climáticas. A ordenha quando se pratica é frequentemente manual, duas vezes por dia, e o leite não é arrefecido.

Segundo Silva (1994), em 1990, existiam, no distrito de Évora, oitenta e uma queijarias que produziam queijo de ovelha. Este produto era confeccionado com leite de ovelha, principalmente das raças Merina Regional e Cruzada, sendo a maior parte do leite utilizado (65,8%) comprado pelos transformadores, cuja maioria (58,9%) desconhecia o estatuto sanitário dos rebanhos produtores. O início da produção de queijo para a maior parte dos queijeiros ocorria entre Fevereiro e Abril, tendo sido considerado, por 43,4% deles, que a melhor época de fabrico é o mês de Abril.

O leite destinado ao fabrico de queijo, nesta região, normalmente, não sofre refrigeração durante o transporte (95,9%), e é sujeito a aquecimento (não fervura) até uma temperatura variável, conforme a temperatura ambiente, de modo a prevenir uma descida de temperatura mais ou menos rápida durante a época fria. Em seguida, o leite é filtrado, quer através da “coadora”, sistema tradicional constituído por uma armação em madeira com quatro pernas onde se prendem horizontal e paralelamente vários panos (cerca de seis), como



FOTO I-1 - "Coadora". Dispositivo Utilizado para a Filtração do Leite na Queijaria.

mostra a Foto I-1, quer na "boca do asado", isto é, através de panos colocados na abertura superior do recipiente de barro ou lata, em que se encontra o leite. O único aditivo utilizado antes da coagulação é o sal, que normalmente é colocado no primeiro pano da "coadora", em quantidades variáveis, de 1 a 10 gramas para a maioria dos queijeiros, mas também de 21 a 30 gramas, para outra parte também importante. O agente coagulante mais utilizado é de origem animal (industrial), sendo o coagulante vegetal

(cardo - *Cynara cardunculus* L.) (Foto I-2) apenas utilizado por 11% dos inquiridos. A temperatura do leite, quando lhe é adicionado o agente coagulante, é controlada, empíricamente, tal como a temperatura a que é mantido durante a coagulação. Neste período, por vezes, apenas se evita a perda de calor.



FOTO I-2 - Flor de Cardo.

Segue-se um esmiuçamento mediano da massa da coalhada, com as mãos, até se obter uma massa mais ou menos homogénea, que não contenha pedaços que não passem por entre os dedos abertos dos queijeiros. Na maior parte das queijarias, não se provoca o dessoramento, para além do que ocorre, naturalmente, na massa esmiuçada, enquanto se vai encinchando (54%) e calcando a do próximo cincho (35,6%) (Foto I-3). Segue-se a salga feita, pela maioria dos queijeiros, apenas nos topos dos queijos, e a prensagem que pode durar 12 a 24 h ou 24 a 36 h, tal como o desencinçamento que é feito 12 a 24 h ou 24 a 48 h após o fabrico (Silva, 1994).



FOTO I-3 - Esmiuçamento da Massa da Coalhada e Encinchamento.



FOTO I-4 - Salga do Queijo.

A duração da cura varia de 40 a 80 dias, conforme o clima, sendo mais frequente de 60 a 45 dias, considerando-se os 30 dias suficientes para os queijos de meia-cura. As condições ambientais de cura, tais como a temperatura, a humidade e a circulação de ar são consideradas importantes pela maioria dos produtores de queijo, mas apenas são controladas empiricamente. Parte dos queijeiros voltam o queijo apenas uma vez por dia, mas outros viram-no duas vezes por dia, de início, e, depois, apenas uma vez por dia. A maior parte dos produtores apenas os limpa no final da cura (Silva, 1994).

Obtém-se, assim, um queijo cilíndrico, baixo, regular com um ligeiro abaulamento lateral sem bordos perfeitamente definidos mas, por vezes, bem definidos e com as faces superior e inferior rectas ou com um ligeiro abaulamento. Tem 5 a 7 cm de diâmetro, 1,5 a 3 cm de altura e peso de cerca de 70 a 100 g. (Foto I-5).



FOTO I-5 - Queijos Produzidos Artesanalmente na Região de Évora.

A crosta é dura ou semi-dura, bem formada, inteira, fina, lisa ou ligeiramente rugosa com ligeira ondulação, de cor amarelo palha claro a amarelo torrado. Quanto à pasta, é ligada, untuosa com alguns olhos e pontos de gordura, sem separação abrupta da casca, de cor branco marfim a amarelada. A sua consistência é semi-dura, com corte semi-duro e perfeito e zona de corte regular sem esboroamento, ou dura com corte duro e zona de corte com esboroamento (Silva, 1994).

Ou nas palavras de Rosa-Limpo et al. (1997) são “deliciosos queijinhos entre 125 e 150 g conhecidos por “merendeiras de Évora” ou “queijinhos do Alentejo”. Em estado curados com a casca amarelada e a alva, salgada, picante e aromática massa a estalar em falhas sob a faca, constituem uma guloseima de primeira grandeza para os amadores de queijos, com aroma penetrante e sabor intenso”.

Considerando a ocorrência de múltiplas actividades pouco esclarecidas e até desconhecidas, controladas apenas empiricamente, durante o fabrico tradicional deste produto não devemos esquecer que a sua qualidade resulta, em grande parte, daquilo que desde há longo tempo se designa por “arte de queijar” e que em muito se parece com uma verdadeira alquimia.

CAPÍTULO II

MICROBIOLOGIA DO LEITE

Quando secretado pela glândula mamária saudável, o leite não contém microrganismos. No entanto, os que estão presentes no teto sobem pelo canal do teto e, portanto, mesmo o leite colhido assepticamente contém um pequeno número de microrganismos, especialmente bactérias, em resultado da contaminação dos ductos e cisterna do leite. Em condições normais, o leite está sujeito a contaminação proveniente quer da prática da ordenha quer do equipamento utilizado na sua recolha e transporte (Christiansen e Overby, 1988; Monsallier, 1994; Richard e Desmazeaud, 1997; Ledford, 1998).

A flora dominante do leite convenientemente manipulado e armazenado é constituída essencialmente por microrganismos Gram positivos, entre eles as bactérias lácticas, os micrococos, os estafilococos e os estreptococos. Estão presentes também bactérias Gram negativas, nomeadamente enterobactérias e coliformes, alguns psicrotróficos quer Gram positivos (*Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp.), quer Gram negativos (*Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Acinetobacter* spp.) e, também um pequeno número de leveduras e bolores (Bertrand, 1988; Christiansen e Overby, 1988; Jay, 1992; Richard e Desmazeaud, 1997).

Segundo o “Regulamento das Normas Sanitárias Aplicáveis à Colocação no Mercado de Leite Crú, de Leite de Consumo Tratado Térmicamente, de Leite Destinado à Transformação e de Produtos à Base de Leite, Destinados ao Consumo Humano”, aprovado pela Portaria nº 533/93 de 23 de Maio que transpõe para a legislação nacional a Directiva Comunitária 92/46 CEE do Conselho, de 16 de Junho e alterada pelas Portarias nºs 1068/95 de 30 de Agosto e 56/96 de 22 de Fevereiro, no leite de ovelha e cabra destinado ao fabrico de produtos com leite crú cujo processo de fabrico não inclua qualquer tratamento térmico, o teor de germes a 30°C deve ser $\leq 500\ 000$ por mililitro, sendo este valor obtido a partir da média geométrica verificada durante um período de dois meses com pelo menos duas colheitas por mês.

Devido às características distintas dos vários grupos microbianos presentes no leite e às relações que estabelecem entre si e que podem influenciar o seu desenvolvimento, a contaminação deste produto não deve ser apenas apreciada em relação ao número total de bactérias mas devem também ser considerados os diferentes géneros e espécies envolvidos (Christiansen e Overby, 1988). Contudo, do ponto de vista tecnológico, este valor pode oferecer alguma informação sobre o processo de deterioração microbiana (Bourgeois, 1995).

Em leites crus, com diferentes padrões higiénicos verificou-se que nos que apresentavam contagens bacterianas mais elevadas predominavam as bactérias Gram negativas, enquanto as bactérias Gram positivas eram maioritárias em leites com baixos teores microbianos (Christiansen e Overby, 1988). Desmaures et al. (1997) verificaram que em leites com baixo teor microbiano, *Staphylococcus aureus* estava presente em números mais elevados concluindo que estes leites constituíam um meio mais adequado para o seu crescimento que os leites muito contaminados.

Considerando a especificidade das distintas populações, podemos distinguir como fontes principais de contaminação, a glândula mamária, a pele dos tetos e a prática da ordenha, bem como o material utilizado neste processo e

no armazenamento e transporte do produto (Jay, 1992; Monsallier, 1994; Richard e Desmazeaud, 1997; Ledford, 1998).

Uma glândula mamária sã é uma glândula mamária estéril e o seu contributo para o aumento do número de bactérias no leite está directamente associado ao seu potencial de infecção por microrganismos patogénicos (Monsallier, 1994).

Em caso de mamite, os microrganismos presentes no interior da glândula mamária são responsáveis pela contaminação do leite. Entre eles destacam-se *Streptococcus agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. uberis*, *Strep. pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis*, *Staph. hyicus*, *Bacillus cereus*, *Nocardia* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomyces pyogenes* e *Candida* spp. (Zottolla e Smith, 1993; Badinand, 1994). Em efectivos ovinos situados na região de Évora, os agentes causais desta doença mais frequentemente isolados foram *Staphylococcus epidermidis* e outros estafilococos coagulase negativos, *Actinomyces pyogenes* e *Staphylococcus aureus* (Queiroga et al., 1997).

O leite também pode ser contaminado por microrganismos que são excretados por via mamária como é o caso de *Brucella* spp., *Listeria* spp. e, mais raramente, *Salmonella* spp.

O canal do teto, embora seja a barreira natural contra a infecção mamária, é o local privilegiado para a retenção de microrganismos de origem exógena que incluem, quer uma flora patogénica de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. e enterobactérias quer uma flora banal de *Bacillus* e *Pseudomonas* (Monsallier, 1994).

O teor de microrganismos presente na pele do úbere reflecte o grau de higiene e a qualidade do ambiente a que os animais estão sujeitos e sob os quais decorre a ordenha. A pele suja da glândula mamária e dos tetos pode contaminar fortemente o leite (10^4 a 10^5 microrganismos/ml) com uma flora

mesófila banal, uma flora de microrganismos psicrotróficos, de esporulados e de coliformes (Zottolla e Smith, 1993; Monsallier, 1994; Johnson, 1998).

A ordenha e especialmente o equipamento a ela associado introduzem a maior proporção de microrganismos no leite (Ledford, 1998). As medidas de limpeza e de desinfecção deficientemente exercidas durante a prática da ordenha e sobre o equipamento de ordenha, de armazenamento e de transporte do leite levam a que estes sejam considerados como a fonte de contaminação mais frequente (Christiansen e Overby, 1988; Monsallier, 1994; Richard e Desmazeaud, 1997; Ledford, 1998).

A proporção de bactérias Gram negativas presente no leite crú, no momento da recolha, será tanto mais importante em relação à flora total, quanto maior for a contaminação do material utilizado na ordenha (Richard e Desmazeaud, 1997).

O consumo de alimentos de fraca qualidade higiénica, nomeadamente forragens mal conservadas, e a deficiente qualidade da água utilizada na limpeza constituem também fontes de contaminação consideráveis (Frankinet, 1997).

A estabilidade de alguns alimentos contra a acção dos microrganismos deve-se, em parte, à presença de certas substâncias presentes naturalmente nestes produtos e que demonstram possuir actividade antimicrobiana. O leite, em particular, contém diferentes sistemas e substâncias antimicrobianas, já referidos no Capítulo I, como o Sistema da Lactoperoxidase-Tiocianato-Peróxido de Hidrogénio (SLP), a lactoferrina, a lisozima e algumas imunoglobulinas. Também alguns ácidos gordos livres, nomeadamente os ácidos caprílico, cáprico e láurico, libertados pela lipólise dos triacilglicéridos, podem exercer um efeito inibidor sobre algumas espécies microbianas (Jay, 1992; Desmazeaud, 1997).

Sendo meios altamente nutritivos, o leite e os produtos lácteos tornam-se susceptíveis de alteração e deterioração em consequência da sobrevivência dos microrganismos (Walker, 1988). A introdução de diversos melhoramentos na produção, manipulação e processamento do leite, entre os quais a ordenha mecânica e a refrigeração, contribuíram para a diminuição da carga microbiana do produto e também para uma alteração do equilíbrio microbiano (Christiansen e Overby, 1988).

Com a utilização da refrigeração tem-se verificado que as alterações na composição da flora bacteriana normalmente presente no leite se traduzem pela diminuição do impacto de uma flora predominantemente Gram positiva, produtora de ácido, para uma de microrganismos Gram negativos psicrótrófos (Bertrand, 1988; Christiansen e Overby, 1988; Ledford, 1988; Walker, 1988; Monsallier, 1994; Richard e Desmazeaud, 1997).

Assim, as bactérias psicrótrófas, que incluem várias espécies e estirpes de *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, entre outros, crescem bem a temperaturas de refrigeração e são responsáveis pela deterioração de alimentos que normalmente são mantidos nestas condições. Nestes e nos que estão sujeitos a temperaturas de 20 a 40°C, podem ser encontradas espécies e estirpes mesófilas. Este grupo abrange todos os microrganismos patogénicos e muitas espécies envolvidas na deterioração dos produtos alimentares (*Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, estreptococos fecais) (Boddy e Wimpenny, 1992; Jay, 1992; ICMSF, 1993).

Mas, numa flora mista de psicrótrófos e mesófilos, as temperaturas baixas tem uma acção selectiva importante, podendo afectar a composição da microflora inicial e levar a alterações da população microbiana que se desenvolverá durante o processamento e armazenamento dos alimentos (ICMSF, 1993). O número de psicrótrófos num determinado período depende não só das condições em que o produto foi obtido mas também da

temperatura a que esteve submetido e ao tempo durante o qual a ela esteve sujeito (Bertrand, 1988; Christiansen e Overby, 1988; Ledford, 1998; Walker, 1988; Monsallier, 1994; Richard e Desmazeaud, 1997).

Surgiram, portanto, novos problemas para o fabrico de produtos lácteos, relacionados com o crescimento e actividade metabólica destes microrganismos (Walker, 1988).

Concluindo, desde a ordenha até à sua utilização, o leite é contaminado por uma grande diversidade de microrganismos dos quais apenas uma parte se pode multiplicar mais ou menos activamente, consoante a temperatura e o meio lhes forem favoráveis. Por isso, a natureza da flora microbiana do leite crú é complexa e é variável quer entre amostras de leite, quer conforme a sua idade, com consequências nas características tecnológicas e, portanto, nas características organolépticas dos produtos derivados do leite (Manfredini e Massari, 1989; Richard e Desmazeaud, 1997).

PRINCIPAIS GRUPOS MICROBIANOS PRESENTES NO LEITE

Bactérias lácticas:

A flora láctica presente no leite crú, compreende um grupo muito diversificado de microrganismos com algumas características comuns: são bactérias Gram positivas, catalase negativas, aerotolerantes, não esporuladas, perfeitamente adaptadas a ambientes ricos em nutrientes e que produzem ácido láctico quer como único produto final da fermentação dos glúcidos (homofermentativas), quer como principal produto da fermentação desses compostos (heterofermentativos). Estas bactérias são também importantes para a indústria alimentar em geral, sob os pontos de vista tecnológico, nutricional e, também, médico (Axelsson, 1993; Salminen et al., 1993).

O grupo heterogéneo das bactérias lácticas inclui várias espécies dos géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Carnobacterium* e *Lactobacillus* (Vandamme et al., 1996). Nem todos estes géneros e as espécies neles incluídas têm a capacidade de desenvolver todas as funções anteriormente referidas. Portanto, alguns indivíduos tornam-se mais interessantes do que outros, sob qualquer um dos pontos de vista já mencionados (tecnológico, nutricional e médico).

Na década de 80, os microrganismos incluídos no género *Streptococcus* foram distribuídos por três grupos geneticamente diferentes. O primeiro inclui a maioria das espécies conhecidas de estreptococos e representa o género *Streptococcus*. O segundo é constituído pelos estreptococos fecais formando o género *Enterococcus* e o terceiro compreende todos os estreptococos lácticos representando o género *Lactococcus* (Schleifer, 1987; Knudtson e Hartman, 1992; Axelsson, 1993; Devriese et al., 1993).

Pertencente ao género *Streptococcus*, a espécie *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* é, provavelmente, a mais importante sob o ponto de vista tecnológico, nos produtos lácteos (Hardie, 1986; Choisy et al., 1997b; Frank e Hassan, 1998).

Esta sub-espécie diferencia-se das outras espécies do mesmo género pela sua termoresistência, pela capacidade de crescer a 52°C e pela sua capacidade em fermentar apenas um limitado número de açúcares. Tem fraca actividade proteolítica, embora possua uma proteinase intracelular e uma grande variedade de peptidases capazes de libertar péptidos curtos e amino-ácidos (Hardie, 1986; Axelsson, 1993; Choisy et al., 1997b; Frank e Hassan, 1998).

O género *Enterococcus* é constituído por cocos Gram positivos, geralmente agrupados em pares ou em pequenas cadeias, sendo algumas espécies pigmentadas ou móveis e quase todas pertencentes ao grupo D de

Lancefield. Inclui várias espécies que formam um grupo coerente, estreitamente relacionado com *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e *Listeria* (Devriese et al., 1991a; 1993; Leclerc et al., 1996; Flahaut et al., 1997).

A análise do fragmento de rRNA 16S revelou a existência de grupos de espécies no género *Enterococcus*, sendo o primeiro grupo constituído pelas espécies *Ent. faecium*, *Ent. durans*, *Ent. hirae* e *Ent. mundtii*, com percentagens de similaridade entre 98,7 e 99,7%. O segundo grupo inclui as espécies *Ent. avium*, *Ent. pseudoavium*, *Ent. raffinosus* e *Ent. malodoratus* com semelhança superior a 99%. Do terceiro grupo fazem parte *Ent. casseliflavus* e *Ent. gallinarum* com percentagens de similaridade de 99,8%. As outras espécies, *Ent. caecorum*, *Ent. columbae*, *Ent. faecalis*, *Ent. saccharolyticus*, *Ent. sulfureus* e *Ent. dispar* formam linhas distintas, embora as duas primeiras estejam mais próximas uma da outra (Devriese et al., 1993; Leclerc et al., 1996).

Os microrganismos do género *Enterococcus* fazem parte da flora autóctone do aparelho digestivo, do tracto urogenital e da cavidade oral dos animais de sangue quente (mamíferos e aves) e também têm sido assinalados em batráquios e répteis (Flahaut et al., 1997).

Estão frequentemente presentes nos leites crus, podendo atingir números apreciáveis na maioria dos queijos devido à sua capacidade de crescimento numa larga gama de temperaturas e à sua tolerância à acidez, à alcalinidade e a concentrações elevadas de sal. São bactérias homofermentativas, dotadas de um poder acidificante considerável e que participam na degradação das proteínas e dos amino-ácidos (Choisy et al., 1997b; Flahaut et al., 1997).

Podem estar envolvidos nalgumas infecções humanas, nomeadamente endocardites, meningites, pneumonias, peritonites e infecções urinárias e nosocomiais e ser responsáveis pela produção de aminas biogénicas em

consequência da sua actividade de descarboxilação de amino-ácidos (Devriese et al., 1991a; Flahaut et al., 1997).

O género *Lactococcus*, que inicialmente compreendia os estreptococos grupo N, inclui os principais microrganismos mesofílicos produtores de ácido nas fermentações lácticas. Embora se conheçam cinco espécies pertencentes a este género, *Lactococcus lactis* é, provavelmente, a mais importante nestas fermentações. Esta espécie possui três sub-espécies, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, sendo nesta última reconhecida ainda a biovariedade *diacetylactis* (Axelsson, 1993; Choisy et al., 1997b; Frank e Hassan, 1998).

São cocos Gram positivos, geralmente organizados em cadeias, embora também se encontrem células simples e em pares. Crescem a 10° mas não a 45°C, sendo a temperatura óptima de crescimento de cerca de 30°C e suportam concentrações de 4% de NaCl, à excepção de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* que apenas tolera concentrações de 2% de sal. São homofermentativas e a biovariedade *diacetylactis* tem capacidade para converter o ácido cítrico em diacetil, dióxido de carbono e acetaldeído, entre outros compostos (Mundt, 1986; Schleifer, 1987; Choisy et al., 1997b; Frank e Hassan, 1998).

São dotados de um complexo sistema proteolítico que lhes permite usar as proteínas do leite e possuem também alguma actividade lipolítica, sendo estas actividades responsáveis pela produção de compostos que intervêm directa ou indirectamente no gosto e no aroma dos produtos lácteos (Choisy et al., 1997b; Frank e Hassan, 1998).

O género *Pediococcus* agrupa alguns microrganismos pouco adaptados ao leite, pois não utilizam a lactose ou são lactose variáveis, sendo a sua presença no leite menos importante que a de outras bactérias lácticas. No entanto, estão presentes nos vegetais e produtos cárneos e são utilizados,

por vezes, como culturas de arranque de silagens e enchidos, juntamente com os lactobacilos e leuconostoc. Fisiologicamente, são mais semelhantes a estes dois géneros do que a estreptococos, mais comuns em habitats animais (Garvie, 1986a; Axelsson, 1993; Choisy et al., 1997b).

São cocos Gram positivos, que se dividem em planos alternados em dois ângulos, formando tetradas, ou que se dispõem em pares. As temperaturas óptimas de crescimento variam entre 25 e 40°C e o seu crescimento depende da presença de um açúcar fermentável. Da fermentação da glucose, muito provavelmente pela via glicolítica, são produzidos os ácidos DL-láctico ou L-láctico, que podem ser metabolizados até ácido acético. Também têm capacidade para produzir diacetil, a partir da glucose, e demonstraram alguma actividade proteolítica, peptidolítica e esterásica, contribuindo para a formação do aroma dos produtos (Garvie, 1986a; Bhowmik e Marth, 1990).

O género *Leuconostoc* constituía um grupo diversificado de microrganismos, em forma de cocos ou cocobacilos, Gram positivos, heterofermentativos, partilhando muitas características com alguns microrganismos do género *Lactobacillus*. Pela análise da sequência de rRNA 16S verificou-se que incluía três linhas filogenéticas diferentes classificadas como *Leuconostoc sensu stricto*, *Leuconostoc paramesenteroides* e *Leuconostoc oenus* (Garvie, 1986b; Collins et al., 1993; Thunell, 1995).

A linha *Leuconostoc sensu stricto* compreende *Leuconostoc mesenteroides*, com três sub-espécies, subsp. *mesenteroides*, subsp. *dextranicum* e subsp. *cremoris*, bem como as espécies *Ln. carnosum*, *Ln. citreum*, *Ln. fallax*, *Ln. gelidum*, *Ln. lactis* e *Ln. pseudomesenteroides* (Collins et al., 1993; Thunell, 1995).

Leuconostoc paramesenteroides, classificado na linha do mesmo nome, e alguns lactobacilos atípicos heterofermentativos (*Lactobacillus confusus*, *Lb. minor*, *Lb. halotolerans*, *Lb. kandleri* e *Lb. viridescens*) constituem,

actualmente, um novo género, designado por *Weissella*, ao qual pertence também uma espécie nova, *Weissella hellenica*, isolada de enchidos gregos (Collins et al., 1993; Thunell, 1995).

Leuconostoc oenus foi reclassificado como *Oenococcus oeni*, dada a baixa homologia DNA com as outras espécies do género *Leuconostoc* (Collins et al., 1993; Thunell, 1995).

Os leuconostoc surgem nos mesmos habitats que os lactococos e lactobacilos e estão geralmente associados a materiais vegetais fermentados, leite e produtos lácteos, vinhos e carnes refrigeradas. Apenas duas sub-espécies do género *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *lactis*) são importantes nas fermentações lácteas, devido à sua capacidade em utilizar o ácido cítrico formando diacetil, acetoína e dióxido de carbono (Garvie, 1986b; Thunell, 1995).

Actualmente, são considerados *Leuconostoc* os cocos ou cocobacilos Gram positivo, catalase negativo, heterofermentativos, produzindo etanol, ácido acético, dióxido de carbono e ácido D-láctico a partir da glucose e que não são capazes de hidrolizar a arginina. No entanto, alguns lactobacilos heterofermentativos revelam também estas características, pelo que se torna difícil a sua diferenciação (Garvie, 1986b; Thunell, 1995).

O género *Weissella* é constituído por bactérias em forma de cocos ou de bacilos curtos com extremidades arredondadas, heterofermentativas e quase todas as espécies têm capacidade para hidrolizar a arginina e formar ácido DL-láctico, a partir da fermentação da glucose. São acidodúricas e quase todas as espécies crescem a 15 mas não a 45°C (Collins et al., 1993; Thunell, 1995).

O género *Lactobacillus* é constituído por bactérias Gram positivas, em forma de bacilo, genética e fisiologicamente diferentes, que se distribuem por três

grupos, com base nos produtos finais da fermentação dos açúcares. O primeiro grupo é formado pelos lactobacilos homofermentativos estritos e inclui as três sub-espécies de *Lb. delbrueckii* (subsp. *bulgaricus*, *lactis* e *delbrueckii*), *Lb. acidophilus* e *Lb. helveticus*. Estes microrganismos fermentam exclusivamente as hexoses até ácido láctico e não fermentam as pentoses nem o gluconato (Kandler e Weiss, 1986; Schleifer, 1987; Choisy et al., 1997b; Frank e Hassan, 1998).

O segundo grupo inclui os lactobacilos heterofermentativos facultativos que fermentam as hexoses quer quase exclusivamente até ácido láctico quer até ácidos láctico e acético, etanol e ácido fórmico, quando em limitação de glucose, e fermentam também as pentoses até ácidos láctico e acético. Este grupo inclui *Lactobacillus casei*, *Lb. plantarum* e *Lb. sakei* (Kandler e Weiss, 1986; Schleifer, 1987; Choisy et al., 1997b; Frank e Hassan, 1998).

Finalmente o terceiro grupo é constituído pelos lactobacilos heterofermentativos obrigatórios que fermentam as hexoses e as pentoses até ácido láctico, acético, etanol e dióxido de carbono. *Lactobacillus kefir*, *Lb. bifementans*, *Lb. brevis* e *Lb. fermentum* fazem parte deste grupo (Kandler e Weiss, 1986; Choisy et al., 1997b; Frank e Hassan, 1998).

Os lactobacilos encontram-se nos produtos lácteos, cereais, carne, peixe, frutas, vegetais e podem também fazer parte da flora oral, intestinal e vaginal de animais homeotérmicos (Kandler e Weiss, 1986).

Crescem mais facilmente em ambientes ácidos, com um pH inicial de 6,4 a 4,5, sendo a sua taxa de crescimento reduzida em condições de neutralidade ou de alcalinidade. No entanto, o seu crescimento cessa quando o pH atinge valores de 4,0 a 3,6. As temperaturas de crescimento situam-se entre os 2 e os 53°C, sendo a temperatura óptima geralmente de 30 a 40°C. No entanto, algumas estirpes podem crescer a temperaturas inferiores a 15°C ou mesmo 5°C enquanto outras, os lactobacilos termofílicos, podem ter um limite superior de 55°C mas não crescem abaixo de 15°C (Kandler e Weiss, 1986).

São dotados de um equipamento proteolítico complexo, semelhante ao dos lactococos, bem como de actividade esterásica e lipásica com importância significativa nos processos tecnológicos dos produtos lácteos (Choisy et al., 1997b).

Nos Quadros II-1 e II-2 resumem-se, respectivamente, algumas das características fenotípicas dos vários géneros de bactérias lácticas bem como das espécies representativas dos diferentes grupos de lactobacilos mais significativos no leite e nos produtos lácteos.

As bactérias lácticas tem sido utilizadas com vista a alterar as qualidades de armazenamento, palatabilidade e valor nutritivo de alimentos perecíveis - leite, carne, peixe, legumes, frutas e cereais - e desempenham um papel importante na conservação dos alimentos, na prevenção de intoxicações e, indirectamente contribuindo para minorar a fome em todos os continentes (Salminen e von Wright, 1993). Nos países tropicais, a fermentação láctica

QUADRO II-1 - Características Fenotípicas de Alguns Géneros de Bactérias Lácticas. (Adaptado de Mundt, 1986; Schleifer, 1987; Knudtson e Hartman, 1992; Axelsson, 1993; Collins et al., 1993; Devriese et al., 1993).

| GÉNERO | TEMP.CRESC | | TIPO FERM | ISÓMERO ÁC.LÁCT. | CRESC.NaCl | | HIDR.ARG | VP |
|-------------------------------|------------|------|-------------|--------------------------|-----------------|------|----------|-----------------|
| | 15°C | 45°C | | | 4% | 6,5% | | |
| COCOS | | | | | | | | |
| <i>Enterococcus</i> | + | + | Homo | L(+) | + | + | +/- | + ^{a)} |
| <i>Lactococcus/Vagococcus</i> | + | - | Homo | L(+) | + ^{b)} | - | +/- | - |
| <i>Pediococcus</i> | +/- | +/- | Homo | DL ou L(+) | +/- | +/- | +/- | - |
| <i>Leuconostoc</i> | + | - | Hetero | D(-) | +/- | +/- | - | - |
| BACILOS | | | | | | | | |
| <i>Carnobacterium</i> | + | - | Homo | L | + | + | + | |
| <i>Lactobacillus</i> | +/- | +/- | Homo/Hetero | DL; D(-) ou L(+) | +/- | +/- | +/- | |
| <i>Weissella</i> | + | - | Hetero | DL ou D(-) ^{c)} | + | + | +/- | |

TEMP.CRESC - Temperatura de crescimento; TIPO FERM - Tipo Fermentativo;

ÁC.LÁCT. - Ácido láctico; CRESC.NaCl - Crescimento em NaCl. HIDR.ARG. - Hidrólise da arginina; VP - Reacção de Voges Proskauer.

+/- variável consoante as espécies; Homo- Homofermentativo; Hetero- Heterofermentativo;

a) excepto *Ent. saccharolyticus*; b) excepto *Lc. Lactis* subsp *cremoris*; c) apenas *W. paramesenteroides* e *W. hellenica* produzem ácido D-láctico.

permite a conservação dos alimentos a baixo custo e sem necessidade de outros processos de conservação - refrigeração, congelação, radiurização e apertização (Cooke et al., 1987). Em relação à alimentação animal, a actividade que as bactérias lácticas são capazes de desenvolver é um processo atractivo para a produção e conservação de forragens, nomeadamente silagens.

A conservação de alimentos fermentados pelas bactérias lácticas deve-se primariamente ao facto dos açúcares serem convertidos em ácidos orgânicos (ácidos láctico e acético), causando uma redução no pH e a remoção dos glúcidos como fontes nutritivas. Estes microrganismos são reconhecidos como uma fonte potencial de bioconservantes para os alimentos, indo ao encontro do desejo dos consumidores por novos produtos alimentares e/ou produtos alimentares “naturais” (Davidson e Hoover, 1993).

QUADRO II-2 - Características Fenotípicas das Espécies Representativas dos Diferentes Grupos de *Lactobacillus*. (Adaptado de Kandler e Weiss, 1986; Gürakan et al., 1995; Choisy et al., 1997b; Frank e Hassan, 1998).

| GRUPOS | ESPÉCIES REPRESENTATIVAS | TEMP.CRESC | | TIPO FERM. | ISÓMERO ÁC.LÁCT. | CRESC.NaCl | | HIDR. ARG. |
|-----------------------------------|--------------------------|------------|-------------------|----------------------|--------------------|------------|------|------------|
| | | 15°C | 45°C | | | 4% | 6,5% | |
| HOMOFERMEN-TATIVOS OBRIGATÓRIOS | <i>Lb. acidophilus</i> | - | + | Homo | DL | | | - |
| | <i>Lb. delbrüeckii</i> | - | + | Homo | D | - | - | +/- |
| | <i>Lb. helveticus</i> | - | + | Homo | DL | + | + | - |
| HETEROFERMEN-TATIVOS FACULTATIVOS | <i>Lb. casei</i> | + | -/+ ^{a)} | Homo | L/DL ^{b)} | | | - |
| | <i>Lb. plantarum</i> | + | - | Homo | DL | + | + | - |
| | <i>Lb. sakei</i> | + | - | Homo | DL/L | + | + | - |
| HETEROFERMEN-TATIVOS OBRIGATÓRIOS | <i>Lb. bifementans</i> | + | - | Hetero ^{c)} | DL | | | - |
| | <i>Lb. brevis</i> | + | - | Hetero | DL | + | + | + |
| | <i>Lb. fermentum</i> | - | + | Hetero | DL | | | + |

TEMP.CRESC - Temperatura de crescimento; TIPO FERM. - Tipo Fermentativo; ÁC.LÁCT. - Ácido láctico; CRESC.NaCl - Crescimento em NaCl; HIDR.ARG. - Hidrólise da arginina.

Homo- Homofermentativo; Hetero- Heterofermentativo;

a) apenas *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* cresce a 15°C e a 45°C; b) apenas *Lb. casei* subsp. *plantarum* produz ácido DL-láctico; c) algumas estirpes são homofermentativas.

Além disso, as bactérias lácticas são capazes de produzir vários compostos antibacterianos que actuam quer sobre a flora láctica quer sobre a flora indesejável e patogénica. Entre estes compostos encontram-se os resultantes do metabolismo do oxigénio - peróxido de hidrogénio e radicais livres -, os ácidos orgânicos - ácido láctico e acético -, o diacetil, com efeitos importantes sobre a qualidade do queijo (Piard e Desmazeaud, 1991; 1992).

Muitas estirpes de bactérias lácticas são capazes de sintetizar outras substâncias não proteicas e também substâncias proteicas, as bacteriocinas, com actividade inibitória em relação a um grande número de agentes microbianos, quer patogénicos quer potencialmente patogénicos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Piard e Desmazeaud, 1991; 1992).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* produz um pequeno péptido que é activo contra *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. fragi*, *Ps. putrefaciens* e *Escherichia coli*. Também *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* exhibe actividade antimicrobiana através da produção de uma substância de baixo peso molecular inibitória em relação a *Lactococcus lactis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Shigella* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. aeruginosa*, *Bacillus* spp., *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (Piard e Desmazeaud, 1992).

Lactobacillus reuteri, em anaerobiose e em presença de glicerol, é capaz de produzir e excretar reuterina. Quimicamente, é um derivado desidratado do glicerol, β -hidroxipropionaldeído, e exerce a sua actividade sobre a ribonucleotido redutase, enzima que cataliza o primeiro passo na síntese de DNA. Assim, o seu espectro de actividade é excepcionalmente vasto, atingindo bactérias Gram positivas e Gram negativas, leveduras, bolores e protozoários (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Piard e Desmazeaud, 1992; Davidson e Hoover, 1993; Vandenberg, 1993).

Lactobacillus acidophilus também produz outro composto, o “bulgarican”, que inibe vários microrganismos Gram positivos e Gram negativos como, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus subtilis* (Davidson e Hoover, 1993).

Segundo Tagg et al. (1976), citado por Piard e Desmazeaud (1992), as bacteriocinas são proteínas que tem actividade bactericida em relação a bactérias taxonomicamente próximas da espécie produtora. Têm, portanto, um espectro de actividade estreito e, dada a sua natureza proteica, são sensíveis às proteases.

Têm sido identificados vários tipos de bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas e *Bifidobacterium* spp., evidenciando propriedades bioquímicas, pesos moleculares, espectros de actividade e modos de acção muito heterogéneos (Piard e Desmazeaud, 1992; Davidson e Hoover, 1993; Marshall e Tamime, 1997).

Assim, Jack et al. (1995) propuseram que o conceito de bacteriocina fosse alargado, abrangendo os “produtos primários ou modificados de síntese ribossómica bacteriana que tem uma gama de actividade bactericida relativamente estreita, caracterizada pela inclusão de, pelo menos, algumas estirpes das mesmas espécies da bactéria produtora e contra a qual a estirpe produtora tem alguns mecanismo(s) de autoprotecção específica”.

A biossíntese de bacteriocinas ocorre, principalmente, durante ou no final da fase exponencial de crescimento e, por vezes, na fase estacionária, estando a sua produção relacionada com a quantidade de biomassa produzida. Geralmente, são produtos de excreção celular mas parte da actividade antimicrobiana pode ficar retida na célula, dependendo das condições culturais (Piard e Desmazeaud, 1992). A produção das diferentes bacteriocinas pelas bactérias lácticas é influenciada por diversos factores

como a estirpe produtora, a composição do meio e disponibilidade de nutrientes, o pH final, a temperatura e a duração da incubação (Biswas et al., 1991; Parente e Hill, 1992a; Daba et al., 1993; de Vuyst e Vandamme, 1993; Parente et al., 1994; Yang e Ray, 1994; de Vuyst, 1995; Vignolo et al., 1995).

Salvo raras excepções, a sua produção e a imunidade à sua acção são de informação plasmídica (Nettles e Barefoot, 1993; Jack et al., 1995; Choisy et al., 1997b; Frank e Hassan, 1998).

Consoante o seu espectro de actividade, as bacteriocinas produzidas pela maioria das bactérias lácticas agrupam-se em dois tipos. Um deles inclui as que são activas contra as bactérias taxonomicamente próximas da espécie produtora. As bactérias que produzem este tipo de bacteriocinas, provavelmente, favorecem o crescimento de uma dada estirpe bacteriana, em competição com a flora natural. Além da sua importância nas fermentações empíricas, estas bacteriocinas ou as estirpes que as produzem podem também ser usadas quando não se pretende que ocorra a fermentação láctica (nas bebidas alcoólicas e nas compotas). O outro tipo é composto pelas bacteriocinas com um espectro de actividade relativamente alargado. Inclui, portanto, além das activas contra a flora láctica, as que podem combater certa flora patogénica como *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp. e *Staphylococcus aureus* (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Piard e Desmazeaud, 1992).

Em condições normais, as bactérias Gram negativas não são sensíveis à actividade das bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram positivas (Piard e Desmazeaud, 1992; Nettles e Barefoot, 1993; Jack et al., 1995; Marshall e Tamime, 1997)

A maior parte das bacteriocinas das bactérias lácticas demonstra actividade bactericida cujo efeito letal é mais acentuado nas células em crescimento exponencial que nas que se encontram na fase estacionária. As bacteriocinas actuam sobre a membrana celular das células sensíveis,

diminuindo o seu potencial de membrana e esgotando a Força Protão Motriz (PMF) e, portanto, comprometendo a homeostase celular. Foram também sugeridos outros mecanismos que resultam das alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática e que envolvem a interferência com o transporte de uridina, a síntese de RNA, de DNA e de proteínas, a saída de iões (K^+ e glutamato) e de ATP, a hidrólise de ATP e a formação de poros na membrana citoplasmática, permitindo a saída de vários metabolitos celulares (Piard e Desmazeaud, 1992; Bruno e Montville, 1993; Nettles e Barefoot, 1993; Vandenberg, 1993; Jack et al., 1995; González et al., 1996; Tahara e Kanatani, 1996; Choisy et al., 1997b; Marshall e Tamime, 1997).

A utilização das bacteriocinas nos alimentos constitui uma forma interessante de controlo de alguns microrganismos indesejáveis ou patogénicos como *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp. e *Staphylococcus aureus*. Contudo, para que seja viável, útil e eficaz devem ser considerados, para além de aspectos de saúde pública e económicos, vários outros factores relacionados com o seu espectro de actividade, as suas características bioquímicas e genéticas e o seu comportamento nos sistemas alimentares.

O uso indiscriminado de bacteriocinas ou de culturas produtoras de bacteriocinas activas contra certos microrganismos patogénicos pode envolver riscos, caso a acidificação seja retardada, pois facilitaria o crescimento e sobrevivência de outros patogénicos e bactérias de deterioração resistentes às bacteriocinas. Contudo, uma fermentação bem sucedida associada à acção de bacteriocinas ou de culturas produtoras de bacteriocinas pode conferir uma segurança razoável no controlo de microrganismos patogénicos e de deterioração, especialmente se a carga do contaminante em causa for baixa (Parente e Hill, 1992c; Vandenberg, 1993; Giraffa et al., 1994; Nuñez et al., 1997).

O comportamento das bacteriocinas nos sistemas alimentares é de grande relevância, pois são inúmeras as interferências que o alimento pode exercer

sobre a actividade de cada bacteriocina (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Nettles e Barefoot, 1993; Yang e Ray, 1994).

Certos factores intrínsecos dos alimentos influenciam a eficácia das bacteriocinas bem como a sua produção pelas diferentes estirpes. Como proteínas que são, podem ser inactivadas pelas enzimas proteolíticas presentes nos alimentos. Por outro lado, a maioria das bacteriocinas é hidrofóbica e, portanto, pode ligar-se às gorduras e fosfolípidos, verificando-se uma diminuição na sua actividade que, por sua vez, pode ser atenuada pela adição de emulsificantes não iónicos mas não por emulsificantes aniónicos. A presença de agentes quelantes favorece a actividade das bacteriocinas em relação às bactérias Gram positivas resistentes e torna sensíveis as bactérias Gram negativas. Estes agentes ligam-se aos iões magnésio da camada lipopolissacáridica da membrana externa das bactérias Gram negativas e, aumentando a sua permeabilidade, facilitam a inactivação das células (Stevens et al., 1991; Nettles e Barefoot, 1993; Vandenberg, 1993; Stiles 1996).

Por outro lado, certos processos a que os alimentos são sujeitos, como a congelação e o aquecimento, expõem os microrganismos a condições de *stress* subletais. Nestas condições, quer os microrganismos Gram positivos resistentes quer os Gram negativos tornam-se sensíveis à actividade das bacteriocinas (Kalchayanand et al., 1992). Estes autores atribuem esta maior sensibilidade dos microrganismos aos danos causados por estes processos na parede celular que, não impedindo a entrada de compostos desestabilizadores, levam à perda de viabilidade celular.

Nos produtos lácteos, a produção de bacteriocinas por algumas bactérias lácticas parece ser favorecida pela activação do SLP. Este sistema, ao inibir o crescimento das bactérias Gram negativas, aumenta a disponibilidade em nutrientes para as bactérias lácticas, que, embora também sujeitas à inibição pelo SLP, beneficiam mais com o aumento da disponibilidade em nutrientes

do que são prejudicadas pela activação da LP (Vandenberg, 1993; Rodríguez et al., 1997).

O crescimento associativo de estirpes bacteriocinogénicas pode favorecer a produção de bacteriocinas em quantidade e em precocidade, mas também outros factores como o antagonismo com outras bactérias, a inibição por bacteriófagos, o desenvolvimento de flora resistente à bacteriocina influenciam a sua produção e eficácia (Barefoot e Nettles, 1993; Stiles, 1996).

Também têm sido atribuídos às bactérias lácticas efeitos benéficos para a saúde humana e animal sendo utilizadas, algumas espécies, como probióticos. Estas substâncias são microrganismos ou produtos contendo microrganismos, que favorecem o ambiente gastrintestinal ao preservarem a integridade da flora intestinal normal e promoverem a resistência à colonização por microrganismos patogénicos (Salminen et al., 1993; Nousiainen e Setälä, 1993). Têm, assim, efeitos positivos quer na prevenção das alterações gastrintestinais, nomeadamente diarreias, quer no tratamento destas, através da sua utilização como suplementos dietéticos (Salminen et al., 1993). São também úteis ao melhorarem a digestão da lactose, em indivíduos com intolerância a este açúcar, no controlo de certos tipos de cancro e no controlo dos níveis séricos de colesterol (Buckenhüskes et al., 1993).

Globalmente, a flora láctica é útil pelo seu poder acidificante e pelo seu envolvimento na proteólise e na produção de aromas (Monsallier, 1994). No entanto, também podem ser responsáveis pela deterioração dos produtos lácteos, através da produção de ácido pela fermentação da lactose. O leite, tornado instável pela acidificação, tem tendência a coagular sob tratamento térmico. A refrigeração reduz o crescimento destes microrganismos mas o dessoramento causa perdas consideráveis, em condições de armazenamento inadequadas ou em países quentes (Walker, 1988).

Micrococáceas:

A família *Micrococcaceae* compreende, entre outros, os géneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*. O género *Micrococcus* tem nove espécies sendo *Micrococcus varians*, *Mc. luteus* e *Mc. roseus* os mais frequentes nos produtos lácteos (Schleifer, 1986; Choisy et al., 1997b).

São cocos Gram positivos, associados em cachos mais ou menos regulares, imóveis, catalase positivos, aeróbios estritos, com capacidade para fermentar poucos açúcares mas que utilizam diversas outras fontes de carbono (Schleifer, 1986; Bhowmik e Marth, 1990; Choisy et al., 1997b).

Tem um crescimento óptimo entre 25 e 37°C, mas são capazes de se multiplicar a 10°C. Geralmente não toleram temperaturas superiores a 45°C e, portanto, à excepção de algumas estirpes termodúricas, a maior parte não sobrevive à pasteurização. Demonstram uma grande resistência ao sal, podendo crescer em presença de 15% de NaCl (Schleifer, 1986; Choisy et al., 1997b).

Dispõem de proteases exocelulares e intracelulares com capacidade para degradar as α - e as β -caseínas, possuem diversas peptidases intracelulares do tipo endopeptidase, aminopeptidase, dipeptidase e prolina iminopeptidase e tem também capacidade para utilizar diversos amino-ácidos. Evidenciam ainda actividade lipolítica, desempenhada por lipases e esterases activas sobre a gordura do leite (Bhowmik e Marth, 1990; Choisy et al., 1997b).

O seu habitat principal é a pele dos mamíferos e, secundariamente, encontram-se nos produtos cárneos e lácteos, no solo e na água (Schleifer, 1986). Os micrococos constituem a flora predominante num leite obtido assepticamente, uma vez que a principal fonte destes microrganismos é o úbere. Contudo, os utensílios e as máquinas de ordenha, o pó e o ar são também fontes importantes (Bhowmik e Marth, 1990).

O género *Staphylococcus* possui, pelo menos, dezanove espécies microbianas. As mais frequentemente encontradas em produtos lácteos são *Staphylococcus caseolyticus*, *Staph. saprophyticus*, *Staph. xylosus* e *Staph. epidermidis* (Schleifer, 1986; Choisy et al., 1997b). A espécie *Staphylococcus aureus* e outras espécies enterotoxígenas também podem ser encontradas nestes produtos mas dado o seu envolvimento em intoxicações alimentares, será referida mais adiante.

Os estafilococos são cocos Gram positivo, catalase positivo que se dividem em mais do que um plano, formando cachos de células irregulares e tri-dimensionais. São imóveis e não produzem esporos (Schleifer, 1986; Asperger, 1994).

São anaeróbios facultativos mas o seu crescimento é favorecido pela aerobiose. A maioria das estirpes cresce entre 10 e 45°C, com temperaturas óptimas de crescimento entre 30 e 37°C. Desenvolvem-se num largo espectro de pH, entre 4,2 e 9,3, sendo o pH óptimo próximo da neutralidade (entre 7,0 e 7,5). O crescimento é bom em concentrações de NaCl de 10%, mas relativamente pobre a 15%, podendo ocorrer com valores de a_w de 0,86 (Schleifer, 1986; Asperger, 1994; Choisy et al., 1997b).

Estes microrganismos, em aerobiose, utilizam vários glúcidos, produzindo ácidos e, embora algumas espécies necessitem de uma fonte de azoto orgânico e de vitaminas do grupo B para o seu crescimento, noutras o sulfato de amónio pode ser usado como única fonte de azoto. Produzem amónia, a partir da arginina e da ureia, e a maioria das estirpes hidroliza as proteínas animais (caseínas, gelatina, fibrina). Possuem lipases, fosfolipases e esterases que hidrolizam vários lípidos e fosfolípidos com libertação de ácidos gordos. Algumas estirpes produzem lecitinase (Schleifer, 1986; Asperger, 1994).

Os estafilococos estão largamente distribuídos na natureza. Os seus principais habitats incluem a pele e glândulas associadas e as mucosas de

mamíferos e aves, onde desempenham um útil papel, metabolizando os produtos desses órgãos e prevenindo a colonização por microrganismos patogénicos. Em grande variedade de locais do corpo, como nas fossas nasais, na faringe e nos tractos gastrintestinal e urogenital podem existir diferentes estirpes. No entanto, as fossas nasais parecem ser o principal local de multiplicação, sendo estas bactérias constituintes normais das suas secreções (Schleifer, 1986; Asperger, 1994).

A contaminação do ar por estafilococos é frequente e está principalmente associada à habitação humana, surgindo em consequência da libertação de partículas de sujidade contaminadas da pele e do vestuário e mesmo pela perda de pequenos fragmentos de pele descamada (Gilmour e Harvey, 1990; Asperger, 1994).

Esporadicamente, tem sido isolados do solo, da água do mar e água doce, dos esgotos, das superfícies e objectos de fábricas de alimentos e também das superfícies, sujidade e ar de áreas desabitadas, cuja contaminação se deve a mamíferos ou aves (Asperger, 1994).

Portanto, virtualmente, a superfície de qualquer objecto inanimado pode ser contaminada por estafilococos, que se mantém durante um longo período, uma vez que algumas espécies são relativamente resistentes à secura (Gilmour e Harvey, 1990; Asperger, 1994).

A contaminação do leite e produtos lácteos pode ter origem em lesões da glândula mamária e tetos e/ou resultar da fraca higiene humana, uma vez que as áreas nasal e oral e as mãos das pessoas são locais onde é vulgar a presença de estafilococos. A sua presença no leite está, também, frequentemente associada a deficientes condições higiénicas do equipamento utilizado na ordenha (Mossel e van Netten, 1990; Burgess et al., 1994).

As espécies mais prevalentes e persistentes na pele do Homem são *Staphylococcus epidermidis* e *Staph. hominis* que, embora temporariamente, podem ser também encontradas nos animais produtores de leite, em resultado da proximidade e da frequência de contacto entre hospedeiros. Durante a ordenha, dependendo do equipamento e procedimentos empregues, a contaminação humana do leite pode ser facilitada. A ordenha manual apresenta, obviamente, um risco maior que a mecânica. Contudo, a limpeza e desinfecção convenientes dos equipamentos de ordenha mecânica são essenciais para que da sua utilização resulte uma menor contaminação. De qualquer modo, é essencial que o produto não entre em contacto com as mãos dos operadores quer directamente quer através dos instrumentos utilizados (Gilmour e Harvey, 1990; Ledford, 1998).

Os estafilococos podem, portanto, constituir um indicador de contaminação do úbere do animal produtor, principal fonte deste microrganismo, e da pele e das vias respiratórias superiores dos manipuladores de alimentos, sendo a sua presença reveladora de deficientes condições de higiene (Mossel e van Netten, 1990; Asperger, 1994).

A contaminação do leite e produtos lácteos, embora não possa ser completamente evitada, pode ser minimizada através da aplicação de rigorosas medidas de higiene nas explorações, que incluem o rastreio de mamites, bem como nos locais de processamento do leite, de modo a que seja prevenida a contaminação e o crescimento subsequente destes microrganismos durante os processos de manufactura e no produto acabado (Gilmour e Harvey, 1990; Mossel e van Netten, 1990; Asperger, 1994).

Do ponto de vista da etiologia da intoxicação alimentar, só os estafilococos que produzem enterotoxinas são importantes. Estas podem ser produzidas por espécies coagulase positivas ou negativas e que tem um habitat muito variado. Assim, em termos ecológicos todos os estafilococos devem ser considerados como potenciais produtores de toxinas e, portanto, o seu crescimento é considerado como um risco para a saúde pública (Mossel e

van Netten, 1990; De Buyser, 1995). Contudo, os níveis de toxinas causadores de intoxicações só surgem a partir de uma população de 10^5 a 10^6 microrganismos por grama de produto ingerido, desde que sejam estirpes produtoras de toxinas e que o pH do alimento seja superior a 5. Por isso, a presença de baixos teores de estafilococos ou mesmo *Staphylococcus aureus* não constitui necessariamente um risco (Walker, 1988; Asperger, 1994; Burgess et al., 1994). Por outro lado, mesmo que a maior parte de *Staph. aureus* isolada de alimentos não produza toxinas, a sua presença indica uma higiene deficiente (Mossel e van Netten, 1990; De Buyser, 1995).

O leite com baixo teor microbiano contém uma proporção de micrococcos e de estafilococos muito elevada (76%), uma vez que, nestas condições, o crescimento destes microrganismos é favorecido pela falta de competidores (Christensen e Overby, 1988; Asperger, 1994).

A flora microbiana vulgar do leite cru é composta por várias bactérias Gram positivas e Gram negativas que crescem rapidamente. Muitas delas são responsáveis pela deterioração dos produtos alimentares muito antes dos estafilococos atingirem populações suficientemente numerosas para constituírem um risco. Por outro lado, quando submetida a temperaturas de refrigeração, a flora psicrótrófica é favorecida, relativamente aos estafilococos, crescendo mais facilmente. Os produtos feitos a partir de leite cru fermentado utilizam as bactérias lácticas que, em virtude da sua capacidade acidificante, desenvolvem uma actividade antagonista sobre os estafilococos. Quando estas floras inibidoras não existem ou o seu crescimento está inibido, aumenta o risco da população de estafilococos crescer. É o que acontece em leites crus, provenientes de úberes infectados mas cuja carga microbiana é leve, ou quando a sua acidificação, em consequência da actividade das bactérias lácticas, ocorre lentamente devido à baixa temperatura ou à presença de substâncias inibidoras, como o sal ou os antibióticos, ou a infecções por bacteriófagos ou mesmo devido à produção de bacteriocinas que inibem as próprias bactérias lácticas (Mossel e van Netten, 1990; Zottola e Smith, 1991; Asperger, 1994).

Enterobacteriáceas:

Os géneros que constituem a família *Enterobacteriaceae* estão distribuídos por toda a parte e encontram-se no solo, água, plantas, frutas, vegetais e em quase todos os animais, desde os insectos ao Homem. A importância de muitas espécies pertencentes a esta família deve-se aos prejuízos resultantes das doenças que causam quer em vegetais quer nos animais e no Homem (Brenner, 1984).

As enterobactérias são consideradas como indicadores de contaminação fecal, ou seja, são microrganismos que normalmente habitam o intestino dos animais e cuja presença nos alimentos alerta para o risco de neles poderem estar presentes microrganismos entéricos patogénicos, em consequência de contacto fecal (Catsaras, 1995; Jay, 1994).

Os coliformes contaminam frequentemente o leite cru. Pertencem à família *Enterobacteriaceae* e compreendem essencialmente os géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*. São bacilos Gram negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, não esporulados, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 48 horas, a 32 ou 35°C. Estes microrganismos tem um desenvolvimento óptimo a 37°C, possível entre 10 e 45°C, mas são destruídos pela pasteurização e não crescem a temperaturas inferiores a 4°C. Não se verifica crescimento a pH inferior a 4,5 (Walker, 1988; Christen et al., 1992; Jay, 1992; 1994; Ledford, 1998; White, 1998).

Os coliformes fecais distinguem-se pelo facto de produzirem ácido e gás a 44-46°C ou, mais vulgarmente, a 44,5-45,5°C (Jay, 1992; Catsaras, 1995).

Embora possam ser encontrados em ambientes como água, solo, plantas e dejectos, vivem essencialmente no intestino do Homem e dos animais (Brenner, 1984; Christen et al., 1992; Catsaras, 1995), sendo, por isso, utilizados frequentemente como indicadores de contaminação fecal. A sua presença no leite aponta para a existência de condições higiénicas

deficientes na ordenha e limpeza imperfeita das instalações e dos equipamentos utilizados que podem, eventualmente, ter sido contaminados por estrume, terra e água. Devido à sua sensibilidade à pasteurização, a presença de coliformes no leite pasteurizado revela que esta terá sido realizada inadequadamente ou que terá havido contaminação pós-processamento (Walker, 1988; Jay, 1992; Monsallier, 1994; Ledford, 1998).

Quando presentes em grande número no leite, os coliformes podem fermentar a lactose, com produção de gás, causando, nos queijos, o defeito conhecido por "inchaço precoce". São também responsáveis pelo aparecimento de defeitos de sabor como a sujo, a remédio, fecal, amargo, gorduroso e, ocasionalmente, podem produzir pigmentos (Walker, 1988; Monsallier, 1994; Richard e Desmazeud, 1997).

Leveduras e bolores:

O leite fresco raramente contém leveduras e bolores mas estes grupos são comuns no ambiente, particularmente no ar, alterando grande número de produtos lácteos (Walker, 1988).

A grande maioria das leveduras prolifera numa gama de temperaturas de 0 a 45°C e é classificada como mesófila, uma vez que a temperatura óptima de crescimento se situa entre os 25 e os 30°C. Outras têm temperaturas óptimas de crescimento abaixo de 20°C, sendo, por isso, consideradas psicrotróficas. As leveduras termófilas, raras e encontradas principalmente no tracto digestivo dos ruminantes, crescem acima dos 20°C, com temperaturas máximas de 46 a 48°C. Também as leveduras sal- e açúcar-tolerantes são capazes de crescer a 40°C, mas apenas em meio salino (Deák, 1991; Tokuoka, 1993; Bouix e Leveau, 1995).

Em geral, as leveduras não competem bem com a flora bacteriana, excepto quando as condições ambientais afectam a actividade bacteriana, como por

exemplo, quando os níveis de açúcar ou de sal são elevados ou o alimento é ácido (Walker, 1988; Loureiro e Ferreira, 1992; Bouix e Leveau, 1995). Também crescem dificilmente em leites refrigerados, em consequência da competição desenvolvida pelas bactérias psicrótróficas, com crescimento muito rápido (Fleet e Mian, 1987).

As leveduras toleram valores de a_w mais baixos que as bactérias (Jay, 1992; ICMSF, 1993). As dos géneros *Zygosaccharomyces* e *Schizosaccharomyces* e as espécies *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula anomala*, *Pichia membranefaciens*, *Candida famata* e *Torulaspota delbrueckii*, entre outras, são xerotolerantes, tolerando valores de a_w muito baixos (Jay, 1992; Loureiro e Ferreira, 1992; ICMSF, 1993; Tokuoka, 1993; Bouix e Leveau, 1995).

As leveduras são aeróbias estritas (*Rhodotorula*, *Debaryomyces*, algumas *Hansenula* e *Pichia*) ou anaeróbias facultativas. Entre estas últimas, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e algumas *Torulopsis* preferem um metabolismo fermentativo, mesmo em presença de oxigénio. Por outro lado, *Candida*, *Kluyveromyces*, a maioria de *Pichia* e *Hansenula* e parte de *Torulopsis* realizam um metabolismo respiratório em presença de oxigénio (Bouix e Levaeu, 1995).

Toleram uma gama vasta de pH proliferando facilmente entre 2,4 e 8,6 e suportando valores de 1,3 a 1,7, situando-se o seu pH óptimo de crescimento entre 4,5 e 6,5 (Deák, 1991; Jay, 1992; Loureiro e Ferreira, 1992; ICMSF, 1993; Bouix e Leveau, 1995). Apesar da membrana das células das leveduras ser praticamente impermeável aos iões H^+ e OH^- , o que lhes permite suportar os valores extremos de pH, a forma não dissociada dos ácidos orgânicos desenvolve uma forte acção inibidora, embora tal dependa do pH do meio (Bouix e Leveau, 1995).

De um modo geral, as leveduras utilizam glucose e frutose como fontes de energia e de carbono. Algumas utilizam ácidos orgânicos, sendo responsáveis por um aumento do pH do meio que favorece o crescimento

bacteriano, bem como a actividade de lipases e proteases. O azoto orgânico não é necessário para o metabolismo das leveduras que são capazes de crescer com amónia como única fonte de azoto. No entanto, dispõem de proteases e diversas peptidases (aminopeptidases, carboxipeptidases, di- e tripeptidases) e possuem também lipases e esterases, que lhes permitem usar a proteína e a gordura do leite. Degradam ainda amino-ácidos e ácidos gordos (Loureiro e Ferreira, 1982; Choisy et al., 1997b).

As leveduras podem ser encontradas na maioria dos habitats naturais, como no solo, nas plantas, nos animais e na água doce e salgada, que constituem as principais fontes de contaminação dos alimentos (Deák, 1991). Frequentemente surgem em frutas e vegetais ricos em açúcares facilmente assimiláveis, que são particularmente vulneráveis à deterioração por leveduras (Bouix e Leveau, 1995). Os insectos são os vectores mais importantes da sua disseminação na natureza (Deák, 1991).

Embora o leite cru esteja sujeito a muitas fontes de contaminação ambiental de leveduras, tal não acontece com leite pasteurizado. A ocorrência de leveduras no leite pasteurizado pode ter origem na contaminação pós-processamento mas a elevada frequência desta situação sugere que possam ter alguma tolerância para o processo de pasteurização, o que ainda não foi confirmado (Fleet, 1990; Deák, 1991).

Em saúde pública, o significado da presença das leveduras nos alimentos tem sido considerado, pela maioria das autoridades sanitárias, como menor e até negligenciável, uma vez que as poucas espécies patogénicas (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*) não são transmitidas através dos alimentos. Contudo, registaram-se casos em que se suspeitou que as leveduras foram causa de intoxicação alimentar e estiveram envolvidas em reacções alérgicas nos consumidores (Fleet, 1990).

Por outro lado, apesar de não patogénicas, o seu desenvolvimento pode levar à deterioração dos produtos, principalmente dos produtos lácteos

fermentados, cujo pH ácido favorece a sua proliferação, causando alterações de aspecto (turvação, opado das embalagens) e o aparecimento de cheiros e sabores anormais (Rohm et al., 1992; Bouix e Leveau, 1995).

As leveduras estão presentes no leite cru em populações consideradas insignificantes, ou seja menos de 10^3 células por mililitro, podendo ocasionalmente chegar a 10^4 células por mililitro. No leite sob refrigeração, estes valores são rapidamente ultrapassados pelas das bactérias psicotróficas mas, quando o crescimento bacteriano é inibido por antibióticos residuais, pode verificar-se a sua proliferação (Fleet e Mian, 1987; Fleet, 1990).

Apesar da sua fraca expressão no leite, as leveduras são importantes na indústria láctea por desempenharem um papel relevante e benéfico no fabrico de certos produtos fermentados e na maturação de certos queijos (Déak, 1991).

As leveduras presentes nos produtos lácteos caracterizam-se pela sua capacidade em fermentar ou assimilar a lactose, produzir enzimas extracelulares proteolíticas e lipolíticas, assimilar os ácidos láctico e cítrico, crescer a baixas temperaturas e tolerar concentrações elevadas de sal (Fleet, 1990).

Debaryomyces hansenii e *Kluyveromyces marxianus* bem como os seus equivalentes asporogéneos *Candida famata* e *C. kefyr*, respectivamente, são consideradas como as leveduras mais frequentes em produtos lácteos. As estirpes de ambas as espécies tem capacidades variáveis para produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas e, portanto, para metabolizarem a proteína e a gordura do leite mas *D. hansenii* tem boa tolerância ao sal, principal ingrediente usado na manufactura de alguns queijos, e *K. marxianus* é conhecido pela sua propriedade de produzir β -galactosidase e, consequentemente, poder fermentar ou assimilar a lactose, principal glúcido do leite (Fleet e Mian, 1987; Fleet, 1990).

Saccharomyces cerevisiae e *Candida famata* têm capacidade para utilizar o ácido láctico presente no meio e que não é metabolizado pelas outras espécies (Fleet e Mian, 1987). O seu crescimento pode determinar um aumento no pH até à neutralidade permitindo o crescimento de bactérias como *Pseudomonas* ou outras responsáveis ou não pela deterioração do produto (Jay, 1992).

Frequentemente estão presentes no leite cru leveduras pigmentadas do género *Rhodotorula*. Também se isolaram, por ordem decrescente de frequência, *Candida famata*, *Kluyveromyces marxianus*, *C. diffluens*, *Cryptococcus flavus* e *C. blankii*, provavelmente devido à sua capacidade em produzir proteases e lipases extracelulares e crescer a temperaturas de cerca de 5°C (Fleet e Mian, 1987; Fleet, 1990). Para Deák (1991), *Cryptococcus curvatus* foi isolada mais frequentemente, seguida de *Geotrichum candidum* e *Debaryomyces hansenii*. Menos frequentes foram *Pichia membranefaciens*, *Yarrowia lipolytica* e *Kluyveromyces marxianus*.

Microrganismos responsáveis por alterações de origem alimentar:

Sendo o leite um bom meio de crescimento para muitas espécies bacterianas, pode constituir o habitat de espécies que representam um risco para a saúde pública.

As perturbações ou doenças de origem alimentar resultam directamente do crescimento e sobrevivência de microrganismos indesejáveis no alimento e que, de acordo com Zottola e Smith (1993), podem ser classificadas em intoxicações, infecções ou toxinfecções alimentares.

As intoxicações alimentares são causadas pela ingestão de um alimento que contém uma toxina produzida durante o crescimento microbiano, não sendo necessária, no momento do consumo, a presença do microrganismo viável, no alimento. *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus* são

microrganismos que podem ser responsáveis por intoxicações alimentares (Zottola e Smith, 1993; Burgess et al., 1994).

As infecções alimentares devem-se ao consumo de alimentos que contém bactérias patogénicas. É essencial a ingestão de microrganismos viáveis e é necessário que estes tenham capacidade para colonizar o tracto gastrointestinal, crescer e danificar os tecidos de um hospedeiro susceptível à sua acção. O microrganismo tem que estar presente no alimento, que oferecerá as condições adequadas para o seu crescimento, embora este possa ou não ocorrer. O número de microrganismos envolvidos nas infecções alimentares é geralmente baixo e os microrganismos mais frequentemente envolvidos nestas situações pertencem aos géneros *Brucella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* (Zottola e Smith, 1993; Burgess et al., 1994).

As toxinfecções alimentares são essencialmente uma combinação de intoxicação e de infecção alimentares. É necessária a ingestão de um alimento que ofereça condições favoráveis ao crescimento de microrganismos de modo a que sejam ingeridos em números elevados. Para que surja a perturbação, as bactérias continuam a crescer no intestino, libertando a toxina, devendo o hospedeiro ser susceptível à sua acção. Nestas situações podem estar implicados *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* enterotoxigénica (Zottola e Smith, 1993).

As bactérias patogénicas que se podem encontrar no leite podem ter origem nas infecções mamárias, mas o ambiente (solo, camas, dejectos e água) e o próprio homem são fontes de contaminação consideráveis. Duma maneira geral, a refrigeração do leite atrasa o seu crescimento mas não as destrói. Os tratamentos pelo calor, bem conduzidos, são normalmente eficazes na eliminação da maioria dos microrganismos, à excepção de certos microrganismos esporulados termoresistentes e de algumas toxinas termoestáveis (Monsallier, 1994).

Apesar da inegável importância da presença destes microrganismos no leite e produtos lácteos, apenas prestaremos alguma atenção áqueles que foram estudados no âmbito deste trabalho, ou seja, *Staphylococcus aureus*, *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

Staphylococcus aureus:

Staphylococcus aureus e outras espécies estafilocócicas produtoras de enterotoxinas são, provavelmente, a causa principal de perturbações de origem alimentar no mundo, apesar da incidência relativa nos vários países variar substancialmente, dependendo do local geográfico e dos hábitos alimentares (Mossel e van Netten, 1990; Gilmour e Harvey, 1990; Asperger, 1994).

A intoxicação estafilocócica resulta da ingestão de alimentos contendo enterotoxinas termoestáveis pré-formadas por *Staph. aureus*, sendo frequentemente os produtos lácteos, nomeadamente leite cru e queijos, o veículo destas enterotoxinas (Martin e Myers, 1994; Ryser, 1998).

Algumas estirpes de *Staph. intermedius*, *Staph. hyicus* e *Staph. chromogenes* são também capazes de produzir enterotoxinas mas, em geral, a espécie mais frequentemente envolvida em surtos de intoxicação alimentar é *Staph. aureus* (Gilmour e Harvey, 1990).

Staphylococcus aureus pertence ao género *Staphylococcus* cujas características gerais foram referidas anteriormente. A principal característica que permite diferenciar esta espécie de outros estafilococos e que tem sido correlacionada com a produção de enterotoxinas é a produção de coagulases e de termonucleases (TNases), embora outras espécies, *Staph. intermedius* e *Staph. hyicus*, também sejam coagulase e TNase positivas (Kloss e Schleifer, 1986; Jay, 1992; Asperger, 1994; De Buyser, 1995; Ryser, 1998).

Staphylococcus aureus é um contaminante vulgar do leite cru, dado que além de estar presente na pele e mucosas dos animais e poder ser encontrado no equipamento de ordenha, é um dos agentes etiológicos de mamites nos efectivos leiteiros (Asperger, 1994; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997; Ryser, 1998).

Frequentemente, a contaminação do leite por *Staph. aureus* tem origem no Homem pois as fossas nasais e as vias respiratórias superiores constituem um importante reservatório desta bactéria. A partir destas zonas, pode ser disseminada para o resto do corpo, nomeadamente pele das mãos, braços e rosto, e para o ambiente. São também fontes importantes de *Staph. aureus* as infecções dermoepidémicas que contém concentrações localizadas e muito elevadas de microrganismos patogénicos, muitas vezes em cultura pura (Gilmour e Harvey, 1990; Mossel e van Netten, 1990; Jay, 1992; Asperger, 1994; Burgess et al., 1994; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997)

Assim, a presença de *Staphylococcus aureus* no leite pode constituir um indicador da contaminação do úbere do animal produtor, principal fonte deste microrganismo, e da pele e vias respiratórias superiores dos manipuladores do produto, revelando práticas pouco higiénicas (Mossel e van Netten, 1990; Asperger, 1994).

As intoxicações alimentares por estafilococos surgem 1 a 6 horas após o consumo de alimentos em que ocorreu a multiplicação de *Staph. aureus* e a produção de enterotoxinas. Estas são resistentes à maioria das enzimas proteolíticas e a pH 2,0, o que lhes permite atravessar o tracto digestivo sem perda de actividade. São termoresistentes e, embora os microrganismos sejam rapidamente destruídos por pasteurização, as enterotoxinas não são facilmente inactivadas nem mesmo durante a confecção de alimentos. Dependendo da enterotoxina considerada, a sua produção ocorre na fase logarítmica de crescimento ou no início da fase estacionária (Kloss e Schleifer, 1986; Jay, 1992; Asperger, 1994; Ryser, 1998).

A enterotoxigenese é especialmente afectada pela temperatura, pH, a_w e presença de oxigénio, sendo o intervalo de valores destes parâmetros mais estreito para a produção de enterotoxinas que para o crescimento do microrganismo. Apesar de se observar crescimento a 10°C, a produção de enterotoxinas só ocorre com temperaturas superiores a 15°C e a pH superior a 5,0, sendo o pH óptimo de 6,5 a 7,5. Ao contrário de muitos microrganismos patogénicos, *Staph. aureus* pode crescer com valores de a_w de 0,83, em presença de 20% de NaCl, embora só produza enterotoxinas com valores superiores a 0,86. As condições aeróbias parecem favorecer a produção de enterotoxinas. Embora a bactéria se possa multiplicar em condições de anaerobiose, a sua população não atinge a dimensão da que cresce em aerobiose (Mossel e van Netten, 1990; Jay, 1992; Asperger, 1994; Martin e Myers, 1994; Ryser, 1998).

A presença de flora competidora também influencia o crescimento e produção de enterotoxinas que, nestas circunstâncias são, geralmente, fracos (Jay, 1992; Ryser, 1998).

Staphylococcus aureus não compete bem com a flora natural da maior parte dos alimentos, principalmente dos que tem uma elevada população de bactérias lácticas, cuja actividade acidificante e/ou a produção de substâncias inibidoras, nomeadamente bacteriocinas, inibe o seu crescimento (Jay, 1992; Asperger, 1994). Também revela uma certa incapacidade em competir com a flora psicrótrfica, em alimentos refrigerados e congelados. As temperaturas favoráveis ao seu crescimento também o são para os psicrótrficos que se multiplicam mais rapidamente e exercem os seus efeitos antagonistas quer competindo pelos nutrientes quer modificando as condições ambientais. Entre os antagonistas incluem-se *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staph. epidermidis*, enterobacteriáceas, lactobaciláceas, enterococos e outros, cuja proliferação, geralmente, causa alterações nos produtos, facilmente detectadas antes de *Staph. aureus* atingir populações suficientes para a produção de quantidades de enterotoxinas clinicamente significativas (10^5 - 10^6 microrganismos/g de

alimento (Mossel e van Netten, 1990; Jay, 1992; Asperger, 1994; Burgess et al., 1994; De Buyser, 1995).

Mas em alimentos com a_w 0,95 ou inferior, os microrganismos responsáveis pela deterioração não crescem e os estafilococos podem proliferar livremente, a não ser que a temperatura dificulte o seu crescimento. É por isso que os alimentos com baixa a_w são responsáveis por muitos surtos de intoxicação por enterotoxinas estafilocócicas (Mossel e van Netten, 1990; Asperger, 1994).

Uma vez que não é possível eliminar totalmente a contaminação do leite por *Staph. aureus*, dada a sua elevada disseminação, o controlo da intoxicação estafilocócica assenta, principalmente, na limitação do nível da contaminação inicial, através da aplicação de rigorosas medidas de higiene, e na inibição do crescimento destes microrganismos nos alimentos. O rastreio de mamites, associado a melhoramentos na manipulação e conservação do leite, nomeadamente evitando temperaturas superiores a 10°C, diminuem bastante o risco de intoxicação. A actividade das culturas de arranque durante a fermentação dos produtos lácteos é também um importante factor no controlo da população de *Staph. aureus* (Mossel e van Netten, 1990; Jay, 1992; Asperger, 1994; Ryser, 1998).

Brucella spp.:

A brucelose, também designada por Febre de Malta, Febre Mediterrânica ou Febre Ondulante, constitui uma importante antropozoonose, devido à frequência e gravidade de casos humanos adquiridos directa ou indirectamente a partir dos animais e dos seus produtos. Prevalece nos países da região Mediterrânica e da Península Arábica, podendo afectar numerosas espécies de animais domésticos e silvestres (não só ruminantes mas também suínos, carnívoros, equídeos, leporídeos e roedores) (Garin-Bastuji e Verger, 1994; Halling e Young, 1994; Ryser, 1998).

Nas espécies pecuárias é responsável por elevadas perdas económicas, devido a perturbações reprodutivas, nomeadamente abortos, infertilidade e quebras na produção de leite, além de depreciar o valor comercial dos animais provenientes de efectivos infectados. Na espécie humana, está frequentemente ligada às populações rurais e à exploração animal, atingindo frequentemente pastores, médicos-veterinários, técnicos de laboratório, pessoal de matadouros e outros que trabalham com animais e seus produtos (Garin-Bastuji e Verger, 1994; Halling e Young, 1994).

As bactérias do género *Brucella* distribuem-se por seis espécies: *Brucella abortus*, *Br. melitensis*, *Br. suis*, *Br. ovis*, *Br. canis* e *Br. neotomae*, com grande semelhança genética, permitindo que seja considerada a existência de uma única espécie dentro do género. Contudo, dadas as diferentes propriedades bioquímicas, culturais e patogénicas, correlacionadas com a especificidade do hospedeiro, do ponto de vista epidemiológico, é relevante a divisão entre espécies. *Br. abortus* e *Br. melitensis* são, de entre as espécies isoladas de animais domésticos, as mais disseminadas, sendo a última especialmente patogénica para o Homem (Corbel e Brinley-Morgan, 1984; Garin-Bastuji e Verger, 1994; Ryser, 1998).

São cocobacilos ou pequenos bacilos Gram negativos, aeróbios, imóveis, não esporulados, encontrados isolados, em pares ou em cadeias curtas. São capazes de crescer aerobicamente, entre 10 e 40°C, com crescimento óptimo a 37°C, embora algumas estirpes necessitem de cerca de 5 a 10% de CO₂. O pH de crescimento é de 6,6 a 7,4, sendo o óptimo de 6,8. Toleram uma concentração máxima de NaCl de 1% e são nutricionalmente exigentes, requerendo vários amino-ácidos e vitaminas e, ocasionalmente, soro sanguíneo. Reduzem os nitratos a nitritos, são sempre catalase positivo mas oxidase variável e não evidenciam capacidade para acidificar os meios de açúcares em testes convencionais (Corbel e Brinley-Morgan, 1984; Garin-Bastuji e Verger, 1994; Halling e Young, 1994; Ryser, 1998).

Os principais reservatórios de infecção para a espécie humana são os ovinos e caprinos (*Br. melitensis*), os bovinos e os búfalos (*Br. abortus*) e os suínos (*Br. suis*), sendo a sua susceptibilidade variável e dependente do estado reprodutivo. A brucelose é essencialmente uma doença da maturidade sexual e da gestação. Em animais gestantes manifesta-se, geralmente, pelo aborto e nos não gestantes pode manter-se latente por longos períodos, dependendo da sua idade e resistência (Garin-Bastuji e Verger, 1994; Halling e Young, 1994).

As principais fontes de contaminação do meio ambiente (camas, estrumes, solo, pastagens e utensílios) são as secreções útero-vaginais, o feto e seus invólucros e o líquido amniótico, provenientes do aborto ou do parto normal e o leite de animais infectados, que podem conter quantidades elevadas de *Brucella* (Garin-Bastuji e Verger, 1994).

As vias de infecção mais comuns são, geralmente, a oral, através da ingestão de alimentos contaminados, e a conjuntival, mas a pele lesionada também pode constituir uma porta de entrada importante. A transmissão indirecta, através de utensílios contaminados ou de animais vectores (insectos, roedores, cães) contribuem para manter a cadeia de infecção (Garin-Bastuji e Verger, 1994).

Assim, a brucelose é transmitida ao Homem, principalmente, por via alimentar, pela ingestão de leite cru e seus derivados, em particular produtos lácteos frescos, e pelo consumo de carne crua e certos produtos cárneos, provenientes de animais infectados, ou por contacto directo, através da pele ou mucosas (Garin-Bastuji e Verger, 1994; Halling e Young, 1994; Ryser, 1998).

Apesar de ser um parasita intracelular, *Brucella* spp. demonstra alguma capacidade para resistir fora do seu hospedeiro, quando o pH, a temperatura, a humidade e as condições de luminosidade lhe são favoráveis. Para valores de pH superiores a 4, temperatura baixa, elevada humidade e ausência de

luz directa, a bactéria pode sobreviver, durante vários meses na água, solo, fetos abortados e membranas fetais, fezes, dejectos líquidos, lã, feno, carcaças de animais, instalações, equipamento e roupa. Em presença de material orgânico, suporta a secagem, permanecendo viável no pó e no solo, sendo a sua sobrevivência prolongada a baixas temperaturas, especialmente a temperaturas de refrigeração. No entanto, a pasteurização destroi eficazmente este microrganismo e os desinfectantes vulgares, exceptuando os compostos de amónio quaternário, em concentrações apropriadas, também a inactivam (Garin-Bastuji e Verger, 1994; Halling e Young, 1994; Ryser, 1998).

A actividade biológica de outros microrganismos também influencia a sua sobrevivência pois embora se possa manter durante vários meses no leite estéril após inoculação, morre em dez dias em leite naturalmente contaminado. Por outro lado, submetida a 25-37°C neste produto, as populações de *Brucella* spp. decrescem acentuadamente em 2 a 3 dias, mas sobrevivem 42 e 800 dias se for mantido a 4°C e -40°C, respectivamente (Halling e Young, 1994; Ryser, 1998).

Os surtos de brucelose humana estão principalmente relacionados com o consumo de leite cru proveniente de animais infectados, especialmente de ovinos e caprinos. A sua prevenção baseia-se na eliminação da doença dos efectivos, através da aplicação de programas de erradicação eficazes, na pasteurização do leite e na maturação, pelo menos durante 60 dias, dos queijos que legalmente podem ser fabricados com leite cru. O risco de contrair brucelose é especialmente elevado em países onde a doença é endémica, pela ingestão de leite não pasteurizado e derivados fabricados a partir desta matéria-prima (Halling e Young, 1994; Ryser, 1998).

Listeria monocytogenes:

Listeria monocytogenes é o agente causal de listeriose em humanos e animais. Atingindo principalmente indivíduos cujo sistema imunitário se encontra alterado, esta doença é responsável, nas mulheres grávidas, por abortos, partos prematuros ou nados-mortos e nos recém-nascidos e nos adultos imunodeprimidos causa meningites, encefalites e septicémias, com elevadas taxas de mortalidade (Farber e Peterkin, 1991; Catteau, 1995b; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997; Ryser, 1998).

De entre os mamíferos domésticos, os ovinos, os caprinos e os bovinos são os mais frequentemente atingidos por *L. monocytogenes* que provoca abortos, encefalites e, mais raramente, mamites (Donnelly, 1994; Ryser, 1998)

O género *Listeria*, que inicialmente foi descrito como uma única espécie, *Listeria monocytogenes*, actualmente é constituído por sete espécies distribuídas por dois ramos: um deles inclui *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, e o outro, *L. grayi* e *L. murrayi*. Em *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas identificaram-se dezasseis serovariedades enquanto que *L. grayi* e *L. murrayi* são antigenicamente idênticas, embora diferentes das outras espécies (Farber e Peterkin, 1991; Jay, 1992; Catteau, 1995b).

São bacilos Gram positivos, pequenos, regulares, de bordos arredondados, não capsulados e não esporulados. Podem aparecer isolados, em pequenas cadeias, em disposição paralela ou em V. Com dois cílios de implantação períttrica, são móveis entre 20 e 25°C e, quando observados entre lâmina e lamela, mostram movimentos de rotação “em cambalhota” (Seeliger e Jones, 1986; Donnelly, 1994; Prentice, 1994; Catteau, 1995b; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997; Ryser, 1998).

São aeróbios e anaeróbios facultativos, evidenciando, por isso, maior crescimento sob baixos teores de oxigénio. São catalase positivo e oxidase negativo e fermentam alguns açúcares, com produção de ácido láctico (Seeliger e Jones, 1986; Jay, 1992; Donnelly, 1994; Catteau, 1995b).

Uma das características importantes das bactérias do género *Listeria* é a sua capacidade de crescimento num largo espectro de condições culturais, sendo *L. monocytogenes* invulgarmente tolerante a ambientes extremos. Crescem facilmente em meios de cultura usuais, demonstrando um crescimento exuberante em meios enriquecidos com glucose, soro ou sangue evidenciando, nestes últimos, alguma hemólise (Jay, 1992; Guerra, 1995).

Geralmente consideradas mesófilas, uma vez que a temperatura óptima de crescimento se situa entre 30 e 37°C, exibem propriedades psicrotróficas pois podem multiplicar-se entre 1 e 45°C, podendo algumas estirpes crescer abaixo de 1°C ou acima de 50°C, embora não sobrevivam ao aquecimento a 60°C durante 30 minutos (Seeliger e Jones, 1986; Jay, 1992; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997; Ryser, 1998).

O pH óptimo de crescimento, de 6 a 9, situa-se próximo da neutralidade ou é levemente alcalino, mas também é possível o crescimento entre 4,3 e 10. Tal como acontece com outras bactérias, o pH mínimo de crescimento depende de vários factores, entre eles a temperatura de incubação, a composição do substrato de crescimento, a a_w e a presença e concentração de NaCl e de outros sais e inibidores (Seeliger e Jones, 1986; Jay, 1992; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997; Ryser, 1998).

Listeria monocytogenes é sensível aos ácidos, sendo o seu crescimento influenciado pelo pH do meio, pelo tipo de ácido utilizado e também pela temperatura a que está sujeita. Assim, para valores de pH mais elevados, o ácido láctico é mais inibidor que o ácido acético, observando-se o inverso quando o pH é mais baixo. Para o mesmo valor de pH ácido, a actividade antimicrobiana do ácido acético é a mais acentuada, seguindo-se, por ordem

decrecente, a dos ácidos láctico, cítrico, málico e clorídrico. Considerando o mesmo valor de pH e o mesmo ácido, a sua eficácia é maior à medida que a temperatura diminui (Pearson e Marth, 1990; Farber e Peterkin, 1991; El-Shenawy e Marth, 1992; Jay, 1992; Buchanan et al., 1993).

Contudo, a resistência desta espécie a pH ácido pode estar significativamente aumentada quando exposta a valores de pH sub-letais, como os que se registam em alimentos naturalmente acídicos ou modificados pela acção de ácidos orgânicos utilizados para a sua conservação (Datta e Benjamin, 1997).

É halotolerante, uma vez que sobrevive em meios com elevadas concentrações de sal (10% NaCl). Durante curtos períodos de tempo, *L. monocytogenes* tolera teores de cerca de 20% de NaCl (a_w 0,86), pode permanecer viável após um ano, em 16% de NaCl (a_w 0,90) e sobreviver, durante 4 meses, em solução refrigerada de salmoura a 25,5% de NaCl. O valor óptimo de a_w é de 0,97 e sobrevive a 0,92 (10% de NaCl), considerado como valor mínimo tolerado por esta espécie (Seeliger e Jones, 1986; Jay, 1992; Prentice, 1994; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997; Ryser, 1998).

Quando os outros parâmetros de crescimento são favoráveis, *L. monocytogenes* é capaz de crescer a pH 5 ou a a_w 0,94 ou à temperatura de 1°C (Catteau, 1995b)

Algumas estirpes de *L. monocytogenes* são β -hemolíticas, exibindo uma hemólise acentuada no teste CAMP com *Staph. aureus* (Seeliger e Jones, 1986) e com *Corynebacterium equi* (Mc Kellar, 1994).

Listeria monocytogenes é ubiqüitária no meio ambiente e está frequentemente associada ao solo, água, esgotos, vegetação e fezes de várias espécies de aves e mamíferos, incluindo o Homem, que representam fontes de contaminação para uma grande variedade de alimentos e de

ambientes onde se realiza a sua manipulação (Seeliger e Jones, 1986; Donnelly, 1990; Jay, 1992; Donnelly, 1994; Prentice, 1994; Catteau, 1995b).

Em geral, as bactérias do género *Listeria* estão presentes em ambientes onde existem bactérias lácticas ou corineformes, relacionando-se frequentemente com produtos lácteos e silagens. Têm sido detectadas em leite cru, queijo, especialmente pouco maturado, e também em carnes cruas de porco, aves e vaca, em refeições pré-confeccionadas e patés, em diversos vegetais e saladas como batatas, cenouras, rabanetes, couve-flor, bróculos, repolho, tomate, alface, aipo e em peixe, moluscos bivalves e marisco (Farber e Peterkin, 1991; Jay, 1992; Donnelly, 1994; Catteau, 1995b).

A contaminação do leite cru pode fazer-se através da glândula mamária, devido à excreção de *L. monocytogenes* no leite de animais com mamite. Contudo, com maior frequência, é feita a partir do ambiente, designadamente do solo, da água, das fezes dos animais portadores ou doentes, das instalações e alojamentos por eles ocupados, das instalações e equipamentos fabris e das mãos dos manipuladores de alimentos (Pearson e Marth, 1990; Kerr et al., 1993; Sanaa et al., 1993; Donnelly, 1994; Prentice, 1994; Sanaa e Ménard, 1994; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997).

Ao consumirem alimentos contaminados, os animais podem infectar-se, excretando depois o microrganismo nas fezes. Estas, conspurcando a superfície do úbere e tetos, facilmente contaminarão o leite cru, quer directamente, quer através das mãos dos ordenhadores e do equipamento de ordenha, caso não sejam escrupulosamente seguidas as regras de higiene da ordenha (Sanaa et al., 1993; Donnelly, 1994; Prentice, 1994; Sanaa e Ménard, 1994; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997).

A silagem é um dos alimentos que, frequentemente, pode estar contaminado por *L. monocytogenes*. A incidência desta espécie bacteriana é especialmente elevada quando é consumida silagem de fraca qualidade,

principalmente quando a produção de ácido é insuficiente para inibir o seu crescimento. A correlação observada entre o consumo desta forragem e a ocorrência listeriose levou a que fosse conhecida como a “doença da silagem” (Sanaa et al., 1993; Donnelly, 1994; Prentice, 1994; Sanaa e Ménard, 1994; Fenlon et al., 1996).

A utilização de dejectos de animais infectados como estrume representa, também, uma fonte de disseminação da bactéria e pode originar infecções por *L. monocytogenes* relacionadas com o consumo de vegetais. Esta bactéria também foi detectada no ambiente doméstico, nomeadamente cozinhas e frigoríficos de indivíduos que contraíram listeriose (Donnelly, 1994; Prentice, 1994).

De uma maneira geral, a contaminação dos produtos alimentares resulta principalmente de uma contaminação durante o processamento. Quando *L. monocytogenes* contamina uma fábrica pode aí sobreviver e multiplicar-se expressivamente, especialmente se as condições lhes forem favoráveis, nomeadamente se a temperatura for baixa e se estiver protegida pelos componentes alimentares (Farber e Peterkin, 1991; Fenlon et al., 1996).

Embora *L. monocytogenes* possa suportar as condições mínimas de pasteurização (HTST - 72°C em 16,2s), uma vez que desenvolve alguma termotolerância quando, previamente, foi sujeita a temperaturas sub-letais, o seu número pode ser significativamente reduzido ou mesmo anulado por este processo, se realizado nas condições habituais, em que a temperatura é ligeiramente superior. A localização intracelular da bactéria também pode desempenhar um papel protector permitindo-lhe sobreviver à pasteurização, embora se torne mais vulnerável se as células do hospedeiro forem danificadas. Os produtos pasteurizados não constituem, portanto, problema de saúde pública, excepto se houver contaminação cruzada após a pasteurização, a partir das instalações, equipamentos e pessoal das fábricas, principais fontes de contaminação dos produtos alimentares (Donnelly, 1990; Pearson e Marth, 1990; Farber et al., 1992; Canillac e Mourey, 1993; Sanaa

et al., 1993; Donnelly, 1994; Catteau, 1995b; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997).

Sob o ponto de vista da saúde pública, a capacidade de sobrevivência desta espécie a temperaturas baixas é relevante para o leite e produtos lácteos. Embora a carga microbiana inicial de *L. monocytogenes* em leite cru naturalmente contaminado possa ser pequena, pode aumentar significativamente em poucos dias de armazenamento a baixas temperaturas (10°C e 8°C). Também é importante o facto de *L. monocytogenes* ser mais virulenta quando o seu crescimento ocorre a baixas temperaturas. Por outro lado, a população de *L. monocytogenes* que, embora danificada, sobrevive ao tratamento térmico do leite, provavelmente não recupera durante o período de validade do produto, se este for mantido a baixas temperaturas. Por isso, é importante que o leite seja convenientemente manipulado e refrigerado a 4°C, com vista a minimizar o crescimento da bactéria e impedir a sua disseminação (Donnelly, 1990; Pearson e Marth, 1990; Jay, 1992; Meyer e Donnelly, 1992; Sanaa et al., 1993; Prentice, 1994; Ryser, 1998).

Frequentemente, *L. monocytogenes* é isolada das mãos dos manipuladores de alimentos, verificando-se que esta espécie é capaz de aí sobreviver durante algum tempo promovendo a contaminação cruzada dos alimentos a partir do ambiente. Embora seja difícil determinar a fonte de contaminação precisa de *Listeria* spp., é provável que sejam os próprios alimentos, devido à frequência com que o pessoal contacta com produtos crus associada a práticas incorrectas na lavagem das mãos (lavagem pouco cuidada, muito rápida, sem sabão, secagem das mãos em toalhas sujas, etc.) (Kerr et al., 1993).

Tem-se verificado que *L. monocytogenes* é sensível aos vários produtos desinfectantes utilizados rotineiramente (compostos de amónio quaternário, ácidos aniónicos, iodados e clorados), apesar de ser reconhecido que tem alguma capacidade de recuperar dos danos sub-letais induzidos por estes compostos. Assim e uma vez mais, se impõe o cumprimento de regras de

higiene convenientes durante a manipulação dos alimentos como forma de limitar a carga microbiana e evitar a acumulação de películas que, normalmente, são mais resistentes aos desinfectantes que as formas planctónicas (Mafu et al., 1990; Pearson e Marth, 1990; Krysinski et al., 1992; Sallan e Donnelly, 1992; Prentice, 1994).

Durante o armazenamento do leite cru a temperaturas de refrigeração, o SLP tem algum efeito bactericida sobre *L. monocytogenes*, prevenindo o seu crescimento e reduzindo, significativamente o seu número. Além disso, a fracção que sobrevive a este efeito torna-se mais susceptível à destruição térmica, em consequência de danos causados nas membranas celulares (Kamau et al., 1990; Gaya et al., 1991; Zapico et al., 1993; Rodríguez et al., 1997).

Assim, a activação deste sistema, em conjunto com o processamento térmico, pode ser um procedimento viável no controlo do desenvolvimento de *L. monocytogenes* em leite cru refrigerado, ao reduzir a resistência térmica desta bactéria, alargando a margem de segurança do produto em relação a este microrganismo e aumentando a sua durabilidade (Kamau et al., 1990; Gaya et al., 1991).

Sob o ponto de vista tecnológico e de saúde pública, *L. monocytogenes* estabelece relações importantes com diversos grupos bacterianos com os quais partilha nichos ambientais comuns. A actividade proteolítica de *Pseudomonas* spp. exerce um papel estimulante do crescimento de *L. monocytogenes* (Wenzel e Marth, 1990; Marshall e Schmidt, 1991).

Os produtos do metabolismo das bactérias lácticas - ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio, bacteriocinas e outras substâncias - exercem frequentemente acções antagónicas, inibindo o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*. A inibição desta bactéria também tem sido atribuída à depleção de nutrientes provocada pela rápida multiplicação das bactérias

láticas (Wenzel e Marth, 1990; Motlagh et al., 1991; Tharrington e Sorrells, 1992; Östling e Lindgren, 1993; Raccach e Geshell, 1993).

No entanto, reconhece-se que os mecanismos antagónicos exercidos pelas bactérias láticas reduzem a população de *L. monocytogenes*, mas podem não a eliminar completamente, sendo primordial a prevenção da contaminação dos produtos através de estritas medidas higiénicas (Wenzel e Marth, 1990).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* é um bom inibidor de *L. monocytogenes* por ser um grande produtor de ácido. Outros microrganismos como *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* também são responsáveis pela inibição de populações de *L. monocytogenes* não só à custa do ácido que produzem mas também do peróxido de hidrogénio, do diacetil e das bacteriocinas que podem actuar separadamente ou em associação (Abdalla et al., 1993; Raccach e Geshell, 1993).

Determinadas bacteriocinas produzidas pelas bactérias láticas actuam contra *L. monocytogenes*, bactéria filogeneticamente próxima daquelas. Segundo Héchard et al. (1993), à excepção da nisina, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e da sakacina A, produzida pelo *Lactobacillus sakei*, todas as bacteriocinas contra *Listeria* spp. caracterizadas na literatura são produzidas por *Pediococcus* (pediocinas) ou *Leuconostoc* (leucocinas e mesentericinas) que, dadas as características comuns que partilham, provavelmente, fazem parte de uma mesma família de proteínas.

Mas também tem sido atribuída a várias estirpes de *Enterococcus faecium* e *Ent. faecalis* presentes em diversos sistemas alimentares, a capacidade de produzirem bacteriocinas, geralmente designadas por enterocinas, que exibem efeitos bactericidas sobre *L. monocytogenes* (Farias et al., 1994; Tarelli et al., 1994; Ennahar et al., 1998).

Tal como a maioria das bacteriocinas, não evidenciam efeitos líticos mas alteram a permeabilidade da membrana bacteriana, causando o efluxo de iões intracelulares e, conseqüentemente, a despolimerização da membrana celular e dissipação da PMF das células sensíveis (Christensen e Hutkins, 1992; Ennahar et al., 1998).

Em geral, as enterocinas tem um espectro de actividade muito estreito, o que constitui uma vantagem, na medida em que demonstra uma certa selectividade, inibindo as células de *L. monocytogenes* e não afectando as bactérias lácticas. Esta característica torna particularmente útil e promissora a sua utilização em sistemas alimentares em que as fermentações devem ocorrer livremente mas onde *L. monocytogenes* deve ser inibida. Por outro lado, actuam rapidamente, induzindo a morte das células susceptíveis. Suportam grandes variações de pH e, embora sensíveis a enzimas proteolíticas, são resistentes aos agentes coagulantes (Parente e Hill, 1992b; Villani et al., 1993; Farias et al., 1994; Giraffa et al., 1994; Tarelli et al., 1994; Ennahar et al., 1998).

A capacidade de actuarem com valores de pH ácido e com temperaturas como as que são utilizadas durante a maturação do queijo bem como a sua resistência à acção do coalho é também importante quando são utilizadas neste produto, conferindo-lhe uma boa protecção contra *L. monocytogenes* durante a maturação, sem alterar o processo de manufactura (Parente e Hill, 1992c; Giraffa et al., 1994; Tarelli et al., 1994; Ennahar et al., 1998).

Outras bacteriocinas como a bavaricina, produzida pelo *Lactobacillus bavaricus* e *Lb. sakei* (Larsen e NØrrung, 1993; Kaiser e Montville, 1996) e a piscicolina, produzida pelo *Carnobacterium piscicola* (Wan et al., 1997) também revelaram actividade anti-Listeria.

Inicialmente, *L. monocytogenes* foi reconhecida como patogénica para os animais e suspeitava-se que o Homem contraía a doença por contacto directo com eles. Actualmente, considera-se que a disseminação da doença

animal a animal é excepcional e sabe-se que é contraída oralmente, tendo sido sugerido o ciclo: animal infectado, excreção de *L. monocytogenes* nas fezes e na urina, contaminação do solo, crescimento em condições favoráveis, por exemplo em silagem de fraca qualidade, e infecção pelo consumo de alimentos contaminados, constituindo, o tubo digestivo, uma importante via de entrada e saída da bactéria (Donnelly, 1994; Prentice, 1994).

Apesar de surgirem alguns surtos, devido ao consumo de produtos alimentares contaminados, a listeriose ocorre principalmente em casos esporádicos (Farber e Peterkin, 1991; Sanaa et al., 1993; Donnelly, 1994).

Devido à sua larga distribuição no ambiente, o Homem contacta frequentemente com *Listeria monocytogenes*, o que é confirmado pela frequência com que este microrganismo é detectado nas fezes de humanos saudáveis não sendo, por isso, a sua presença indicativa de infecção (Farber e Peterkin, 1991; Donnelly, 1994).

A simples exposição ao microrganismo não determina a infecção. No Homem e, provavelmente nos animais, a listeriose apresenta-se como uma infecção oportunista, que pode causar casos graves. Estas infecções surgem quando há alteração nos mecanismos de defesa, principalmente déficit de imunidade celular, provavelmente porque esta bactéria se pode multiplicar no interior das células (Farber e Peterkin, 1991; Donnelly, 1994; Ryser, 1998).

Assim, a listeriose está muitas vezes associada a doenças malignas, a tratamentos imunossupressores ou a situações em que as defesas orgânicas se encontram alteradas ou reduzidas, estando larga mas não exclusivamente restringida a mulheres grávidas, recém-nascidos e imunodeprimidos. Neste último grupo, além dos indivíduos sujeitos a tratamentos imunossupressores como os submetidos a transplante de órgãos, incluem-se também os idosos e os indivíduos com doenças malignas como o cancro, os portadores de VIH e indivíduos com SIDA, os alcoólicos e os indivíduos sujeitos a tratamentos

gástricos anti-ácido e anti-úlceras. O desenvolvimento de listeriose também é afectado por outros factores como a acidez gástrica, o tamanho do inóculo, a estirpe de *L. monocytogenes* e aspectos relacionados com a virulência do microrganismo (Farber e Peterkin, 1991; Burgess et al., 1994; Donnelly, 1994; Prentice, 1994; Ryser, 1998).

A dose infecciosa é bastante variável, mas elevada para a maior parte dos indivíduos saudáveis. Para os indivíduos susceptíveis, a ingestão de alimentos contendo mais de 10^3 células/g constitui um risco. Contudo, para além da susceptibilidade do hospedeiro, o número de células capaz de causar doença depende de outros factores, entre eles as diferenças entre estirpes bacterianas, uma vez que nem todas são virulentas (Farber e Peterkin, 1991; Burgess et al., 1994; Czuprynski, 1994; Prentice, 1994; Datta e Benjamim, 1997; Ryser, 1998).

Após a ingestão e uma vez no intestino, a estirpe virulenta adere e penetra nas células epiteliais deste órgão, invade as placas de Peyer e, através da via linfática entra na corrente sanguínea, atingindo o baço, o fígado, o sistema nervoso central e, nas gestantes, a placenta (Farber e Peterkin, 1991; Czuprynski, 1994).

Nos adultos, várias alterações tem sido associadas à listeriose, entre elas, infecções do sistema nervoso central, meningites, meningo-encefalites ou encefalites, septicémias e endocardites, muitas vezes sobrepostas a outras alterações como otite média, faringite, amigdalite, sinusite, pneumonia, abscessos localizados, internos ou externos, lesões cutâneas papulares ou pustulares, conjuntive, síndrome tipo mononucleose infecciosa e perturbações psicóticas (Farber e Peterkin, 1991; Donnelly, 1994; Prentice, 1994).

Durante a gestação, uma vez que os factores selectivos da imunidade celular estão deprimidos, prevenindo a rejeição do feto pela mãe, a menor resistência a *L. monocytogenes* aumenta o risco materno ou fetal de contrair

a doença. Esta surge, geralmente, como uma doença tipo gripe e, embora a maioria das mães recupere facilmente sem complicações, a infecção do feto pode levar ao aborto, a nados-mortos ou ao nascimento prematuro, sendo estes recém-nascidos afectados por septicémia perinatal, uma infecção grave dos sistemas respiratório, circulatório e nervoso central que pode terminar fatalmente ou levar a atraso mental permanente (Farber e Peterkin, 1991; Donnelly, 1994; Prentice, 1994; Ryser, 1998).

Os animais infectados que exibem sintomas de listeriose podem excretar *L. monocytogenes* no leite, sangue e fezes. As elevadas taxas de excreção da bactéria no leite de ovinos, caprinos e bovinos assintomáticos são frequentes, podendo atingir valores de 10^4 ufc/ml nos animais atingidos pela doença, sendo a mamite rara (Donnelly, 1994; Ryser, 1998).

A prevenção e controlo da listeriose de origem alimentar é um problema de preocupação mundial, dadas as consequências dramáticas para a saúde pública. Devido ao carácter ubiquitário de *L. monocytogenes* é muito difícil evitar a contaminação dos produtos, mantendo-se sempre o risco de contaminação de toda a cadeia de fabrico. É, portanto, preferível controlar a presença deste microrganismo nos alimentos processados, através da identificação das fontes de contaminação das matérias-primas e ingredientes e do ambiente, embora seja necessário o rastreio em todos os estadios da cadeia de processamento (Donnelly, 1994; Sanaa e Ménard, 1994;).

No caso do leite e dos produtos lácteos, o controlo consiste na eliminação de animais excretores e na luta contra as frequentes e variadas fontes de contaminação extra-mamária, promovendo a limpeza dos animais e das instalações, a higiene da ordenha e a qualidade da silagem, bem como vigiando possíveis fontes de contaminação nos locais de processamento como as instalações e equipamentos fabris e o pessoal que manipula os alimentos e, igualmente, minimizando a possibilidade de contaminação cruzada. Por outro lado, há necessidade de esclarecer os retalhistas e os consumidores, especialmente os que fazem parte dos grupos que correm

maiores riscos na contracção da doença, em relação a práticas seguras de manipulação e consumo de alimentos, principalmente daqueles que constituem as principais fontes de *L. monocytogenes* (carnes cruas ou pouco cozinhadas, marisco, aves, ovos, leite cru e produtos lácteos) (Farber e Peterkin, 1991; Donnelly, 1994; Sanaa e Ménard, 1994).

Salmonella spp.:

Os membros do género *Salmonella* têm importância em saúde pública devido à capacidade de alguns deles causarem infecções, geralmente associadas ao consumo de produtos alimentares, que compreendem desde gastroenterites que se auto-limitam, até septicémias e febres tifóides, por vezes fatais (Ryser, 1998).

O género *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e, actualmente, possui uma só espécie - *Salmonella choleraesuis* - em que se reconhecem sete sub-espécies correspondentes aos anteriores sub-géneros (I,II,IIIa,IIIb,IV,V e VI) e designados, respectivamente, por *choleraesuis*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* e *indica* (Le Minor et al., 1984; Euzéby, 2000).

No entanto, Le Minor e Popoff (1987), citados por Euzéby (2000) sugeriram que o nome da espécie fosse alterado para *Salmonella enterica*, modificando, portanto, a designação de *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* para *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Esta proposta de alteração, apesar de cientificamente justificada, não foi aceite pela Comissão Judicial do "Comité International de Systématique Bacterienne" sendo, no entanto, seguida na prática pela maioria dos cientistas.

Os nomes historicamente usados para indicar as espécies são hoje utilizados para designar as serovariedades. Correctamente, devem usar-se os nomes das sub-espécies seguidos pela designação da serovariedade. Contudo, por

razões práticas e devido à vulgarização dos nomes tradicionais das espécies, é mais conveniente uma designação mais curta. Assim, para a sub-espécie *choleraesuis* (ou “subsp. *enterica*”), à qual pertence a maioria das serovariedades de *Salmonella*, mantém-se as designações das espécies para as serovariedades, não sendo necessário indicar o nome da sub-espécie. Em relação às serovariedades pertencentes às outras sub-espécies, bem como às novas serovariedades da sub-espécie I, são apenas designadas pela sua fórmula antigénica (Jay, 1992; Vlaemynck, 1994; Ziprin, 1994; Gledel e Corbion, 1995; Euzéby, 2000).

As bactérias pertencentes ao género *Salmonella* são bacilos pequenos, Gram negativos, não esporulados e anaeróbios facultativos. Quase todas as estirpes são móveis, com flagelos peritricos, algumas são imóveis flageladas ou não flageladas, mas *Salmonella Pullorum* ou *Salmonella Gallinarum* é sempre imóvel (LeMinor, 1984; Jay, 1992; Ziprin, 1994; Ryser, 1998).

O membros do género *Salmonella* evidenciam uma grande heterogeneidade bioquímica. Em geral, são incapazes de fermentar a sacarose, a lactose e a salicina, embora com raras exceções, fermentem a glucose e outros monossacáridos, com produção de gás. A maioria produz sulfureto de hidrogénio, descarboxila a lisina e a ornitina, reduz os nitratos a nitritos, utiliza o citrato como única fonte de carbono mas não forma indol, nem hidroliza a ureia (LeMinor, 1984; Vlaemynck, 1994; Ziprin, 1994; Gledel e Corbion, 1995; Ryser, 1998).

Crescem facilmente em meios nutritivos vulgares, a 35-37°C, embora o crescimento também seja possível entre 5 e 47°C (Vlaemynck, 1994; Ziprin, 1994; Ryser, 1998). Apesar de não ser totalmente inactivada, a população de *Salmonella* spp. e, concretamente a de *Salmonella* Senftenberg, considerada a mais resistente ao calor, é bastante reduzida quando submetida a 63°C. Contudo, a sobrevivência durante o aquecimento pode ser influenciada pela composição do meio. Em produtos lácteos ácidos, a caseína pode exercer um efeito protector em *Salmonella* Typhimurium dependendo, o grau de

protecção, da concentração de caseína, da forma da sua molécula e do pH do meio. Por outro lado, o crescimento deste microrganismo pode ocorrer a temperaturas abaixo de 6°C, após um período relativamente longo (El-Gazzar e Marth, 1992).

O valor de pH óptimo de crescimento situa-se perto da neutralidade, entre 6,5 e 7,5, mas *Salmonella* spp. também pode crescer em ambientes mais acídicos, dependendo de vários factores como da serovariedade considerada, da temperatura de incubação, da disponibilidade de oxigénio, da natureza e composição do meio de crescimento e do tipo de ácido usado na acidificação. No entanto, os valores abaixo de 4,0 e acima de 9,0 são bactericidas (El-Gazzar et al., 1992; Jay, 1992; Vlaemynck, 1994; Ziprin, 1994; Ryser, 1998).

Salmonella spp. cresce melhor em condições de a_w elevada (0,95) e baixa osmolaridade. As baixas concentrações de NaCl estimulam o seu crescimento e, embora este efeito seja influenciado pela temperatura e pelo pH, as concentrações elevadas não são toleradas, sendo bactericida a salmoura a 9%. A baixas temperaturas, os alimentos com baixo teor de NaCl não permitem o crescimento de *Salmonella* spp. mas, se a temperatura aumenta estas bactérias podem crescer, mesmo em presença deste sal. Relativamente ao pH, verifica-se, geralmente, que em meios acidificados, especialmente se a acidificação for devida ao ácido acético, o crescimento é melhorado ou a taxa de morte retardada, em presença de baixas concentrações de sal. Contudo, à medida que a concentração de sais e solutos aumenta, o crescimento é atrasado, embora possam ser desencadeados mecanismos de resposta ao *stress* ambiental (El-Gazzar e Marth, 1992; Jay, 1992; Ziprin, 1994; Radford e Board, 1995; Ryser, 1998).

Salmonella spp. está largamente distribuída na natureza. O seu principal habitat é o tracto gastrintestinal de diferentes animais, entre eles as aves, os répteis, os animais de espécies pecuárias e de companhia, a espécie humana e, ocasionalmente, os insectos, que podem, todos eles, ser

portadores não sendo obrigatoriamente doentes. Também podem ser encontrada em peixes, moluscos e bivalves. Os roedores, insectos e répteis podem actuar como reservatórios e vectores na disseminação desta bactéria (Jay, 1992; Vlaemyck, 1994; Ziprin, 1994; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997).

Excretados nas matérias fecais, muitas vezes em grande número, estes microrganismos contaminam a água, o solo e quase todos os tipos de alimentos - carne e produtos cárneos, leite e produtos lácteos, ovos e derivados, frutas e vegetais - e podem ser transportados por insectos ou outros vectores para locais distintos. A sua ingestão pelo homem ou outros animais contribui, novamente, para a disseminação de *Salmonella* spp., através da matéria fecal, permitindo a continuação do ciclo (Jay, 1992; Vlaemyck, 1994; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997).

Os indivíduos atingidos pela doença podem excretar salmonelas nas fezes em quantidades elevadas (10^6 a 10^9 /g) e, após a recuperação, podem manter-se como portadores assintomáticos, continuando, imperceptivelmente, a eliminar a bactéria e tornando-se, então, numa fonte de disseminação para os alimentos e, em último caso, para os humanos (LeMinor, 1984; Ziprin, 1994; Ryser, 1998).

Salmonella spp. também pode ser transmitida como infecção zoonótica, a partir de espécies pecuárias e de animais de companhia ou adquirida como infecção nosocomial, durante tratamento médico (cirurgia, endoscopia), a partir de produtos sanguíneos e, tal como outros agentes, em consequência da sua manipulação laboratorial (El-Gazzar e Marth, 1992; Ziprin, 1994).

Em termos epidemiológicos, as salmonelas podem ser classificadas em três grupos. O primeiro é constituído pelas serovariedades que só infectam a espécie humana. Incluem *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi e *Salmonella* Sendaii que são responsáveis pela febre tifóide e paratifóide, as doenças mais graves causadas por salmonelas. O segundo grupo inclui as

espécies que estão adaptadas ao hospedeiro, como *Salmonella Gallinarum* (aves), *Salmonella Abortusequi* (equinos), *Salmonella Abortusovis* (ovinos), *Salmonella Dublin* (bovinos) e *Salmonella Choleraesuis*, que podem estar presentes nos alimentos, sendo apenas estas duas últimas patogênicas para a espécie humana. Finalmente, no terceiro, agrupam-se as que não estão adaptadas ao hospedeiro, não manifestando preferência por qualquer deles. São ubiqüitárias e são as principais responsáveis por infecções de origem alimentar na espécie humana e outros animais (LeMinor, 1984; Jay, 1992; Glebel e Corbion, 1995; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997).

Independentemente da sua classificação epidemiológica, algumas serovariedades, como *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Dublin* são particularmente virulentas para o Homem. Os agentes etiológicos de gastroenterite humana mais frequentes são *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis* (Ziprin, 1994; Glebel e Cobrion, 1995).

A dose infectante depende essencialmente da serovariedade considerada. Em geral, para que ocorra gastroenterite é necessária a ingestão de um número elevado de bactérias, da ordem dos 10^7 a 10^9 /g, tendo sido registados valores de 10^5 a 10^6 /g para *Salmonella Bareilly* e *Salmonella Newport* e de 10^9 a 10^{10} para *Salmonella Pullorum*. Mas também pode surgir salmonelose a partir da ingestão de 1 célula de *Salmonella Typhi*, de 100 células/100g *Salmonella Eastbourne* ou de 15 000 células/g de *Salmonella Cubana*, ou mesmo de vários milhões de, por exemplo, *Salmonella Derby* ou *Salmonella Anatum*. No entanto, as crianças e recém-nascidos, os idosos e os imunodeprimidos são mais sensíveis e a doença pode surgir com uma dose infectante menor (LeMinor, 1984; Jay, 1992; Vlaemyneck, 1994).

A contaminação dos produtos alimentares resulta, geralmente, da manipulação inconveniente ou da aplicação de medidas de higiene inadequadas, podendo ter origem nos portadores do microrganismo (Vlaemyneck, 1994).

Embora a maioria dos surtos de origem alimentar não seja associada ao leite ou aos produtos lácteos, os lacticínios tem estado implicados nalguns deles (El-Gazzar e Marth, 1992; Burgess et al., 1994). A infecção natural da glândula mamária e a excreção de *Salmonella* spp. no leite pode ser possível, mas é relativamente rara. As fêmeas com salmonelose podem eliminar grandes quantidades deste microrganismo nas fezes e, por vezes, excretar salmonelas viáveis no leite (Vlaemynck, 1994). Mas, a presença de *Salmonella* spp. no leite crú é principalmente devida à contaminação fecal directa ou indirecta, a partir do úbere, da pele, dos equipamentos, etc., quando a ordenha é realizada em fracas condições higiénicas (Burgess et al., 1994).

O leite pasteurizado também tem estado relacionado com surtos de salmonelose. Contudo, sendo a pasteurização eficaz na destruição deste microrganismo, a presença de *Salmonella* spp. neste produto revela a existência de condições deficientes na sua realização ou de fracas condições higiénicas no local de processamento ou, ainda, de contaminação pós-pasteurização (El-Gazzar e Marth, 1992; Jay, 1992; Burgess et al., 1994; Vlaemynck, 1994; Ryser, 1998).

O arrefecimento do leite e dos produtos lácteos previne o crescimento de *Salmonella* spp., mas as temperaturas de refrigeração apenas reduzem a sua população, permitindo a sua sobrevivência, por longos períodos, em alimentos refrigerados (Vlaemynck, 1994). Durante estes períodos, é importante um controlo eficaz da temperatura, mantendo os alimentos refrigerados a temperaturas inferiores a 5°C e evitando as subidas de temperatura (El-Gazzar e Marth, 1992).

Tal como acontece com outros microrganismos, *Salmonella* spp. também pode ser inibida ou inactivada por bactérias lácticas consoante o tipo de cultura láctica, o tamanho do inóculo e a temperatura de crescimento (El-Gazzar e Marth, 1992; Abdalla et al., 1993).

Motlagh et al. (1991) verificaram que entre os produtos metabólicos produzidos pelas bactérias lácticas, o diacetil tinha efeitos bactericidas em relação a algumas bactérias Gram negativas entre elas *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Anatum. Por outro lado, os ácidos láctico e propiónico tinham pouco ou nenhum efeito.

O peróxido de hidrogénio, produzido pelas bactérias lácticas, também é importante na inibição de *Salmonella* spp., activando o SLP, ao qual estas bactérias são muito sensíveis (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Piard e Desmazeaud, 1991; Vandenberg, 1993; Wolfson e Sumner, 1993).

Segundo El-Gazzar e Marth (1992), o controlo da salmonelose baseia-se na prevenção da contaminação, na inibição do crescimento de *Salmonella* spp. e na sua destruição, quando presente nos alimentos. Assim, é essencial a prática de regras de higiene pessoal, de limpeza e desinfeção do equipamento, utensílios e superfícies que contactam com os alimentos e a redução do contacto destes com fontes de disseminação da bactéria, nomeadamente alimentos crus e agentes vectores. Os alimentos devem ser mantidos ou a temperaturas de refrigeração ou acima dos 60°C. Finalmente, não sendo um microrganismo termoresistente, é fácil a sua destruição através dos tratamentos térmicos convenientes.

MICROBIOLOGIA DO QUEIJO

Em termos de ecologia microbiana, actualmente, os alimentos são considerados como um habitat de microrganismos, contendo uma microflora característica que deriva da associação de diferentes populações. Sujeita às pressões selectivas exercidas pelos diversos factores ambientais internos e externos e às interacções microbianas que se verificam nos alimentos, apenas parte desta microflora sobrevive (Deák, 1991).

Assim, o perfil microbiológico de um alimento resulta de alterações constantes na composição qualitativa e quantitativa da microflora, em consequência da acção dos factores ambientais e das interacções estimulatórias e inibitórias dos microrganismos, uma vez que certas condições favorecem o desenvolvimento de umas comunidades e inibem o de outras (ICMSF, 1993).

A flora microbiana do queijo é constituída por um grande número de microrganismos, da ordem dos 10^9 por grama, com origens muito variadas. Provém, essencialmente, do leite e dos ingredientes utilizados no fabrico do queijo e dos equipamentos, utensílios e ambiente dos locais de processamento. Exceptuando as culturas intencionalmente adicionadas ao leite, a maioria dos microrganismos representa contaminantes que tiveram a oportunidade de contactar, de se manter viáveis e de se multiplicar na matéria-prima e/ou no produto, conforme os factores intrínsecos, extrínsecos ou biológicos o permitiram (Choisy et al., 1997b; Johnson, 1998).

Um dos aspectos relevantes no fabrico de queijo é que a qualidade microbiológica do leite se vai reflectir na qualidade microbiológica do produto, sendo esta, no entanto, também influenciada pela complexa sucessão de acontecimentos que caracterizam o processo de fabrico e afectada, ainda, pelas contaminações a que o produto pode estar sujeito (Paleari et al., 1991; Zottola e Smith, 1991; Johnson, 1998).

As alterações físico-químicas e bioquímicas que ocorrem durante a maturação do queijo são responsáveis pela criação das condições ambientais que determinam o desenvolvimento dos vários grupos microbianos presentes. Estes estão em evolução permanente, modificando constantemente o seu equilíbrio, pois enquanto alguns se multiplicam activamente, outros praticamente desaparecem. Além disso, quer a actividade metabólica dos microrganismos vivos quer os produtos que são libertados pela lise celular contribuem acentuadamente para a modificação das condições do meio, o que torna o processo ainda mais complexo (Choisy et al., 1997b).

Para o fabrico da maioria das variedades de queijo é necessária uma descida do pH para valores de 5,5-5,2 nas primeiras 24 horas. Este parâmetro constitui um factor decisivo para o desenvolvimento das comunidades microbianas, determinando a sua sobrevivência e o seu crescimento no queijo pois a maior parte dos microrganismos cresce melhor com valores de pH próximos da neutralidade, entre 6,6 e 7,5, embora alguns, como as bactérias lácticas e as leveduras, possam crescer com valores inferiores (Deák, 1991; Boddy e Wimpenny, 1992, Jay, 1992; ICMSF, 1993; Spahr e Url, 1994).

A água é um factor determinante na sobrevivência, crescimento, actividade e desenvolvimento da comunidade microbiana, devendo as suas necessidades em água ser estabelecidas em termos de actividade da água (a_w) (Boddy e Wimpenny, 1992; Jay, 1992; ICMSF, 1993).

O crescimento da maioria das bactérias e fungos situa-se em valores de a_w superiores a 0,90, crescendo estes num leque de valores mais vasto e requerendo, frequentemente, níveis muito inferiores aos daquelas (Jay, 1992; ICMSF, 1993; Spahr e Url, 1994).

Uma vez que os valores de a_w da maior parte dos queijos se situa entre 0,91 e 0,98, muitos microrganismos são capazes de crescer neste meio. No

entanto, a redução de a_w que se verifica durante a maturação, em consequência da evaporação e do aumento de compostos hidrossolúveis resultantes da proteólise, pode influenciar significativamente a composição da comunidade microbiana, pois embora algumas populações possam crescer com valores de a_w mais baixos, como as envolvidas na conservação de alimentos e algumas micrococáceas, outras são substancialmente inibidas, como é o caso da maioria dos microrganismos patogénicos (Jay, 1992; ICMSF, 1993; Spahr e Url, 1994).

O sal adicionado durante o fabrico do queijo é outro factor significativo no controlo do crescimento e desenvolvimento dos microrganismos. Favorecendo a remoção do soro, influencia quer o teor de humidade e, portanto, a a_w , quer a acidez da coalhada. Na maioria das variedades de queijo, as concentrações de sal na fase aquosa atingem valores de 2,2 a 6,5% e podem ser responsáveis por uma diminuição na taxa de crescimento da maioria das bactérias ou ter mesmo efeitos prejudiciais sobre as mais sensíveis (Zottola e Smith, 1993; Spahr e Url, 1994).

O potencial de oxidação-redução, representando as relações dos microrganismos com o oxigénio, é outro factor de selecção importante em todos os ambientes. À medida que o queijo matura, especialmente os queijos duros, os produtos da fermentação dos açúcares, da proteólise e da lipólise podem reduzir o E_h dos queijos. Consequentemente, o desenvolvimento de algumas populações pode ser reduzido enquanto o de outras é facilitado. Além disso, alguns microrganismos dispõem de sistemas metabólicos alternativos que funcionam consoante o potencial de oxidação-redução ou a presença ou ausência de oxigénio levando, portanto, à formação de produtos finais diferentes (Jay, 1992; ICMSF, 1993; Zottola e Smith, 1993).

O desenvolvimento microbiano pode ainda ser condicionado por diversos sistemas ou substâncias antimicrobianas presentes naturalmente no alimento ou resultantes da actividade metabólica que decorre da sua transformação noutros produtos. No caso do leite e derivados, mencionam-se o SLP, a

lactoferrina, as imunoglobulinas, a lizosima e os vários compostos produzidos pelos microrganismos durante o seu crescimento, já anteriormente referidos.

A temperatura é, provavelmente, o factor ambiental que mais significativamente afecta o crescimento e a viabilidade microbianos, determinando o tipo de microrganismo presente nos alimentos. A utilização de diferentes temperaturas no fabrico da coalhada das diversas variedades de queijo pode influenciar a evolução dos vários grupos microbianos presentes no queijo.

Assim, nos queijos de pasta mole e semi-mole, as temperaturas utilizadas variam de 30 a 38°C, e nos de pasta dura de 38 a 55°C. Nestes, especialmente nos submetidos às temperaturas mais elevadas, o crescimento microbiano pode ser limitado (Spahr e Url, 1994).

Mas, por outro lado, as coalhadas submetidas a temperaturas mais baixas, contendo maior teor em lactose, constituem um substrato mais favorável ao crescimento das bactérias lácticas produtoras de ácido láctico, sendo a diminuição do pH a principal responsável pela redução da sobrevivência de enterobactérias e coliformes (Nuñez et al., 1985).

A maioria dos microrganismos envolvidos na maturação do queijo é mesófila, com temperaturas óptimas de crescimento situadas entre 30 e 40°C. A produção de enzimas é máxima a temperaturas próximas das óptimas de crescimento. Sendo as temperaturas de maturação, geralmente, inferiores, o seu crescimento e actividade são retardados, permitindo regular mais facilmente a evolução da maturação e dificultar o crescimento de alguns microrganismos indesejáveis (Boddy e Wimpenny, 1992; ICMSF, 1993 Ramet, 1997).

A humidade relativa do ambiente também influencia o estabelecimento das diferentes comunidades microbianas no queijo durante a maturação ao afectar o seu conteúdo em água e a a_w à superfície. A escolha do teor de

humidade considerado conveniente para um determinado produto tem em vista a sensibilidade à a_w dos diferentes microrganismos que se devem desenvolver ou inibir (Jay, 1992; Ramet, 1997).

As estações do ano, especialmente através dos valores de temperatura e humidade relativa que as caracterizam, também podem condicionar a contaminação inicial da matéria-prima e o desenvolvimento microbiano no produto, como se verificou nalguns queijos como no Serra da Estrela e no Cásar de Cáceres (Pouillet et al., 1991; Macedo et al., 1995).

Todos estes parâmetros se encontram relacionados entre si, de modo que quando um deles se afasta do valor considerado óptimo para o desenvolvimento de um determinado microrganismo, a sua resistência aos outros pode estar reduzida, devido ao estreitamento da gama de valores favoráveis ao seu desenvolvimento (Jay, 1992; ICMSF, 1993).

Apesar de a flora microbiana de um alimento ser determinada principalmente pelos factores anteriormente referidos, entre eles, pH, a_w , potencial de oxidação-redução e temperatura, a predominância de uma espécie é influenciada tanto pelo seu crescimento como pelas interacções que estabelece com outros elementos que constituem a comunidade (ICMSF, 1993; Choisy et al. 1997b).

Assim, devido à complexidade das interacções microbianas e às relações que estabelecem com os factores ambientais, um alimento, num dado momento, transporta uma flora característica, a sua comunidade ou a sua associação, que se altera constantemente, sucedendo uma comunidade ou associação a outra, constituindo uma sucessão (Boddy e Wimpenny, 1992; ICMSF, 1993; Choisy et al., 1997b).

Além disso, a diversidade de processos de manufactura e de regimes de maturação do queijo tornam este produto num ecossistema complexo, em

que cada um individualmente, não um tipo ou variedade, tem a sua flora microbiana própria e única (Jonhson, 1998).

O tipo de agente coagulante pode influenciar a sobrevivência de alguns microrganismos. Nos queijos em que é utilizado coagulante vegetal (cardo), o aumento das populações microbianas que se verifica na coalhada pode dever-se quer à flora contaminante presente neste ingrediente quer ao facto de o tempo de coagulação ser mais longo e, portanto, favorecer o crescimento microbiano (Nuñez et al., 1991; Sánchez et al., 1998).

Em queijo La Serena feito com cardo verificou-se que os teores de humidade e lactose são menores que quando se utiliza coalho animal. Sendo o pH da coalhada mais elevado nos primeiros, a sobrevivência das enterobactérias e dos coliformes no seu interior é favorecida, evidenciando uma taxa de morte inferior à observada nos queijos feitos com coalho animal. Por esta razão e também pelo facto de a concentração de sal ser superior à superfície desses queijos feitos com cardo, embora os teores microbianos sejam mais elevados, observa-se um decréscimo mais acentuado destas populações que, no final da maturação, igualam as dos queijos feitos com coalho animal (Nuñez et al., 1991).

PRINCIPAIS GRUPOS MICROBIANOS PRESENTES NO QUEIJO

Bactérias lácticas:

As bactérias lácticas constituem o grupo microbiano mais numeroso presente nas coalhadas dos diferentes tipos de queijo, atingindo valores da ordem dos 10^6 a 10^9 microrganismos por grama de queijo (Bertrand, 1988; Canteri, 1997; Jonhson, 1998).

A fermentação e o consumo de glúcidos fermentáveis por estas bactérias cria um ambiente que controla o crescimento e a composição da flora adventícia, devido à produção de ácidos e de outras substâncias com efeito inibidor, como os metabolitos do oxigénio e as bacteriocinas; devido à criação de um baixo potencial de oxidação-redução durante os primeiros estadios de maturação do queijo; e também devido à competição pelos nutrientes (Olson, 1990; Piard e Desmazeaud, 1991; Johnson, 1998).

Para a produção de energia e para o seu crescimento, as bactérias lácticas necessitam de glúcidos fermentáveis, sendo a lactose, dissacárido constituído por glucose e galactose, o mais abundante no leite (Cogan e Hill, 1993). Embora cerca de 98% deste açúcar seja removido no soro, como lactose ou como ácido láctico, a lactose residual, essencial para a produção de queijo de boa qualidade, é rapidamente metabolizada (Fox et al., 1993).

As vias seguidas para metabolizar a lactose diferem entre as bactérias lácticas e estão estreitamente relacionadas com os sistemas de transporte utilizados para penetrar na célula.

Assim, por translocação de grupo, sistema principalmente observado no transporte de glúcidos pelas bactérias lácticas (Poolman, 1993a), a lactose é transportada para o interior da célula bacteriana por um sistema fosfotransferase dependente do fosfoenolpiruvato (PTS/PEP), formado por uma série complexa de reacções enzimáticas cuja principal função é translocar o açúcar através de uma membrana, com fosforilação simultânea (Axelsson, 1993).

Nos sistemas permease, existe uma proteína específica do açúcar associada à membrana celular (permease) que transloca o soluto através dela, à custa da hidrólise de ATP. A translocação do açúcar também pode ocorrer por ligação a iões ou outros solutos. Em ambas as situações, geram-se um gradiente de protões entre o interior da célula, mais alcalino, e o exterior, mais ácido, e um potencial eléctrico de membrana, constituindo a Força

Protão Motriz (PMF), fornecedora da energia para a translocação (Cogan e Hill, 1993; Cogan e Jordan, 1994; de Vos, 1996).

O primeiro sistema referido (PTS/PEP) encontra-se nos lactococos (*Lactococcus lactis*) e em alguns lactobacilos mesófilos (*Lactobacillus casei* e *Lb. plantarum*). O segundo tipo é utilizado para o transporte da lactose em espécies termófilas como *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lb. helveticus* e, provavelmente, nos *Leuconostoc* (Hickey et al., 1986; Mäyrä-Mäkinen e Bigret, 1993; de Vos, 1996; Steele, 1998).

No entanto, segundo vários autores, o transporte de açúcares para o interior dos *Leuconostoc* é pouco conhecido. O PTS/PEP só tem sido encontrado nas bactérias que fermentam o açúcar por via glicolítica (Cogan e Hill, 1993), ou seja, no caso das bactérias lácticas, apenas nas homofermentativas (Axelsson, 1993; de Vos, 1996), o que não acontece com os *Leuconostoc*, heterofermentativos, que usam a via 6-fosfogluconato-fosfocetolase (6PG/PK) (Axelsson, 1993; Cogan e Hill, 1993). Possuindo fraca actividade fosfo- β -galactosidase, pode considerar-se que, provavelmente, o sistema permease está envolvido no transporte da lactose nestas bactérias (Huang et al., 1994).

No sistema PTS/PEP, a lactose é fosforilada até lactose-6-P e, como tal, é transportada através da membrana celular (Axelsson, 1993; Poolman, 1993a). Dentro da célula, a lactose-6-P é hidrolizada pela fosfo- β -galactosidase ($p\beta gal$) em glucose e galactose-6-P, as quais serão depois metabolizadas pelas vias glicolítica e da tagatose, respectivamente (Cogan, 1995; Mäyrä-Mäkinen e Bigret, 1993; Steele, 1998). (Figura II-1).

Nos sistemas PMF estão incluídos sistemas de transporte primários, que utilizam a energia livre da hidrólise do ATP para transportar solutos contra os seus gradientes de concentração, e os sistemas de transporte secundários em que o movimento das moléculas através do citoplasma é feito à custa de

gradientes de prótons ou outros cátions electroquímicos previamente estabelecidos, ou seja, o movimento de uma molécula está ligado ao movimento de uma segunda molécula, através de permeases específicas localizadas na membrana (Cogan e Hill, 1993; Poolman, 1993a). Neste caso o transporte pode ocorrer por *antiport*, em que se verifica o transporte simultâneo de dois substratos em direcções opostas; por *symport*, em que há o transporte do soluto, simultâneamente com um próton, na mesma direcção (Axelsson, 1993); e por *uniport*, em que há o fluxo de cátions para o interior da célula e de aniões para o exterior (Cogan e Jordan, 1994).

Dentro da célula, a lactose é hidrolizada até glucose e galactose pela β -galactosidase (β gal) (Mäyry-Mäkinen e Bigret, 1993). A glucose será depois metabolizada pela via glicolítica e a galactose seguirá a via de Leloir. (Figura II-1).

Nas espécies termófilas *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* o transporte ocorre pelo sistema *antiport* lactose/galactose em que se verifica o movimento simultâneo de dois compostos, lactose e galactose, em direcções opostas com o resultante gradiente de concentração (Mäyry-Mäkinen e Bigret, 1993; de Vos, 1996; Steele, 1998). A troca lactose/galactose também pode ocorrer por *symport* com um próton, de modo que ao efluxo de galactose está ligado o influxo de lactose, em concentrações equimolares, o que parece que é uma reacção energeticamente favorável ao sistema de transporte da lactose (Hutkins e Ponne, 1991; Axelsson, 1993; Poolman, 1993a; Cogan, 1995; de Vos, 1996).

Assim, no citoplasma celular, a lactose é hidrolizada por uma β -galactosidase até glucose, que entra na via glicolítica, e galactose, que é excretada (Cogan, 1995).

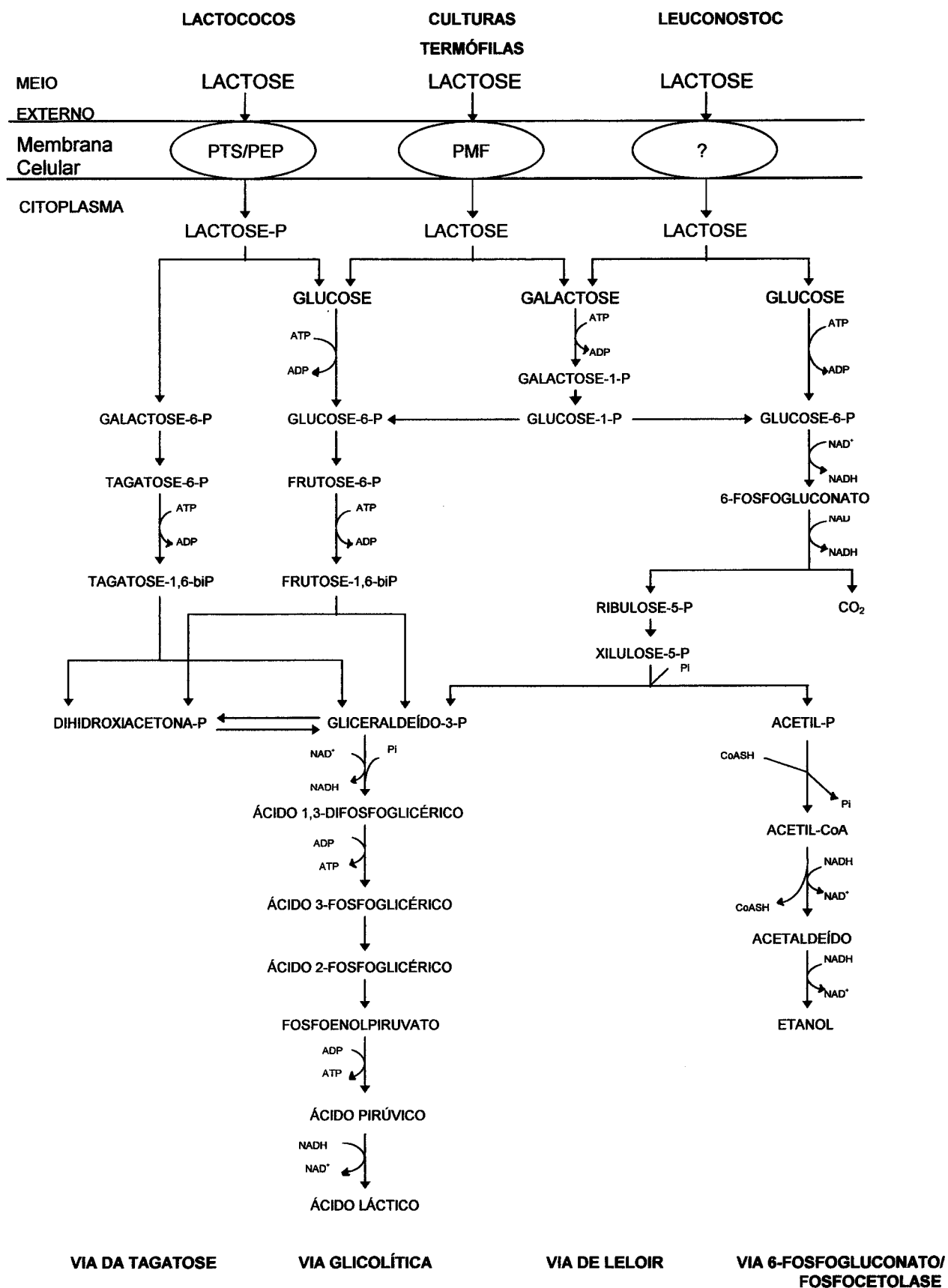


FIGURA II-1 - Metabolismo da Lactose pelos Lactococcos, Leuconostoc e Culturas Termofílicas. (Adaptado de Cogan e Hill, 1993).

A via glicolítica é utilizada pela maior parte dos géneros que constituem as bactérias lácticas, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e lactobacilos dos grupos I e II (homofermentativos e heterofermentativos facultativos, respectivamente) enquanto que *Leuconostoc*, *Weissella* e lactobacilos heterofermentativos obrigatórios (grupo III) utilizam a via 6PG/PK (Axelsson, 1993; Steele, 1998).

A via glicolítica caracteriza-se pela formação de frutose 1,6-difosfato (FDP) que é cindida por uma FDP aldolase em dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP). Estes são, então, convertidos em ácido pirúvico, seguindo uma sequência metabólica que inclui a fosforilação do substrato em dois locais. O ácido pirúvico é, posteriormente, reduzido a ácido láctico, por uma lactato desidrogenase (nLDH) dependente do NAD^+ , reoxidando o NADH previamente formado durante a glicólise (Axelsson, 1993; Cogan e Hill, 1993) (Figura II-1). É, então, obtido o equilíbrio redox, e, sendo o ácido láctico, virtualmente, o único produto final, esta sequência metabólica é conhecida por fermentação homoláctica (Axelsson, 1993; Cocaign-Bousquet, et al., 1996).

As bactérias lácticas homofermentativas utilizam a via da tagatose para metabolizarem a galactose. Esta é metabolizada através de vários derivados da tagatose, até DHAP e GAP entrando, depois, nas reacções terminais da glicólise (Cogan e Hill, 1993) (Figura II-1).

Teoricamente, são produzidos dois moles de ácido láctico e 2 moles de ATP, por mole de glucose consumido. Ou seja, pela via homofermentativa e sendo fermentadas a lactose e a galactose, formam-se quatro moles de ácido láctico por mole de lactose utilizado (Axelsson, 1993; Cogan, 1995; Steele, 1998).

A outra via principal de fermentação da glucose é conhecida como via das pentoses fosfato, via da fosfocetolase pentose, *shunt* do monofosfato de hexose, via do 6-fosfogluconato. Segundo Axelsson (1993), deverá ser

designada por via 6-fosfogluconato/fosfocetolase (6PG/PK), reconhecendo um passo importante na sequência metabólica - a clivagem pela fosfocetolase - e, ao mesmo tempo, distingue-a da via *bifidum*, que embora use a fosfocetolase não forma fosfogluconato.

A via 6PG/PK caracteriza-se pela oxidação da glucose-6-fosfato até à formação de 6-fosfogluconato, seguida de descarboxilação. A pentose 5-fosfato resultante é clivada pela fosfocetolase em acetil-fosfato e GAP, sendo este metabolizado do mesmo modo que na via glicolítica, com formação de ácido láctico (Figura II-1) (Marshall e Tamime, 1997). Como esta via leva à produção de quantidades significativas de outros produtos finais (CO₂ e etanol), para além do ácido láctico, é designada por fermentação heteroláctica (Axelsson, 1993).

A galactose é metabolizada pela via de Leloir até glucose-6-P, utilizando a galactoquinase (GK), a galactose 1-P uridil transferase e a UDP-4-epimerase. São produzidos ácido láctico e etanol devido à necessidade de regenerar NAD⁺ para continuar a fermentação (Figura II-1) (Cogan e Hill, 1993).

Esta via é predominantemente utilizada por *Leuconostoc* spp. para fermentar a galactose (Huang et al., 1994).

São, então, produzidos um mole de ácido láctico, um mole de etanol e um mole de CO₂ e 1 mole de ATP por cada mole de glucose utilizado. Ou seja, a via heterofermentativa produz dois moles de ácido láctico, dois de CO₂ e de etanol por cada mole de lactose utilizado (Axelsson 1993; Cogan, 1995; Steele, 1998).

Durante a fermentação dos açúcares, diferentes espécies de bactérias lácticas produzem exclusivamente ácido L(+)-láctico, ácido D(-)-láctico ou quantidades mais ou menos iguais de ambos ou com predomínio de um e quantidades mensuráveis de outro. A produção dos diferentes isómeros

depende da presença de lactato desidrogenases (nLDH) específicas NAD dependentes e da sua actividade. A existência de ácido D(-) ou L(+)-láctico deve-se à presença de D(-) ou L(+)-nLDH, respectivamente (Axelsson, 1993).

Raras espécies (*Lactobacillus sakei*, *Lb. curvatus* e *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*) produzem uma racemase que converte o ácido L(+)-láctico em ácido D(-)-láctico. Neste caso, o ácido L(+)-láctico, inicialmente formado, induz a produção de racemase, resultando numa mistura dos dois isómeros, cuja proporção pode, também, vir a ser alterada, conforme a fase de crescimento observada (Kandler, 1983; Axelsson, 1993).

Se não fossem expulsos pelas bactérias lácticas, os produtos finais de fermentação acumulados no citoplasma determinariam uma diminuição do pH intracelular, importante regulador de várias actividades metabólicas, comprometendo o crescimento e viabilidade destas bactérias (Nannen e Hutkins, 1991a; Hutkins e Nannen, 1993).

Mas ao excederem o gradiente protão electroquímico (ou ião sódio), devido ao estabelecimento de elevados gradientes de concentração dirigidos para o exterior da célula, ocorre o efluxo dos produtos de fermentação mediado por um transportador, em *symport* com protões ou iões sódio (Poolman, 1993a).

Uma vez que o valor do pH intracelular se encontra próximo da neutralidade, a maior parte do ácido láctico produzido pelas bactérias lácticas encontra-se sob a forma ionizada. Assim, estas bactérias têm que eliminar o excesso de protões de modo a manter o pH intracelular dentro de limites compatíveis com os processos metabólicos e eliminar o excesso de lactato de modo a restabelecer o equilíbrio osmótico (Piard e Desmazeaud, 1991). Por outro lado, sendo a membrana celular pouco permeável a alguns produtos finais, entre eles o ácido láctico (Kashket, 1987), as células rapidamente o excretam para o meio extracelular, na forma ionizada, através do sistema ATPase, de modo que o meio se vai tornando cada vez mais ácido, enquanto o citoplasma permanece mais alcalino (Hutkins e Nannen, 1993). Devido à

fraca permeabilidade da membrana aos protões extracelulares produzidos durante a fermentação, forma-se um gradiente de pH entre o citoplasma e o meio, sendo este gradiente importante não só para a homeostase do pH mas, também, como componente da PMF (Hutkins e Nannen, 1993; Kakinuma, 1998).

A produção de queijo depende da formação de ácido láctico pelas bactérias (Zottola e Smith, 1993). Afectando vários aspectos da manufactura do queijo, a produção de ácido deve ocorrer a uma taxa apropriada e no momento oportuno do seu fabrico, de modo a obter-se um produto de boa qualidade (Fox, 1993).

A produção de ácido ajuda à formação da coalhada (Zottola e Smith, 1993). O pH da coalhada é determinado não só pela quantidade de ácido láctico produzido pelas culturas de arranque, mas também pela sua capacidade tamponizante, a qual depende, principalmente, das concentrações de fosfato de cálcio não dissolvido, caseína e lactose (Lucey e Fox, 1993; Walstra, 1993).

O pH afecta o tempo de coagulação, a velocidade de consolidação do gel e a sua firmeza máxima (Remeuf et al., 1991). Por um lado, permite aproximar-se das condições óptimas da acção do agente coagulante e, por outro, leva à libertação de cálcio ionizado a partir do fosfato de cálcio coloidal. O cálcio ionizado intervém no processo de coagulação pelo coagulante ao nível das ligações que se estabelecem entre as micelas de para- κ -caseína (Remeuf, 1994).

O pH da coalhada influencia a concentração de coagulante nela retido (Visser, 1993) e, em consequência, o nível de coagulante residual no queijo (Lemieux e Simard, 1991), o que, por seu lado, se reflectirá, mais tarde, na taxa de proteólise durante a maturação, interferindo com a qualidade do queijo (Fox, 1993; Lawrence et al., 1993).

O pH também afecta a taxa de sinerese do gel que controla o teor de humidade do queijo (Fox, 1993; Walstra et al., 1993), do qual dependem o crescimento microbiano e a actividade de enzimas no queijo; conseqüentemente, influencia fortemente a evolução da cura e a qualidade final deste produto (Fox, 1993).

O conteúdo de água do queijo, por outro lado, influencia também o pH, uma vez que quanto maior for a quantidade de água presente, maior será a concentração de lactose e de ácido láctico e mais baixo será o pH (Lucey e Fox, 1993; Walstra et al., 1993). Além disso, interfere com as culturas de arranque, uma vez que quanto mais elevado for o pH, maior quantidade de lactose não metabolizada se encontra (Lawrence et al., 1993).

A taxa e a extensão da descida do pH determinam o conteúdo mineral do queijo e o grau de dissolução do fosfato de cálcio coloidal, modificando a susceptibilidade das caseínas à proteólise, durante a manufactura. Estes factores irão influenciar a estrutura básica e a textura do queijo (Fox, 1993; Lucey e Fox, 1993; Lawrence et al., 1993) bem como o rendimento (Walstra et al., 1993).

A acidificação controla o crescimento de muitas espécies de bactérias no queijo, especialmente as patogénicas, as causadoras de alterações e defeitos no produto ou as responsáveis por distúrbios de origem alimentar nos consumidores. Para além da sua produção, a natureza dos ácidos orgânicos produzidos por estas bactérias é também um factor relevante para a inocuidade alimentar (Bertrand, 1988; Piard e Desmazeaud, 1991; Marshall e Tamime, 1997).

Os efeitos inibitórios dos ácidos orgânicos estão principalmente relacionados com a quantidade de ácido não dissociado produzida, pois é sob esta forma que se difundem, passivamente, através da membrana celular. Uma vez dentro da célula e como o pH intracelular se encontra perto da neutralidade, estes ácidos dissociam-se em aniões e protões, fazendo-o decrescer

(Kashket, 1987; Piard e Desmazeaud, 1991; Jay, 1992; Östling e Lindgren, 1993). O resultante decréscimo do gradiente de pH entre os meios intracelular e extracelular, compromete a PMF e, conseqüentemente o transporte de substratos, os processos de produção de energia e a síntese de macromoléculas (Piard e Desmazeaud, 1991; Östling e Lindgren, 1993; Hutkins e Nannen, 1993).

Quando presentes em baixas concentrações, os ácidos fracos não afectam o gradiente de pH, mas em concentrações mais elevadas este será anulado, pois as células não conseguem compensar a entrada de ácido aumentando a expulsão de prótons (Kashket, 1987; Piard e Desmazeaud, 1991; Östling e Lindgren, 1993; Marshall e Tamime, 1997).

Além disto, o pH intracelular baixo prejudica diversas actividades enzimáticas bacterianas, designadamente a actividade das enzimas glicolíticas, o que se irá reflectir na diminuição do seu crescimento e viabilidade, devido ao aumento na fase de latência dos microrganismos sensíveis (Kashket, 1987; Lindgren e Dobrogosz, 1990; Nannen e Hutkins, 1991a; Hutkins e Nannen, 1993).

As células das várias espécies microbianas tem tolerâncias diferentes, à acidificação interna ou à acumulação de aniões e as suas membranas apresentam características de permeabilidade distintas para os ácidos lipofílicos. Numa flora mista, a acidez selecciona os componentes da comunidade inicial que são particularmente tolerantes, tornando-os dominantes. Desta forma, são frequentemente seleccionados, pelo pH ácido, as leveduras e os lactobacilos (Piard e Desmazeaud, 1991; ICMSF, 1993).

Estes e outras bactérias lácticas toleram valores de pH muito baixos à custa de eficientes mecanismos de controlo do pH interno que envolvem o sistema ATPase, utilizando o ATP produzido pela glicólise para eliminar os prótons (Hutkins e Nannen, 1993; Chaia et al., 1994).

Há muito poucas bactérias não lácticas capazes de crescer a pH inferior ao limite de pH para as bactérias lácticas. As bactérias responsáveis pela deterioração de alimentos ácidos são, quase todas, Gram positivas e incluem alguns géneros, como os lactobacilos, que são especialmente resistentes à presença, no meio, de elevadas concentrações de ácidos não dissociados, como o ácido láctico. Mas, estes géneros bacterianos podem produzi-lo em quantidades suficientes para inibir o desenvolvimento de certas enterobactérias como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., coliformes e também psicrotóficos, como *Pseudomonas* spp. que requerem níveis de ácido inferiores aos necessários para inibir leveduras, bolores ou as próprias bactérias lácticas (Piard e Desmazeaud, 1991; ICMSF, 1993; Östling e Lindgren, 1993).

A taxa e estadio do processo de fabrico a que o ácido láctico é principalmente produzido são característicos da variedade de queijo. Se o ácido láctico é produzido antes da drenagem do soro, como ocorre no fabrico dos queijos Camembert e Cheddar, a desmineralização da coalhada é mais acentuada do que quando o ácido láctico é produzido após a prensagem, como sucede no caso do Gouda e do Emmental (Lucey e Fox, 1993).

Nas coalhadas mais ácidas como do queijo Camembert, será necessária a neutralização progressiva do pH, por microrganismos que utilizam o ácido láctico (bolores e leveduras) de modo a que seja possível o desenvolvimento de microrganismos proteolíticos úteis na cura do queijo. Nas coalhadas menos ácidas e menos desmineralizadas, como nos queijos de pasta prensada ou cozida, o valor do pH permite o desenvolvimento desses microrganismos, podendo a proteólise desenrolar-se normalmente (Bertrand, 1988).

A taxa de fermentação da lactose é influenciada pelo método de salga utilizado no fabrico de queijo, uma vez que este vai determinar a concentração de sal na fase aquosa. Nos queijos em salmoura, a difusão do sal é relativamente lenta, permitindo que a lactose seja metabolizada, não

sendo detectada 24 horas após a manufactura. Nos queijos em que o sal seco é misturado com a coalhada, e especialmente quando se utilizam concentrações elevadas, o metabolismo da lactose pelas culturas de arranque é retardado (Cogan, 1995).

Assim, nos queijos em que a coalhada é colocada nos cinchos ainda com valores de pH elevados, a produção de ácido pelas culturas de arranque continua durante a prensagem. A posterior adição de sal, por imersão em salmoura ou por espalhamento à superfície da coalhada, irá inibir a sua actividade e fixar os valores do pH. Nos queijos em que o pH final desejado é atingido no encinchamento (Cheddar), a adição de sal à coalhada partida é feita para que o pH seja mantido até ao final da cura. A lactose é fermentada no início da maturação pela actividade das culturas de arranque, influenciadas pelo nível de sal e pela sua halotolerância, muito variável consoante a espécie e a estirpe consideradas. Ao ocorrer a inibição da actividade destas culturas, a lactose residual será posteriormente metabolizada pelas culturas adventícias, cuja grandeza será igualmente influenciada, entre outros factores, pelo teor de sal (Guinee e Fox, 1993).

Nos queijos Feta e Teleme, submetidos a maturação em salmoura, observou-se que o efeito combinado do pH e do sal na fase aquosa era inibidor de algumas bactérias lácticas mas favorecia o crescimento de outras estirpes resistentes ao sal, com papel relevante na maturação do produto (Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetaki, 1992). No queijo Domiati, em que o sal é adicionado ao leite, os micrococos e os lactobacilos são os microrganismos dominantes, estando também presentes, devido à sua halotolerância, os enterococos (Abd El-Salam et al., 1993). No queijo Picante da Beira Baixa, em que a salga é feita por fricção à superfície, na coalhada fresca e após 2 a 8 dias de maturação, o elevado conteúdo de sal atinge a supersaturação no final da maturação, criando um ambiente único que permite o crescimento apenas de algumas estirpes que manifestam elevada halotolerância, como por exemplo estirpes de *Lactobacillus plantarum* e de *Lb. paracasei* e de enterococos bem como de algumas leveduras, entre elas *Debaryomyces*

hansenii, *Cryptococcus laurentii*, *Yarrowia lypolitica* e *Rhodotorula* spp. Os lactococos e os leuconostoc são apenas observados nos primeiros dias de maturação tal como algumas enterobactérias (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* e *Serratia liquefaciens*) (Freitas et al., 1995; 1996).

Em resposta às várias condições do meio, as bactérias lácticas, principais fontes de sistemas enzimáticos durante a maturação do queijo (El Soda, 1997), têm capacidade para modificar o seu metabolismo levando à acumulação de produtos finais diferentes dos que surgem a partir da fermentação da glucose. Estes produtos, geralmente, resultam da alteração do metabolismo do ácido pirúvico e/ou da utilização de aceitadores de electrões externos (Axelsson, 1993).

Ou seja, em função do ambiente bioquímico e físico-químico, durante o seu crescimento, estas bactérias desencadeiam alterações metabólicas com passagem de um sistema homofermentativo a heterofermentativo, regulando diversas actividades enzimáticas (Frey e Hubert, 1993). Segundo Cogan (1995), não se trata propriamente de uma troca de sistema fermentativo. Estes são, antes, os produtos heterofermentativos do metabolismo do piruvato, diferentes dos da via heterofermentativa, que os produz a partir da xilulose-5-P.

A oxidação do substrato durante a fermentação bacteriana da glucose leva à formação de NADH, a partir de NAD^+ , que tem que ser regenerado de modo a garantir a continuidade da fermentação. O ácido pirúvico ocupa uma posição importante na fermentação uma vez que serve como aceitador de electrões (ou de H^+) para esta regeneração (Figura II-1) (Axelsson, 1993). Por outro lado, a maioria das bactérias lácticas pode oxidar NADH utilizando o oxigénio como aceitador de electrões, substituindo, portanto, a redução do ácido pirúvico até ácido láctico (Marshall, 1992). Assim, o NAD^+ regenerado compete eficientemente com as lactato desidrogenases (via glicolítica) ou com as acetaldeído desidrogenases ou álcool desidrogenases (via 6PG/PK),

evitando a redução do ácido pirúvico a láctico e do acetil CoA a acetaldeído e, deste, a etanol, respectivamente (Axelson, 1993; Marshall, 1992).

Sob certas circunstâncias, a generalidade das bactérias lácticas segue vias alternativas de utilização do ácido pirúvico, que não a sua redução a ácido láctico, com a acumulação de outros produtos como ácidos acético e fórmico, dióxido de carbono, etanol e peróxido de hidrogénio, diacetilo e acetoína (Axelsson, 1993).

Há quatro vias alternativas à via da lactato desidrogenase (LDH) para o metabolismo do ácido pirúvico e que estão esquematizadas na Figura II-2: a via da piruvato formato liase (PFL) com a produção de ácidos fórmico e acético ou etanol; a via da piruvato desidrogenase (PDH) com a produção de ácido acético ou etanol e dióxido de carbono; a via da piruvato oxidase (PO) com a produção de ácido acético e dióxido de carbono e a via diacetilo/acetoína com a produção dos compostos com o mesmo nome e de 2,3-butanetriol (Steele, 1998).

A via da piruvato-formato liase (PFL) é a principal via alternativa à da LDH em muitas bactérias lácticas homofermentativas que crescem em anaerobiose e em condições de limitação do substrato. Os produtos finais formados são os ácidos fórmico e acético e o etanol (Figura II-2) (Kandler, 1983; Condon, 1987; Marshall, 1992; Axelsson, 1993; Cogan, 1995).

A via da piruvato desidrogenase (PDH) só difere da anterior (via PFL) no primeiro passo, em que o ácido pirúvico é sujeito a uma descarboxilação oxidativa formando dióxido de carbono em vez de ácido fórmico, com redução de NAD^+ (Cocaign-Bousquet et al., 1996) (Figura II-2). Provavelmente coexiste em muitas bactérias lácticas com a PFL. Aparece em lactococos e lactobacilos heterofermentativos (Condon, 1987; Axelsson, 1993; Marshall, 1992), foi também encontrada em *Enterococcus faecalis* (Kandler, 1983) e em leuconostoc (Nuraida et al., 1992; Cogan e Jordan, 1994; Cogan, 1995).

A PDH não é sensível ao oxigênio e está presente em concentrações mais elevadas em culturas aeróbias do que em culturas anaeróbias (Condon, 1987), verificando-se que em lactococos em condições de aerobiose, a actividade da PDH é elevada enquanto que a da LDH é baixa, ocorrendo o inverso em condições de anaerobiose (Cogan, 1995).

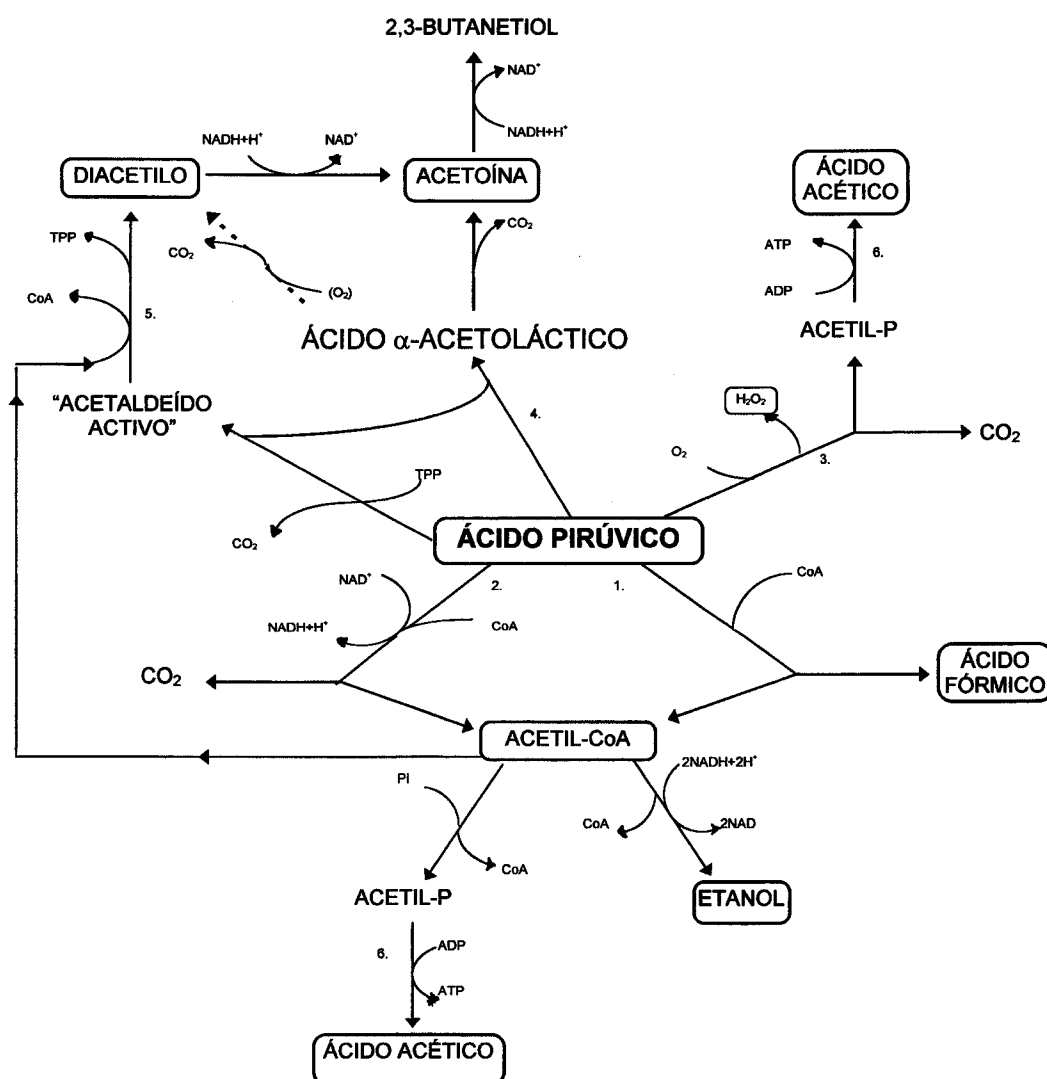


FIGURA II-2 - Vias Metabólicas Alternativas para a Utilização do Ácido Pirúvico. (Adaptado de Axelsson, 1993). As setas a tracejado indicam a ocorrência de reações não enzimáticas. Os metabolitos e produtos finais importantes estão emoldurados. Reações enzimáticas numeradas: 1. Piruvato formato liase; 2. Piruvato desidrogenase; 3. Piruvato oxidase; 4. Acetolactato sintase; 5. Diacetil sintase; 6. Acetato quinase.

O metabolismo posterior do acetil CoA para formar ácido acético ou etanol envolve, respectivamente ou a actividade da fosfotransacetilase e acetoquinase ou aldeído e álcool desidrogenases. A formação de ácido acético produz ATP, enquanto que a de etanol gera 2 NAD⁺. Quando a PFL é activa, o acetil CoA é transformado em ácido acético e etanol com um ganho adicional de ATP. Mas quando a PDH é utilizada, todo o acetil CoA poderá ser convertido em etanol, de modo a manter o equilíbrio de NADH, que também pode também ser utilizado por NADH oxidase/peroxidase (Cocaign-Bousquet et al., 1996).

A via da piruvato oxidase (PO) é considerada como um mecanismo alternativo à via da PDH para a formação de acetil fosfato, em aerobiose. A PO, catalizando a reacção directa do ácido pirúvico com o oxigénio molecular, converte-o em dióxido de carbono e acetil-P, com formação de peróxido de hidrogénio (Figura II-2) (Condon, 1987; Axelsson, 1993).

Parece que não existe nos lactococos (Condon, 1987), mas a oxidação do ácido pirúvico a ácido acético pode ocorrer em vários lactobacilos como *Lactobacillus bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* e em *Ent. faecalis* (Devriese et al., 1991a; Frey e Hubert, 1993). Em *Lb. plantarum*, esta enzima está envolvida no metabolismo aeróbico, promovendo a formação de quantidades significativas de ácido acético, à custa de ácido láctico, o que não se verifica em anaerobiose em que ocorre a acumulação de ácido láctico (Frey e Hubert, 1993).

A via diacetilo-acetoína é uma via comum entre as bactérias lácticas e com grande significado nas fermentações dos produtos lácteos (Axelsson, 1993). É considerada como a via alternativa à utilização do ácido pirúvico tecnologicamente mais importante, ocorrendo a conversão deste ácido em acetoína e diacetilo (Kandler, 1983).

Pela via diacetilo-acetoína, o ácido pirúvico é descarboxilado até acetaldeído-tiaminapirofosfato (TPP) ("acetaldeído activo"). A α -acetolactato sintase

cataliza a condensação deste com ácido pirúvico, formando ácido α -acetoláctico e libertando dióxido de carbono (Figura II-2) (Hugenholtz, 1993).

Existe alguma controvérsia entre autores relativamente à formação de diacetilo. Por um lado, é atribuída a uma reacção de descarboxilação oxidativa não enzimática do ácido α -acetoláctico que, sendo uma molécula instável, facilmente se decompõe quimicamente, oxidativamente até diacetilo e não oxidativamente até acetoína (Starrenburg e Hugenholtz, 1991; Hugenholtz e Starrenburg, 1992; Hugenholtz, 1993; Monnet et al., 1994; Platteeuw et al., 1995). Por outro lado, parece que existe uma enzima (diacetilsintase) capaz de formar diacetilo directamente a partir do acetaldeído-TPP e acetil CoA, sem que se forme ácido α -acetoláctico (Cogan e Jordan, 1994; Cogan, 1995).

As bactérias lácticas que produzem acetoína e diacetilo são também capazes de reduzir estes compostos a butanetriol (Hugenholtz e Starrenburg, 1992; Hugenholtz, 1993; Cogan, 1995).

Quando as hexoses são a única fonte de carbono, a formação de diacetilo e de acetoína é lenta (Kandler, 1983). Contudo, torna-se significativa se houver excesso de ácido pirúvico nas células, em relação à necessidade em regenerar NAD^+ . O excedente de ácido pirúvico pode resultar da existência de uma fonte alternativa deste ácido em relação aos glúcidos fermentados que existem no meio, ou da existência de outro composto que actua como aceitador de electrões, economizando o ácido pirúvico formado durante a fermentação (Axelsson, 1993).

O ácido cítrico presente no leite, embora em quantidades relativamente pequenas (8 a 10mM (Schmitt et al., 1992; García-Quintáns et al., 1998)), pode constituir a fonte adicional de ácido pirúvico (Axelsson, 1993; Steele, 1998).

Cerca de 90% do ácido cítrico presente no leite é solúvel sendo a maior parte perdida no soro, embora a sua concentração, na fase aquosa, seja mais ou menos tripla da do soro, reflectindo, provavelmente, a concentração de citrato coloidal (Fox et al., 1993).

A capacidade para metabolizar este ácido entre as culturas de arranque, está limitada a leuconostoc e a biovariantes de *Lactococcus lactis*, designadas por estirpes de *Lc. lactis* cit⁺ ou *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, que rapidamente o utilizam na presença de um glúcido fermentável, e não como única fonte de energia (Marshall, 1992; Cogan e Jordan, 1994; Cogan, 1995; Steele, 1998), embora se admita poder haver algum crescimento microbiano à custa da utilização de ácido cítrico (Hugenholtz, 1993; Haddad et al., 1997). Segundo Vedamuthu (1994), as culturas puras de leuconostoc no leite são inertes, mas em associação com os lactococos e outras bactérias lácticas tem capacidade para utilizar o ácido cítrico presente. Contudo, certas estirpes de lactococos exercem um efeito inibitório sobre outras de leuconostoc que é atribuído à competição nutritiva para compostos azotados, Mn²⁺ e Mg²⁺ e que deve ser controlado de modo a que o crescimento exagerado de lactococos não inviabilize a população de leuconostoc (Bellengier et al., 1997).

Também podem utilizar o ácido cítrico algumas bactérias lácticas que constituem as culturas adventícias, nomeadamente *Lactobacillus plantarum* e outros lactobacilos mesófilos (Fox et al., 1993), mas, neste caso, mesmo na ausência de outro glúcido fermentável (Marshall, 1992).

Apesar destes condicionalismos, a utilização do ácido cítrico pelas bactérias lácticas tem uma importância inquestionável, uma vez que os produtos dela resultantes (dióxido de carbono, diacetilo, ácido acético, acetoína, butanetiol e acetaldeído) influenciam determinantemente quer a textura quer o sabor e aroma do queijo (Cogan e Hill, 1993; Fox et al., 1993; Hugenholtz, 1993; Cogan, 1995; García-Quintáns et al., 1998).

Alguns dos compostos produzidos durante o metabolismo do ácido pirúvico tem uma importância relevante no controlo do crescimento microbiano.

Os diferentes ácidos orgânicos presentes no meio desempenham uma acção antimicrobiana que é influenciada pelas suas constantes de dissociação, pelo pH do meio e, conseqüentemente, pela concentração de ácido no meio, a determinado pH (Frey e Hubert, 1993; Marshall e Tamime, 1997).

Possuindo uma constante de dissociação baixa, a pH neutro ou alcalino, os ácidos orgânicos encontram-se dissociados e, por isso, não entram nas células, enquanto que a pH ácido, estando não ionizados, podem entrar nas células bacterianas negativamente carregadas, sendo esta forma responsável pela sua actividade antimicrobiana (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Deák, 1991; Jay, 1992). Entre os vários ácidos orgânicos, os que têm constantes de dissociação mais elevadas encontram-se principalmente sob a forma não dissociada, a pH ácido ou neutro, e demonstram, por isso, maior actividade inibitória (Marshall e Tamime, 1997).

Por esta razão, embora fácil de determinar, o pH nem sempre é um indicador fiável do desenvolvimento dos microrganismos, informando apenas parcialmente sobre a concentração de ácidos fracos no meio, uma vez que em função do pH, grande parte destes compostos pode estar não dissociada. Em relação a estes ácidos, é precisamente esta fracção que se difunde através da membrana e será mais ou menos ionizada, dependendo do pH intracelular (Piard e Desmazeaud, 1991).

A inibição dos microrganismos ocorre a pH diferente para os distintos ácidos, ou seja, considerando as respectivas constantes de dissociação, a inibição sucede quando a fracção não ionizada do ácido atinge cerca de 20%. Como a maior eficácia inibitória de um ácido orgânico se deve ao facto da sua constante de dissociação ser mais elevada, considerando os ácidos acético e láctico, o primeiro é mais inibitório que o segundo a pH ácido. Mas estes dois ácidos actuam sinergicamente em meios pouco tamponizados. O ácido

lático diminui o pH do meio, aumentando, portanto, a toxicidade do ácido acético (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Piard e Desmazeaud, 1991; Buchanan et al., 1993; Frey e Hubert, 1993).

As bactérias lácticas heterofermentativas, entre elas os leuconostoc, que podem produzir ácido acético além de ácido lático, demonstram uma actividade antimicrobiana mais elevada, uma vez que, na mesma molaridade, o primeiro é mais inibitório que o segundo. Este tem uma constante de dissociação inferior e, como o pH intracelular é próximo da neutralidade, a maior parte encontra-se sob a forma ionizada (Piard e Desmazeaud, 1991). A actividade inibitória de leuconostoc sobre os psicotróficos é precisamente atribuída ao ácido acético produzido por esse género de bactéria láctica (Vedamuthu, 1994).

Concluindo, a actividade inibitória dos ácidos orgânicos é influenciada por vários factores como o pH, a temperatura, o tipo de ácido usado na acidificação e pela sensibilidade dos microrganismos que por sua vez depende de outros factores como a_w , E_n , tratamento térmico etc. Assim, é difícil prever a eficácia dos ácidos orgânicos no controlo do comportamento dos diferentes microrganismos presentes no alimento (Piard e Desmazeaud, 1991; El-Shenawy e Marth, 1992).

O peróxido de hidrogénio é responsável pela inibição de vários microrganismos, entre eles *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus* que podem estar presentes no leite, e pode formar-se quer pela degradação microbiana dos açúcares quer pela degradação oxidativa dos lípidos (Piard e Desmazeaud, 1991; ICMSF, 1993).

O peróxido de hidrogénio pode ser formado em quantidades significativas a partir da oxidação do ácido pirúvico, pela piruvato oxidase (Figura II-2), e a partir da oxidação do ácido lático, pela L-lactato oxidase ou pela L-lactato desidrogenase NAD independente. A sua produção e acumulação são favorecidas pelas baixas temperaturas e verifica-se uma relação inversa

entre a formação de peróxido de hidrogénio e a produção de ácido (Condon, 1987; Axelsson, 1993; Davidson e Hoover, 1993; Frey e Hubert, 1993).

A capacidade das bactérias lácticas produzirem peróxido de hidrogénio é muito influenciada pela composição do meio, embora as várias estirpes reajam de maneira diferente às condições culturais. Assim, quanto menor for a concentração de glucose, maior será a produção de peróxido de hidrogénio. O elevado conteúdo em Mn^{2+} também é importante para uma boa produção de peróxido de hidrogénio, por algumas estirpes, uma vez que é essencial para o crescimento e metabolismo microbianos (Berthier, 1993). Além disso, este ião facilita a produção de peróxido de hidrogénio pela conversão do anião superóxido (Condon, 1987; Piard e Desmazeaud, 1991; Axelsson, 1993).

As bactérias lácticas, anaeróbias facultativas, fermentam os açúcares com a participação dos sistemas NADH nas reacções de oxidação-redução. Estas moléculas, frequentemente induzidas pela presença de oxigénio, catalizam a sua redução até peróxido de hidrogénio ou água. Como intermediário desta redução, pode formar-se o anião superóxido, bastante instável, cuja conversão em peróxido de hidrogénio se deve à actividade da superóxido dismutase ou à presença de elevadas concentrações de Mn^{2+} (Condon, 1987; Piard e Desmazeaud, 1991; Axelsson, 1993).

A presença simultânea de peróxido de hidrogénio e de aniões superóxido origina a formação de radicais hidroxilo (OH^*), inibidores das células sensíveis ao oxigénio. O crescimento de bactérias lácticas leva, portanto, à formação de três derivados do oxigénio que são o peróxido de hidrogénio, o anião superóxido e o radical hidroxilo, vectores de toxicidade do oxigénio (Piard e Desmazeaud, 1991).

Esta toxicidade tem um efeito bacteriostático, competindo para os sistemas NADH ou aumentando a permeabilidade da membrana por peroxidação dos lípidos membranários, e um efeito bactericida, devido a alterações

irreversíveis ou reversíveis causadas pelos radicais livres e pelo peróxido de hidrogénio nos ácidos nucleicos bacterianos. Também é provável que a oxidação dos compostos sulfidril, presentes em grande número de enzimas ou co-enzimas, afecte o seu funcionamento (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Piard e Desmazeaud, 1991).

A acumulação de peróxido de hidrogénio pode chegar a níveis auto-inibitórios, dependendo da estirpe produtora. A maioria das bactérias lácticas possui NADH peroxidase que usa o peróxido de hidrogénio, como aceitador de electrões, produzindo água (Condon, 1987; Piard e Desmazeaud, 1991; Axelsson, 1993).

Relativamente aos outros metabolitos do oxigénio, algumas bactérias lácticas dispõem de superóxido dismutase e outras acumulam Mn^{2+} , em concentrações intracelulares elevadas, que as protege contra o anião superóxido prevenindo a formação de radicais hidroxilo. Ambos os mecanismos conduzem à produção de peróxidos (Axelsson, 1993; ICMSF, 1993). Por outro lado, grande número de microrganismos dispõe de catalases ou peroxidases que lhes permitem livrar-se deste composto. De qualquer forma, nos microrganismos com catalase, os efeitos antimicrobianos do peróxido de hidrogénio surgem quando a sua concentração é demasiado elevada para ser desdobrada ou quando os sistemas da catalase ou da peroxidase são destruídos (ICMSF, 1993).

No caso das bactérias lácticas, os ambientes aeróbios podem ser tóxicos para algumas estirpes mas para outras, o oxigénio bem como o peróxido de hidrogénio formado a partir do oxigénio constituem aceitadores de electrões adicionais ao metabolismo dos açúcares permitindo a reoxidação de NADH. Podem, assim, utilizar uma vasta gama de substratos para a produção de ATP e, conseqüentemente, atingir elevadas taxas de crescimento (Condon, 1987).

As bactérias Gram negativas estão mais protegidas dos efeitos de metabolitos do oxigénio, devido à presença de uma camada exterior de lipopolissacáridos que aprisiona o oxigénio molecular activo, ao contrário das bactérias lácticas em que o oxigénio molecular se difunde na camada do peptidoglicano e reage com os locais sensíveis na membrana (Piard e Desmazeaud, 1991).

Para além da importância no flavour dos produtos lácteos, o diacetilo também tem demonstrado alguma actividade antibacteriana. Embora apenas tenha evidenciado uma acção bacteriostática em relação a bactérias Gram positivas, tem-se revelado bactericida contra as bactérias Gram negativas e leveduras. As bactérias lácticas são muito pouco inibidas por este composto, ao contrário de *Staphylococcus* spp. e, em concentrações muito elevadas, pode ter um efeito supressivo sobre a flora psicotrónica Gram negativa (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Motlagh et al., 1991; Piard e Desmazeaud, 1991; Davidson e Hoover, 1993; Vedamuthu, 1994; Choisy et al., 1997b).

Apesar de as concentrações eficazes serem demasiado elevadas para que seja considerado como um conservante natural ou um bioconservante, parece que o diacetilo desempenha um papel relevante, quando em combinação com outros inibidores produzidos pelas bactérias lácticas, como os ácidos orgânicos (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Piard e Desmazeaud, 1991; Davidson e Hoover, 1993; Mäyrä-Makinen e Bigret, 1993; Choisy et al., 1997b; Frank e Hassan, 1998).

Em todos os queijos existe uma diversidade de espécies microbianas que contribui para a proteólise constituindo, nalgumas variedades, os seus principais agentes (Fox e McSweeney, 1997).

Sendo nutricionalmente bastante exigentes e uma vez que a concentração de amino-ácidos no leite é insuficiente para suportar o seu crescimento, as bactérias lácticas possuem um sistema proteolítico bastante completo. Este sistema envolve a acção concertada de proteinases e peptidases que

hidrolizam as proteínas do leite até amino-ácidos livres destinados à nutrição microbiana (Marshall, 1992; Fox et al., 1993).

Embora o sistema proteolítico das culturas de arranque, bem como o das culturas adventícias contribua pouco para a proteólise primária do queijo, é o principal responsável pela formação de pequenos péptidos e amino-ácidos livres, a partir da degradação da caseína (Law e Kolstadt, 1983; Fox e McSweeney, 1997).

Os lactococos, apesar de fracamente proteolíticos, dispõem de um sistema proteolítico perfeito, verificando-se uma certa homologia com o de muitas outras bactérias lácticas, podendo, o dos primeiros, servir de modelo para o estudo destas (Fox e McSweeney, 1997; Steele, 1998). Dele fazem parte enzimas extracelulares, sistemas de transporte e enzimas intracelulares (Figura II-3) (Kunji et al., 1996; Mulholland, 1997; Steele, 1998).

As enzimas extracelulares podem estar ligadas à parede ou à membrana celulares (Visser, 1993) e incluem proteinases capazes de hidrolizar caseínas, até péptidos suficientemente pequenos para serem transportados para o interior da célula (Fox e Mc Sweeney, 1997; Mulholland, 1997).

O transporte de compostos azotados através da membrana citoplasmática é feito através de sistemas de transporte de oligopéptidos, de sistemas de transporte de dipéptidos/tripéptidos e de sistemas de transporte de amino-ácidos, sendo o primeiro o de maior importância durante o crescimento de lactococos no leite (Steele, 1998).

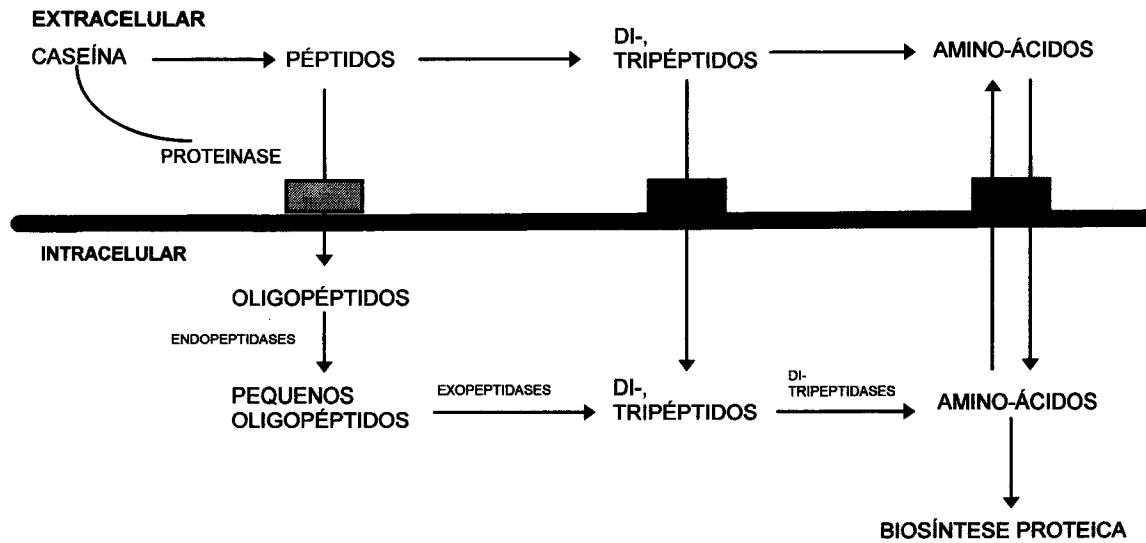
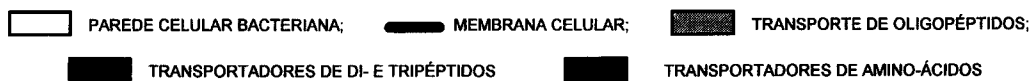


FIGURA II-3 - Modelo Esquemático do Sistema Proteolítico de Lactococos. (Adaptado de Pritchard e Coolbear (1993) e Mulholland (1997).



As enzimas intracelulares constam de endopeptidases e de exopeptidases, capazes de degradar os péptidos transportados até amino-ácidos essenciais e estimuladores do crescimento das bactérias lácticas, no leite, onde é escassa a quantidade destes compostos (Fox e Mc Sweeney, 1997; Mulholland, 1997).

A actividade proteinase é essencial para a degradação das caseínas até oligopéptidos, permitindo o crescimento das bactérias em ambientes contendo caseína, como o leite (Poolman et al., 1995). Quando a proteinase é secretada para o meio extracelular, a proteólise parece ser mais reduzida provavelmente porque a matriz do queijo restringe os movimentos dos péptidos (Law et al., 1993).

A κ -caseína é a melhor fonte de amino-ácidos essenciais para o crescimento microbiano. A sua hidrólise liberta alguns oligopéptidos, diferentes consoante a proteinase implicada, que contém todos os amino-ácidos necessários para

o crescimento. Deve salientar-se a importância do péptido κ -CN(f96-106) na nutrição das bactérias lácticas, uma vez que é produzido precocemente durante a proteólise e possui três resíduos do amino-ácido essencial histidina. Os péptidos produzidos, também precocemente, mas a partir da β -caseína, não contém este amino-ácido e, portanto, a hidrólise da κ -caseína é importante para satisfazer as necessidades em histidina das culturas de arranque (Pritchard e Coolbear, 1993; Reid et al., 1994; Flambard et al., 1998).

A entrada dos produtos de degradação da caseína nas células pode seguir três vias. Assim, estes produtos podem entrar como amino-ácidos livres, através de uma variedade de sistemas de transporte de amino-ácidos; os di- e tripéptidos podem entrar através de um sistema de transporte simples, mas que não transporta oligopéptidos maiores, existindo para estes um sistema de transporte de oligopéptidos capaz de transportar tetra, penta e hexapéptidos, e mesmo péptidos ligeiramente maiores (Pritchard e Coolbear, 1993; Poolman et al., 1995; Mulholland, 1997; Steele, 1998).

O sistema de transporte de di- e tripéptidos é importante para a actividade proteolítica das bactérias lácticas e, segundo alguns autores (Kok, 1990; Pritchard e Coolbear, 1993), é essencial para o crescimento microbiano.

Uma vez dentro da célula, os péptidos são hidrolizados por peptidases, a maioria das quais são metaloenzimas, cuja localização é incerta. No entanto, embora possam estar localizadas na periferia da célula, eventualmente ligadas à parede celular, são sempre intracelulares (Fox et al., 1993; Visser, 1993; Pritchard e Coolbear, 1993; Poolman et al., 1995; Kunji et al., 1996; Mulholland, 1997).

A degradação inicial dos oligopéptidos da caseína pode dever-se à acção de exopeptidases, que realizam a clivagem sistemática de amino-ácidos ou dipéptidos da extremidade N-terminal dos oligopéptidos, ou de endopeptidases, que catalizam a cisão dos oligopéptidos até outros mais

pequenos, em qualquer das suas ligações peptídicas desde que distantes das extremidades C- ou N-terminais, e que depois são degradados por aminopeptidases, di- e tripeptidases (Pritchard e Coolbear, 1993).

Nos lactococos não foram detectadas carboxipeptidases (Kok, 1990; Pritchard e Coolbear, 1993; Visser, 1993; Kunji et al., 1996; Steele, 1998).

É da actividade combinada de todas estas enzimas que os péptidos produzidos pela acção da proteinase da membrana celular e transportados para o interior das células são convertidos em amino-ácidos livres, necessários à nutrição e ao crescimento celulares e que constituem os precursores dos constituintes do flavour (Fox et al., 1993; Steele, 1998).

Apesar do pH óptimo de actividade da maioria destas enzimas ser elevado, demonstram actividade residual mesmo com os valores baixos de pH do queijo. O largo espectro de especificidades, bem como as diferentes localizações celulares das peptidases garantem, no queijo, uma degradação controlada dos fragmentos peptídicos gerados pela proteinase (Fox et al., 1993; Visser, 1993).

As bactérias lácticas possuem mais do que uma enzima capaz de hidrolizar um péptido particular ou produzir um amino-ácido específico. Portanto, quando lhes falta uma ou outra enzima, embora o perfil da hidrólise dos péptidos possa estar alterado, mantém a sua capacidade de crescimento no leite (Poolman et al., 1995; Kunji et al., 1996). Mas quando faltam várias enzimas simultâneamente, o crescimento torna-se mais lento e as taxas de crescimento decrescem à medida que as peptidases vão faltando (Kunji et al., 1996; Mulholland, 1997).

Além dos efeitos positivos que a actividade proteolítica pode determinar na formação do flavour característico do queijo, podem também surgir efeitos negativos que depreciam o produto (Thomas e Pritchard, 1987; Steele, 1998).

Um destes efeitos consiste no aparecimento do sabor amargo, atribuído à presença de péptidos hidrofóbicos, de pequeno tamanho, provenientes principalmente da região C-terminal da β -caseína (Thomas e Pritchard, 1987) mas também originados a partir da α -caseína (Lemieux e Simard, 1991). Embora a sua produção, no queijo, seja influenciada por variados factores (entre eles a qualidade do leite, o pH, a composição química e as condições de fabrico) os mais importantes são o teor microbiano e o tipo e quantidade de agente coagulante e de cultura de arranque utilizados (Lemieux e Simard, 1991).

No entanto, as bactérias lácticas tem enzimas capazes de degradar os péptidos amargos em produtos não amargos através da acção sequencial dos vários tipos de peptidases que possuem (Thomas e Pritchard, 1987; Visser, 1993).

Deve salientar-se que enquanto as enzimas proteolíticas ligadas à superfície da célula tem acesso ao substrato, no queijo, mantendo a integridade celular, os péptidos, provavelmente, só serão hidrolizados pelas peptidases intracelulares após a ruptura membranária, quando estas são lançadas e se difundem na massa do queijo. Assim, as elevadas densidades de culturas de arranque que persistem no queijo como células intactas podem favorecer o aparecimento do sabor amargo e reduzir o desenvolvimento do flavour desejado (Thomas e Pritchard, 1987).

Este defeito é mais raro nos queijos feitos com leite de ovelha e cabra que nos de vaca, uma vez que no desta espécie é maior o conteúdo em α -caseína cujos hidrolizados são mais amargos que os de β -caseína, sugerindo que quanto menor a quantidade de α -caseína, menor será o sabor amargo (Lemieux e Simard, 1991; 1992).

De entre as bactérias lácticas, os lactobacilos são os que tem necessidades mais extensas em amino-ácidos, possuindo, por isso, um elaborado sistema proteolítico (Khalid e Marth, 1990a; Peterson e Marshall, 1990; Fox et al.,

1993). Este sistema é mais ou menos conhecido e é semelhante ao dos lactococos, embora exibindo actividades proteinase e peptidase mais intensas (Khalid e Marth, 1990b; Peterson e Marshall, 1990; Fox e McSweeney, 1997). Produzem grandes quantidades de amino-ácidos, especialmente ácido glutâmico, prolina, lisina e leucina (Khalid et al., 1991).

As proteinases da maioria das espécies de lactobacilos estão associadas à parede celular mas também podem estar localizadas intracelularmente (Peterson e Marshall, 1990; Fox et al., 1993). Assim, em *Lactobacillus casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* foram evidenciadas proteinases associadas à parede celular e em *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lb. acidophilus* foram também purificadas proteinases intracelulares (Law e Kolstadt, 1983; Khalid e Marth, 1990a).

Estas enzimas tem um espectro de actividade vasto relativamente às α -, β - e κ -caseínas, embora demonstrando diferentes preferências para cada uma delas. As proteinases da maioria das estirpes de *Lb. helveticus* clivam as α - e β -caseínas mas não a κ -caseína (Khalid e Marth, 1990a; Yamamoto et al., 1994) embora existam estirpes capazes de degradar esta última (Khalid et al., 1991). Em *Lb. plantarum*, a β -caseína é preferencialmente cindida mas a α -caseína também o pode ser, parcialmente, enquanto que em *Lb. casei* a β -caseína não é hidrolizada (Khalid e Marth, 1990b).

Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* possui duas proteinases associadas à parede celular capazes de degradar todos os tipos de caseína embora a β -caseína seja a fracção mais susceptível (Thomas e Pritchard, 1987; Khalid e Marth, 1990a; Olson, 1990; Pritchard e Coolbear, 1993; Marshall e Tamime, 1997). Nesta espécie também tem sido referenciada uma proteinase intracelular (Khalid e Marth, 1990a).

As peptidases dos lactobacilos tem também largo espectro de actividade e localizam-se intracelularmente. Em *Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* e *Lb. plantarum*, entre outros, foram purificadas aminopeptidases, algumas delas específicas da prolina (Khalid e Marth, 1990a; Olson, 1990; Fox et al., 1993; Pritchard e Coolbear, 1993; Marshall e Tamime, 1997; Mulholland, 1998). Em *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. casei* e *Lb. plantarum* existem também dipeptidases mas as tripeptidases só foram purificadas em *Lb. casei* e *Lb. plantarum* (Khalid e Marth, 1990a; Khalid et al., 1991). Em *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* foi purificada uma aminopeptidase que hidroliza preferencialmente os dipéptidos e alguns tripéptidos contendo leucina em posição N-terminal (Kunji et al., 1996). Também a actividade carboxipeptidase apenas foi encontrada em *Lb. casei* e *Lb. plantarum* (Kok, 1990; Olson, 1990; Khalid e Marth, 1990a; Pritchard e Coolbear, 1993; Marshall e Tamime, 1997; Mulholland, 1997).

Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus*, com importância no fabrico de algumas variedades de queijo, embora seja fracamente proteolítico, tem grandes exigências nutricionais, tal como outras bactérias lácticas (Fox et al., 1993; Neviani et al., 1995). É usado juntamente com lactobacilos fortemente proteolíticos, como *Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, sendo o seu crescimento estimulado pelos amino-ácidos livres produzidos no leite pela actividade proteolítica desses microrganismos (Marshall, 1992; Fox et al., 1993).

Porém, verificou-se que actividade proteinase associada à parede celular, moderadamente forte, e a actividade peptidase são capazes de hidrolizar as proteínas até amino-ácidos essenciais para a sua nutrição e para a produção de outros compostos. Também foi observado que as estirpes de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* com maiores exigências nutricionais, em termos de amino-ácidos, são as que exibem actividades peptidolíticas mais activas e diversificadas, nomeadamente de

aminopeptidases e dipeptidases (Olson, 1990; Fox et al., 1993; Neviani et al., 1995).

Outras bactérias lácticas que não fazem parte das culturas de arranque, atingem populações elevadas durante a maturação do queijo. Embora nesta fase, geralmente, dominem os lactobacilos, também podem crescer os pediococos (Fox et al., 1993), constituindo, nalguns queijos, o género de bactérias adventícias dominante (Bhowmik e Marth, 1990).

Estes microrganismos são pouco proteolíticos. Contudo, muitas estirpes de *Pediococcus pentosaceus* e de *P. acidilactici* tem actividade proteinase, partindo quer a α - quer a β -caseína. Têm também actividades aminopeptidase, dipeptidase e exopeptidase específica da prolina, localizadas intracelularmente (Bhowmik e Marth, 1990; Fox et al., 1993).

Resumindo, em *Lactococcus lactis* e na maior parte das bactérias lácticas, uma vez que o sistema proteolítico do primeiro é bastante semelhante ao destas, a caseína é hidrolizada, extracelularmente, até oligopéptidos por proteinases. Grande parte dos péptidos formados penetra nas células através de um sistema de transporte de oligopéptidos e outros péptidos acumulam-se no meio. Alguns amino-ácidos essenciais entram nas células por sistemas de transporte de amino-ácidos ou sob a forma de di- ou tripéptidos, pelos sistemas de transporte di- e tripéptido. Intracelularmente foram identificadas várias peptidases que, actuando de forma concertada, clivam os péptidos em vários locais da sua cadeia, libertando os amino-ácidos essenciais e estimuladores do crescimento e indispensáveis para o desenvolvimento do flavour do queijo (Poolman et al., 1995; Kunji et al., 1996).

A contribuição directa dos péptidos e dos amino-ácidos para o flavour está, provavelmente, limitada ao sabor básico do queijo (Alting et al., 1995; Yvon et al., 1997). Mas estes compostos podem ser utilizados pelos microrganismos

para satisfação das suas necessidades metabólicas e estruturais estando sujeitos a variadas transformações (Hemme et al., 1982).

A degradação dos amino-ácidos, especialmente dos amino-ácidos aromáticos, de cadeia ramificada e sulfurados, pelas bactérias lácticas presentes no queijo, envolvendo reacções como a desaminação, a transaminação, a descarboxilação e a clivagem da cadeia lateral, gera compostos aromáticos contribuindo, indirectamente, para o flavour típico do queijo (Alting et al., 1995; Fox et al., 1996; Yvon et al., 1997). Porém, do catabolismo dos amino-ácidos pode também resultar a produção de indol, fenol, escatol ou compostos sulfurados, alguns deles com efeitos indesejáveis para o flavour (Hemme et al., 1982; Steele, 1998).

Os tipos de enzimas envolvidos na degradação dos amino-ácidos incluem desaminases, descarboxilases, transaminases e enzimas que hidrolizam as cadeias laterais (Visser, 1993; Alting et al., 1995). Como estão localizadas intracelularmente, é necessária a lise ou a permeabilização das bactérias para que as enzimas tenham acesso a estes substratos externos (Alting et al., 1995).

Entre os produtos formados encontram-se as aminas, os α -cetoácidos e outros amino-ácidos, que depois podem ser degradados até aldeídos que, reduzidos dão origem a alcoóis, e oxidados produzem ácidos (Hemme et al., 1982; Visser, 1993).

Também são importantes para o desenvolvimento do flavour as reacções entre amino-ácidos e compostos carbonil como glioxal, metilglioxal, diacetilo, dihidroxiacetona, acetoína e etanal, dependendo, o flavour resultante, do amino-ácido e do composto carbonil implicados. Como o mecanismo para esta formação necessita de oxigénio, pode estar minimizada no queijo, exceptuando à superfície de algumas variedades (Olson, 1990).

A transaminação é uma transformação importante que ocorre durante a maturação do queijo, uma vez que pode alterar a composição em amino-ácidos e produzir e modificar α -cetoácidos (Hemme et al., 1982).

Nos lactococos, onde não foi detectada actividade de desaminação nem de descarboxilação, a transaminação constitui uma reacção importante para a degradação de amino-ácidos aromáticos, como a tirosina, a fenilalanina e o triptofano, e de cadeia ramificada, que são os precursores dos compostos aromáticos (Yvon et al., 1997).

A desaminação determina a formação de amónia, presente em muitos queijos curados, e a sua libertação causa um aumento do pH, podendo também formar-se α -cetoácidos cuja descarboxilação origina aldeídos que, ao serem reduzidos, produzem álcoois e ao serem oxidados produzem ácidos (Hemme et al., 1982; Law et al., 1993; Molimard e Spinnler, 1996).

Os amino-ácidos também podem estar sujeitos a reacções de descarboxilação, produzindo dióxido de carbono e aminas, voláteis e não voláteis, com importância no flavour do queijo. Entre as aminas não voláteis destacam-se a tiramina, a histamina, a triptamina e a putrescina, cuja acumulação no queijo pode interferir com a saúde dos seus consumidores (Law e Kolstadt, 1983; Khalid e Marth, 1990a; Molimard e Spinnler, 1996; Ryser, 1998). Posteriormente, as aminas podem estar sujeitas a desaminação oxidativa, originando aldeídos (Molimard e Spinnler, 1996).

A degradação das cadeias laterais dos amino-ácidos pode ser feita por hidrolases que libertam amónia em consequência da desaminação dos grupos amida da cadeia lateral de asparagina e glutamina e da hidrólise parcial do grupo guanidina da arginina; por liases que actuam nas ligações C-O, degradando os amino-ácidos com função álcool (tirosina, serina) e produzindo o correspondente α -cetoácido (ácido α -cetobutírico e ácido pirúvico), amónia e água; ou por liases que quebram as ligações C-C

produzindo amónia e ácido pirúvico além de fenol ou indol, a partir de tirosina ou triptofano, respectivamente (Hemme et al., 1982).

Também é importante para o flavour de alguns queijos, a libertação de compostos sulfurados a partir de degradação de amino-ácidos sulfurados, como a metionina. Da degradação deste amino-ácido pode formar-se o metanetiol, composto sulfurado volátil que contribui significativamente para o aroma do queijo. A sua formação pode resultar quer da actividade da metionina- γ -liase, presente nalgumas bactérias lácticas como *Brevibacterium linens*, como da actividade da cistationina- β -liase e da cistationina- γ -liase, presentes nos lactococos e em alguns lactobacilos (Alting et al., 1995; Dias e Weimer, 1988a; b).

A actividade lipolítica das bactérias lácticas, apesar de muito fraca, também pode ser detectada durante o período de maturação do queijo, manifestando-se, principalmente, junto às células, facto a que não é alheia a localização intracelular das enzimas. Esta actividade evidencia-se, sobretudo, durante a fase logarítmica de crescimento (Fox et al., 1993; Choisy et al., 1997a).

Os lactococos são ligeiramente mais lipolíticos que os lactobacilos e a actividade esterase é relativamente superior à lipase, em todas as estirpes (Tsakalidou e Kalantzopoulos, 1992; Fox et al., 1993; Choisy et al., 1997a). Contudo, segundo Gobbetti et al. (1997), a actividade esterase manifestada pelos lactobacilos é superior à dos lactococos.

Sendo muito pouco lipolíticos, a influência dos lactobacilos na formação de ácidos gordos livres durante a maturação do queijo é muito pequena. Os triacilglicéridos com ácidos gordos de cadeia curta são hidrolizados mais rapidamente que os de cadeia longa pela maioria das estirpes de microrganismos com excepção de *Lactobacillus plantarum* e *Lb. casei*. Nestes foi detectada uma lipase intracelular, capaz de hidrolizar tributirina, mas pouco eficaz sobre a tripalmitina, a trioleína e a gordura do leite. No entanto, esta lipase tem capacidade para libertar ácidos butírico (C4:0),

capróico (C6:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) e também algum mirístico (C14:0), esteárico (C18:0), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3) (Khalid e Marth, 1990a).

Também em *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e em *Lb. helveticus* se detectaram actividades esterase intracelulares que, promovendo a libertação de ácidos gordos de cadeia curta (até C5) contribuem significativamente para o desenvolvimento do flavour, durante o processo de maturação (Khalid et al., 1991).

Alguns lactobacilos heterofermentativos, como *Lb. buchneri*, *Lb. brevis* e *Lb. hilgardii*, contêm esterases que, tal como noutros lactobacilos, nos lactococos e nos leuconostoc, degradam preferencialmente ácidos gordos de cadeia curta (Vafopoulou-Mastrojiannaki et al., 1996).

Quanto à sua presença nas diversas variedades de queijo, os lactococos são o género láctico predominante na coalhada e no início da maturação dos queijos Afuega'l Pitú, Cendrat del Montsec, Teleme e Pecorino d'Abruzzo, decrescendo, depois, em consequência da acidificação que favorece o crescimento dos lactobacilos que, por sua vez, também contribuem para diminuir o pH. Estes microrganismos constituem o género de bactérias lácticas mais comum nas coalhadas do queijo Feta, tendo menor expressão os enterococos e os pediococos (Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetaki, 1992; Mor-Mur et al., 1994; Delaglio et al., 1995; Cuesta et al., 1996).

De entre as bactérias lácticas encontradas na coalhada do queijo Serra da Estrela, predominam *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum*, *Leuconostoc lactis* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* que, embora em proporções diferentes, foram também detectadas na coalhada do queijo Picante da Beira Baixa (Macedo et al., 1995; Freitas et al., 1996).

No início da fase maturação de muitas variedades de queijo (Picante da Beira Baixa, La Serena, Serra da Estrela, Casar de Cáceres, Los Pedroches, Afuega'l Pitu, Feta e Teleme), as bactérias lácticas atingem os seus valores máximos, constituindo as principais responsáveis pela diminuição do pH até ao final da maturação. Como foi mencionado anteriormente, este parâmetro, associado à crescente concentração de sal observada até ao final da cura, constituem factores desfavoráveis à sobrevivência da maior parte dos microrganismos, causando uma redução gradual nos níveis de quase todos os grupos microbianos presentes (Fernandez del Pozo et al., 1988; Pouillet et al., 1991; Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetaki, 1992; Macedo et al., 1995; Sánchez et al., 1995; Cuesta et al., 1996; Freitas et al., 1996).

Após a coagulação do leite e nos primeiros dias de maturação do queijo, as bactérias lácticas que constituem as culturas de arranque vão diminuindo. Estas culturas são, principalmente, constituídas por lactococos, leuconostoc e enterococos e a sua lise, essencialmente ligada ao gasto de lactose, à diminuição do pH e ao aumento da concentração de sal, liberta nutrientes que serão utilizados pela flora secundária e adventícia e compostos que, directa ou indirectamente, contribuem para o flavour do queijo. Tornam-se, então, dominantes outros géneros mais resistentes ao ácido e ao sal como lactobacilos, enterococos e pediococos, que se mantêm até ao final da maturação (Fernandez del Pozo et al., 1988; Más e Gonzalez-Crespo, 1992; Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetakis, 1992; Mc Sweeney et al., 1993; Tzanetakis et al., 1995; Cuesta et al., 1996; Freitas et al., 1996; Johnson, 1998).

Assim, no queijo Afuega'l Pitu, os lactococos predominam até aos três dias de maturação, os leuconostoc são as principais bactérias lácticas encontradas aos oito dias mas decrescem sendo os lactobacilos os predominantes desde os quinze dias até ao final de um período de maturação de 60 dias (Cuesta et al., 1996).

No queijo Serra da Estrela, *Leuconostoc lactis* parece ser a espécie que evidencia maior crescimento ao longo da maturação, predominando no produto acabado, onde também é significativa a presença de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Embora *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lb. plantarum*, *Enterococcus faecium* e *Leuconostoc mesenteroides* possam estar presentes no final da maturação, as suas populações são mais reduzidas que no início deste período (Macedo et al., 1995).

No queijo Picante da Beira Baixa, as bactérias lácticas constituem um dos principais grupos microbianos durante a maturação. *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Ln. lactis* apenas estão presentes no início da maturação. Os enterococos (*Ent. faecium*, *Ent. faecalis* e *Ent. durans*) e os lactobacilos (*Lb. plantarum* e *Lb. paracasei*) são os predominantes durante toda a maturação, atingindo populações elevadas no início, que diminuem gradualmente. Os enterococos podem manter proporções particularmente elevadas, uma vez que, devido à sua halotolerância, conseguem sobreviver às condições de a_w e às concentrações de NaCl particularmente inóspitas que caracterizam este produto. Os lactobacilos, que não suportam condições tão extremas, desaparecem no final da maturação (Freitas et al., 1995; 1996).

No queijo Majorero, em que estas condições, apesar de pouco propícias ao crescimento microbiano, não são tão exigentes como no queijo Picante da Beira Baixa, os lactococos (*Lactococcus lactis*), os leuconostoc (*Leuconostoc mesenteroides*) e os enterococos (*Enterococcus faecalis*) predominam durante toda a maturação, sendo as populações de lactobacilos (*Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. brevis* e *Lb. fermentum*) menos numerosas que as deles (Fontecha et al., 1990).

Também nos queijos César de Cáceres e Los Ibores, *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc lactis* foram isolados apenas no início da maturação. Durante o período de maturação encontram-se *Leuconostoc mesenteroides*,

Lactobacillus plantarum, *Enterococcus faecium* e *Ent. faecalis* que se mantêm até ao final (Más e Gonzalez-Crespo, 1992; Pouillet et al., 1993).

Nos queijos Feta e Teleme, curados em salmoura, a evolução das bactérias lácticas é bastante influenciada pelos valores de pH ácido e pelas elevadas concentrações de NaCl que caracterizam estes queijos. Assim, no primeiro, o crescimento dos lactobacilos é favorecido por estas condições de modo que no final da maturação representam cerca de 90% da flora total do queijo, sendo *Lb. plantarum* a espécie mais abundante, devido à sua halotolerância. No queijo Teleme, embora também predominem os lactobacilos devido ao pH ácido, as bactérias sensíveis ao sal podem sobreviver, uma vez que as concentrações de sal são inferiores às do queijo Feta, encontrando-se lactococos nos primeiros dias do período de maturação. Durante o primeiro terço do período de maturação de 180 dias, podem crescer os leuconostoc, e, posteriormente, dominam os lactobacilos (Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetaki, 1992).

O desenvolvimento da população de bactérias lácticas é consideravelmente influenciado pelas condições ambientais sob as quais decorre a maturação. Assim, no queijo Serra da Estrela, o seu desenvolvimento é favorecido no Outono e no Inverno, observando-se as populações mais numerosas nestas estações. As temperaturas mais baixas e os maiores teores de humidade relativa que se verificam nestas épocas do ano são os responsáveis por este crescimento (Macedo et al., 1995).

No final da maturação do queijo Serra da Estrela fabricado no Outono, predominam *Leuconostoc lactis*, provavelmente a espécie que tem crescimento mais rápido, seguida de *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus paracasei*. No Inverno e na Primavera encontram-se mais frequentemente *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus paracasei*. De salientar que a presença de *Enterococcus faecium* é especialmente notada em queijos feitos no Inverno e Outono, o que provavelmente se relaciona com as

condições de alojamento dos animais associada à contaminação da matéria-prima e do produto durante o processamento (Macedo et al., 1995).

Nos queijos Casar de Cáceres e Los Pedroches, apesar de os números atingidos pelas bactérias lácticas no Inverno serem superiores aos da Primavera, os valores máximos são alcançados mais tardiamente que nesta estação. Além disso, quando o seu crescimento cessa, as populações microbianas presentes no queijo fabricado no Inverno mantêm os seus níveis elevados enquanto que na Primavera decrescem até ao final da maturação. Este comportamento é atribuído às condições mais desfavoráveis que são criadas nos queijos fabricados na Primavera, uma vez que estão sujeitos a temperaturas mais elevadas e a maiores perdas de humidade (Pouillet et al., 1991; Sánchez et al., 1995).

Ainda no queijo Cásar de Cáceres, as espécies de bactérias lácticas mais frequentemente encontradas no Inverno são do género *Leuconostoc* (*Leuconostoc lactis*, *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides*, *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *Ln. paramesenteroides*, actualmente *Weissella paramesenteroides*) mas também se identificaram *Lactobacillus curvatus*, *Lb. brevis* e *Lb. paracasei*. Na Primavera predominam *Lactococcus lactis* e várias espécies de *Enterococcus* bem como *Lactobacillus plantarum* e *Lb. rhamnosus* (Pouillet et al., 1993).

Micrococáceas:

Este grupo microbiano também se encontra em populações numerosas nos queijos, principalmente naqueles que são feitos a partir de leite cru, embora o seu número seja menor que o das bactérias lácticas (Bhowmik e Marth, 1990).

Algumas bactérias do género *Micrococcus* são bastante proteolíticas, produzindo proteinases extracelulares e proteinase(s) e peptidases

intracelulares - endopeptidases, aminopeptidases e dipeptidases (Bhowmik e Marth, 1990; Fox et al., 1993).

As proteinases extracelulares de certas estirpes de micrococos degradam preferencialmente a α -caseína, enquanto a β -caseína é preferencialmente degradada por extractos contendo componentes intracelulares (Bhowmik e Marth, 1990).

Por outro lado, os micrococos são mais lipolíticos que as bactérias lácticas (Choisy et al., 1997a), podendo dispor de uma a quatro esterases, com pH óptimo de 8 e temperatura óptima de actividade de 40°C, mas cuja actividade é fortemente inibida pelo NaCl (Fox et al., 1993), apesar de ter sido observado um efeito estimulante do sal sobre o crescimento de algumas espécies de estafilococos e micrococos, nalgumas variedades de queijo (Majorero, Roquefort e Serra da Estrela) (Fontecha et al., 1990; Gripon, 1993; Macedo, 1996).

Na coalhada do queijo Serra da Estrela, o número de estafilococos atinge o seu valor máximo, sendo as espécies predominantes *Staphylococcus xylosus*, *Staph. aureus* e *Staph. epidermidis* e, em menores números, *Staph. simulans* e *Staph. hominis*. Esta última espécie bem como *Staph. xylosus* e *Staph. saprophyticus* são também abundantes nas coalhadas do queijo Picante da Beira Baixa (Macedo et al., 1995).

A presença de diferentes espécies de estafilococos na coalhada do queijo Serra da Estrela é variável com a estação do ano, observando-se que *Staphylococcus xylosus* é mais frequente no Outono e na Primavera e *Staph. aureus* e outros estafilococos coagulase positivos são mais vulgares no Inverno (Macedo et al., 1995).

Nos queijos Afuega'l Pitú (Cuesta et al., 1996), Cendrat del Montsec (Mor-Mur et al., 1994) e La Serena (Fernandez del Pozo et al., 1988) tanto os micrococos como os estafilococos estão sujeitos a um decréscimo,

geralmente observado na primeira semana de maturação, em consequência da descida do pH. Nos queijos La Serena e Majorero, a redução destas populações também começa nos primeiros dias de maturação, coincidindo com um decréscimo de pH superior a uma unidade (Fernandez del Pozo et al., 1988; Fontecha et al., 1990; Nuñez et al., 1991; Cuesta et al., 1996).

Mas este decréscimo é, muitas vezes, seguido de um aumento devido ao crescimento de uma população mais tolerante ao ácido e ao sal presentes no queijo. No entanto, as crescentes concentrações de NaCl e de ácidos gordos livres e a diminuição da a_w são considerados como factores responsáveis pela menor taxa de crescimento destes microrganismos, revelando-se mesmo bastante eficazes na redução de estafilococos coagulase positivos presentes nos queijos La Serena e Majorero (Fernandez del Pozo et al., 1988; Fontecha et al., 1990; Nuñez et al., 1991; Cuesta et al., 1996).

No queijo Picante da Beira Baixa, o decréscimo dos estafilococos é particularmente marcado no último mês de maturação, quando a diminuição da a_w e o aumento da concentração de sal são mais pronunciadas (Freitas et al., 1995; 1996). As espécies mais abundantes ao longo da maturação deste queijo são *Staphylococcus xylosus* e *Staph. hominis*, sendo a primeira também frequente durante a maturação do queijo Serra da Estrela, embora nesta variedade, dado o seu pequeno número, os estafilococos provavelmente não desempenhem um papel significativo durante a maturação (Macedo et al., 1995; Freitas et al., 1996).

A população de estafilococos presente durante a maturação de alguns queijos também é influenciada pelas estações do ano. Assim, são mais abundantes no queijo Serra da Estrela fabricado na Primavera que naquele que é fabricado no Outono e Inverno, em consequência das condições ambientais que caracterizam estas épocas do ano e que favorecem o estabelecimento de uma acidez maior no Inverno (Macedo et al., 1995). Mas já nos queijos Casar de Cáceres e La Serena, no final da maturação de Inverno, os estafilococos ainda estão presentes, ao contrário do que sucede

na Primavera em que não são detectados (Fernandez del Pozo et al., 1988; Pouillet et al., 1991).

Enterobacteriáceas:

Durante os primeiros estadios do fabrico do queijo, ainda em presença de lactose e com valores de pH e temperatura favoráveis, os coliformes presentes no leite podem multiplicar-se muito rapidamente. No entanto, a acidificação rápida da coalhada, decrescendo o pH e reduzindo a disponibilidade em lactose, constitui um factor importante na redução destas populações tendo sido verificado que uma diferença de 0,2 unidades de pH é suficiente para exercer um efeito significativo na sobrevivência da população de coliformes (Gaya et al. (1983) (citados por Nuñez et al., 1985); Walstra et al., 1993).

Assim, nalgumas variedades de queijo como Armada-Sobado, Casar de Cáceres, La Serena, Los Pedroches e Serra da Estrela, as enterobactérias e os coliformes, geralmente, aumentam do leite para a coalhada, atingindo os seus valores máximos nesta fase ou na primeira semana de maturação, decrescendo, depois, até ao final da cura, em consequência, entre outros factores, da acidificação que ocorre durante a coagulação (Fernandez del Pozo et al., 1988; Pouillet et al., 1991; Tornadijo et al., 1993; Mor-Mur et al., 1994; Sánchez et al., 1995; Macedo, 1996).

Já nos queijos Afuega'l Pitu e Cendrat del Montsec, a forte acidificação que se verifica durante a coagulação (pH 4,42 e 4,02, respectivamente) determinou uma redução no número de enterobactérias e coliformes, em relação ao número encontrado no leite (Mor-Mur et al., 1994; Cuesta et al., 1996).

No queijo Picante da Beira Baixa, as populações de enterobactérias mantêm-se também elevadas no início da maturação sendo *Citrobacter freundii*,

Enterobacter cloacae e *Serratia liquefaciens* as espécies mais vulgarmente encontradas (Freitas et al., 1996).

Relativamente às enterobactérias presentes no queijo Serra da Estrela, *Hafnia alvei* e *Klebsiella oxytoca* são as predominantes na coalhada, especialmente na Primavera. Mas nas coalhadas de Outono é também abundante *Citrobacter freundii* e, nas de Inverno, é significativa a presença de *Escherichia coli* (Macedo et al., 1995).

O declínio das populações de enterobactérias e coliformes, ao longo da maturação do queijo, também tem sido atribuído ao efeito inibitório das bactérias lácticas e às condições ambientais que se vão estabelecendo neste produto.

Assim, nos queijos Manchego, La Serena, César de Cáceres, Los Pedroches, Afuega'l Pitu, Cendrat del Montsec e Serra da Estrela, apesar de se poder observar um aumento nas populações de enterobactérias e coliformes no início da maturação, segue-se um decréscimo até ao final, principalmente causado pela actividade das bactérias lácticas embora o aumento da concentração de NaCl também possa ser responsável pela redução destas populações, ao longo da maturação (Fernandez del Pozo et al., 1988; Nuñez et al., 1985; 1991; Pouillet et al., 1991; Mor-Mur et al., 1994; Macedo et al., 1995; Sánchez et al., 1995; Cuesta et al., 1996).

Mas nos queijos Armada-Sobado, Majorero e Picante da Beira Baixa, o desaparecimento rápido das enterobactérias durante a maturação está relacionado com a diminuição da a_w e do teor de humidade e com o aumento da concentração de NaCl e de ácidos gordos livres durante este período, embora também se verifique uma diminuição acentuada do pH, mas que por si só não é tão inibitória como os outros factores acima mencionados (Fontecha et al., 1990; Tornadijo et al., 1993; Freitas et al., 1996).

Nos queijos Picante da Beira Baixa e Armada-Sobado, as espécies de enterobactérias mais frequentemente encontradas foram *Serratia liquefaciens* e, também comum no queijo Serra da Estrela, *Hafnia alvei*, considerada como uma espécie típica dos produtos lácteos. No início da maturação destes queijos isolaram-se *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella oxytoca* e, durante a maturação e até ao seu final, encontraram-se, principalmente, *Hafnia alvei* e *Escherichia coli*, uma vez que são espécies que evidenciam uma certa resistência aos baixos valores de pH e a_w que caracterizam estes produtos. O isolamento de *E. coli* no produto final e não no início da maturação é justificado pela sua capacidade de resistência à maturação, o que a torna predominante em relação a outras espécies, facilitando o seu isolamento (Tornadijo et al., 1993; Macedo et al., 1995; Freitas et al., 1996).

Também as enterobactérias e os coliformes podem ser influenciados pelas condições ambientais prevalentes durante a maturação dos queijos. Assim, no queijo La Serena fabricado no Inverno estas populações eram superiores às presentes nos queijos fabricados na Primavera, pois as temperaturas de maturação mais elevadas que se verificam nesta estação aumentam a taxa de morte destes microrganismos, ao determinarem uma perda de humidade maior nos queijos, influenciando a a_w e a concentração de NaCl (Fernandez del Pozo et al., 1988).

Pela mesma razão, estes microrganismos decrescem gradualmente ao longo da maturação no Inverno, no queijo Los Pedroches, enquanto que na Primavera este declínio é muito mais acentuado, não sendo detectados no final da maturação (Sánchez et al., 1995).

A evolução das enterobactérias e dos coliformes presentes nos queijos Casar de Cáceres e Los Ibores é semelhante, em cada uma das épocas do ano, às referidas anteriormente. No entanto, este comportamento é atribuído ao efeito inibitório da população láctica. O decréscimo mais pronunciado na Primavera, resulta do facto de a população láctica atingir os seus valores

máximos mais precocemente, determinando uma maior e mais rápida acidificação no início da maturação, que no Inverno (Pouillet et al., 1991; Más e Gonzalez Crespo, 1993).

Mas no queijo Serra da Estrela, as populações de coliformes são maiores na Primavera e Outono pois não só as temperaturas ambientais prevalecentes facilitam o seu crescimento como também o menor número de bactérias lácticas presente nesta época permite a sua sobrevivência (Macedo et al., 1995).

Confirmando a importância da temperatura como factor condicionante do crescimento de enterobactérias e coliformes, no queijo Manchego verificou-se que a população de enterobactérias decrescia mais significativamente, ao longo da maturação, quando esta decorria a temperaturas mais elevadas (20°C) que a temperaturas mais baixas (5°C). Este efeito devia-se a uma maior produção de ácidos gordos livres que contribuía para a eliminação destes microrganismos, potenciando o efeito intrínseco da temperatura na taxa de morte dos microrganismos. Por outro lado, as temperaturas mais elevadas, favorecendo a proteólise, elevam o pH, podendo criar condições de sobrevivência a estes microrganismos (Nuñez et al., 1985).

Já os coliformes fecais presentes neste queijo sobrevivem dificilmente com temperaturas baixas (5°C), pois em condições desfavoráveis de pH e a_w , torna-se mais difícil obter energia de manutenção a estas temperaturas do que quando estas são mais próximas das óptimas de crescimento (Nuñez et al., 1985).

Leveduras e Bolores:

De entre os microrganismos que podem estar presentes ao longo do período de maturação do queijo, os fungos são os mais lipolíticos (Choisy et al., 1997a).

Nos queijos curados, em que os fungos desempenham um papel importante na maturação, a lipólise é muito mais extensa que noutras variedades e é, principalmente, executada por estes microrganismos. O teor em ácidos gordos livres na região interna do queijo é superior ao da zona externa, devido à maior concentração de NaCl nesta parte que constitui um factor limitante da produção de lipases e, possivelmente, da sua actividade (Gripon, 1993).

Por outro lado, a germinação de esporos de alguns bolores, como *Penicillium roqueforti* e *Penicillium camemberti*, usados como agentes de maturação de determinadas variedades de queijo, é estimulada por níveis moderados de NaCl, embora o crescimento dos esporos germinados suporte concentrações bastante mais elevadas, no queijo (Guinee e Fox, 1993).

É também durante a fase de maturação do queijo que as leveduras crescem, chegando a atingir populações apreciáveis da ordem das 10^5 - 10^7 células/g, no interior do queijo e 10^8 - 10^9 células/g na sua superfície. Inicialmente predominam as utilizadoras de lactose, importantes também no decréscimo do pH, mas depois são as utilizadoras de ácido láctico que passam a estar em maior número. Estas leveduras são, então, responsáveis pela diminuição da acidez do queijo, quer pela utilização do ácido láctico quer pela actividade proteolítica que detêm, o que permite o crescimento de bactérias cuja actividade é importante na maturação (Fleet e Mian, 1987; Fleet, 1990; Rohm et al., 1992).

As numerosas espécies de leveduras presentes durante a maturação do queijo dispõem de uma grande variedade de lipases exocelulares e intracelulares, com pH óptimo de actividade também muito variável e com selectividades diferentes entre elas (Choisy et al., 1997a). Segundo Dias (1997), a quase totalidade das leveduras isoladas da massa do queijo fabricado em Évora tem actividade lipolítica o que lhes confere um papel importante na lipólise durante a maturação, dadas as repercussões desta actividade nas características organolépticas do produto.

Os fungos são também responsáveis pela utilização de ácidos gordos, verificando-se que nos queijos em que estes microrganismos são mais abundantes se encontram os teores mais elevados de metil-cetonas, lactonas, álcoois secundários e ésteres, importantes constituintes do flavour (Choisy et al., 1997b).

A formação das metil-cetonas segue uma via metabólica ligada à β -oxidação dos ácidos gordos (Figura II-4), verificando-se que a concentração destes compostos aromáticos é proporcional à extensão da lipólise (Fox et al., 1993; Gripon, 1993; Choisy et al., 1997a). Alguns bolores (*Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti* e *Geotrichum candidum*) possuem um sistema enzimático que permite um desvio da via normal da β -oxidação. Assim, os ácidos gordos são oxidados até β -cetoacil-CoA que, sob a acção de uma tiohidrolase, é convertido em β -cetoácido. Este é rapidamente descarboxilado por uma β -cetoácido descarboxilase, originando uma metil-cetona, com menos um átomo de carbono que o ácido gordo original, e dióxido de carbono (Figura II-4) (Gripon, 1993; Molimard e Spinnler, 1996).

As metil-cetonas também podem surgir como consequência de ciclos de β -oxidação sucessivos (Molimard e Spinnler, 1996; Choisy et al., 1997a). Entre as metil-cetonas encontradas no queijo, predominam os compostos com 3 a 15 átomos de carbono, principalmente a heptanona e a nonanona nos queijos azuis e no Camembert, embora o ácido palmítico (C16:0) seja o principal ácido gordo presente (Gallois e Langlois, 1990; Molimard e Spinnler, 1996; Choisy et al., 1997a).

Esta via de degradação dos ácidos gordos, com formação de metil-cetonas, representa uma forma de desintoxicação do meio em relação a esses compostos, principalmente os de cadeia média, que podem ser inibidores para os microrganismos (Molimard e Spinnler, 1996; Choisy et al., 1997a).

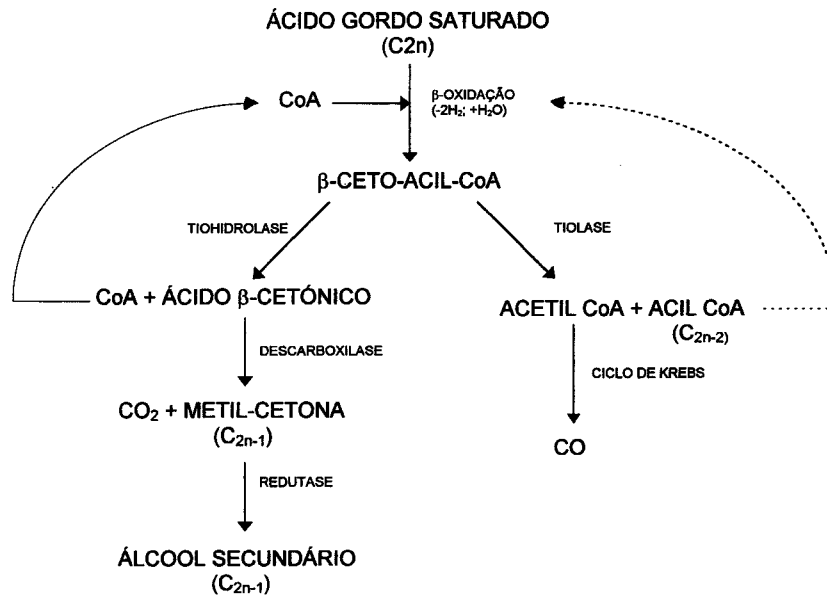


FIGURA II-4 - Transformação dos Ácidos Gordos por β -oxidação. (Adaptado de Choisy et al., 1997a).

Mas as metil-cetonas também podem ser imediatamente reduzidas a álcoois secundários, através da actividade redutase (Figura II-4) (Molimard e Spinnler, 1996; Choisy et al., 1997a), sendo os principais, no queijo Camembert, o heptanol e o nonanol, provenientes das respectivas metil-cetonas, que, aliás, são também as mais abundantes (Molimard e Spinnler, 1996).

A formação de lactonas pode ser consequência da acção do pH do meio, dos microrganismos ou de ambos os factores (Molimard e Spinnler, 1996) e verifica-se que a sua concentração é mais elevada nos queijos em que a lipólise é mais acentuada. Os níveis de lactonas aumentam mais rapidamente no início do período de maturação, e, provavelmente, influenciam o flavour, uma vez que os níveis encontrados no queijo eram bastante superiores ao limiar de percepção destes compostos (Fox et al., 1993).

São essencialmente γ e δ lactonas, principalmente decalactonas e dodelactonas que podem ser formadas por várias leveduras mas também por

bactérias, através da redução de ceto-ácidos a hidroxi-ácidos (Molimard e Spinnler, 1996).

Os ésteres presentes no queijo são sintetizados a partir de ácidos gordos de cadeia curta ou média e de álcoois diversos, como monoálcoois alifáticos (etanol), aromáticos (feniletanol) e tióis (metanetiol), derivados da fermentação da lactose e do catabolismo dos amino-ácidos (Molimard e Spinnler, 1996; Choisy et al., 1997a). As esterases envolvidas compreendem as acetilesterases, específicas para os ésteres de ácido acético, as arilesterases ou esterases aromáticas, presentes na maioria dos microrganismos e também as carboxilesterases, de largo espectro e activas para tioésteres (Choisy et al., 1997a).

A formação destes compostos é outra reacção de desintoxicação do meio, possibilitando a eliminação quer dos álcoois tóxicos e quer dos ácidos gordos (Molimard e Spinnler, 1996).

As espécies de leveduras mais frequentemente encontradas no queijo são *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis* e *Debaryomyces hansenii*/*Candida famata*. No entanto, nalgumas variedades, também são abundantes as espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula anomala* e de *Torulopsis* (Fleet e Mian, 1987; Fleet, 1990).

No queijo Serra da Estrela predominam, na coalhada e no produto final, *Sporobolomyces roseus* e *Debaryomyces hansenii*, estando esta última também presente durante parte da maturação do queijo Picante da Beira Baixa. Provavelmente devido às características deste queijo, a população de leveduras não é detectada no terço final do período de maturação e, enquanto presente, não evidencia uma grande variedade de géneros. No entanto, foram isoladas *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus laurentii* e *Rhodotorula* spp., cujas actividades proteolítica e lipolítica e a capacidade de utilização do ácido láctico são relevantes na produção de compostos com

importância no flavour deste queijo. No queijo Serra da Estrela, além das duas primeiras espécies citadas, também se encontram *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia membranaefaciens* (Macedo et al., 1995; Freitas et al., 1995; 1996).

No queijo artesanal produzido na região de Évora, *Rhodotorula* spp. e *Candida curvata* foram as espécies encontradas nas coalhadas enquanto que *Debaryomyces hansenii*/*C. famata* e *C. intermedia* eram as principais espécies presentes no final da maturação. Neste produto também foram isoladas, em menor proporção, *C. zeylanoides*, *Trichosporum cutaneum*, *Pichia etchellsii* e *Pichia carsonii* (Dias et al., in press).

Microorganismos responsáveis por perturbações de origem alimentar:

Os processos de fabrico do queijo, alterando substancialmente as condições de crescimento microbiano, influenciam o comportamento e determinam a presença dos vários microrganismos patogénicos e/ou das suas toxinas no produto final.

Assim é que a maioria das bactérias patogénicas não sobrevive ao fabrico das variedades de queijos duros suíços, como do tipo Emmental, devido ao efeito sinérgico de sistemas antibacterianos activos presentes no leite crú, da flora de arranque antagonista, da acidificação rápida, do efeito antimicrobiano do ácido láctico e das elevadas temperaturas utilizadas no fabrico da coalhada. Nas variedades de queijos semi-duros, como o Tilsiter, os efeitos da salga e da maturação a temperaturas elevadas, durante pelo menos 2 meses, elimina quase todas as espécies patogénicas (excepto *Listeria monocytogenes*) até ao final da maturação (Bachmann e Spahr, 1995).

Staphylococcus aureus:

Os queijos fabricados artesanalmente, principalmente aqueles que são feitos com leite cru, constituem um risco potencial de intoxicação estafilocócica. No entanto, esta matéria-prima oferece condições menos favoráveis ao crescimento e produção de enterotoxinas por *Staphylococcus aureus* devido à presença de uma flora competidora e ao efeito do SLP (Mossel e van Netten, 1990; Bachmann e Spahr, 1995).

A presença de *Staphylococcus aureus* no queijo pode estar relacionada com a utilização de leite contaminado ou ter origem na contaminação durante o fabrico do produto. As populações presentes no produto final dependem, em certa medida, da dimensão da população inicial (Zottola e Smith, 1991; Gómez-Lucía et al., 1992; Ryser, 1998).

Embora no início da manufactura do queijo se possa verificar um aumento pronunciado da sua população, em resultado do aprisionamento físico dos microrganismos na coalhada, geralmente, o crescimento posterior de *Staphylococcus aureus* no queijo cessa a pH inferior ou igual a 5,3 e, dum modo geral, a sua população decresce durante a maturação. No entanto, apesar desta redução poder ultrapassar os limites de detecção, impossibilitando que o microrganismo seja isolado, as suas enterotoxinas podem estar presentes no produto, caso as condições prévias tenham sido favoráveis à sua produção (Tatini et al., 1971; Asperger, 1994; Spahr e Url, 1994; Meyrand et al., 1998; Ryser, 1998).

Em geral, a produção de enterotoxinas tende a ser favorecida pelas condições óptimas de crescimento (nomeadamente pH, temperatura, a_w e E_h) e, embora *Staphylococcus aureus* possa crescer em condições mais extremas, os limites para a produção de toxinas são mais estreitos que os indicados para o crescimento do microrganismo produtor (Mossel e van Netten, 1990; Jay, 1992).

O crescimento e a actividade das culturas de arranque exerce um efeito inibitório pronunciado sobre a proliferação e a produção de toxinas por *Staphylococcus aureus* durante o fabrico do queijo. Este efeito resulta da produção de ácido e de outras substâncias com actividade antimicrobiana como o peróxido de hidrogénio, os ácidos gordos voláteis e as bacteriocinas, nomeadamente a nisina e, eventualmente, é também consequência da depleção de nutrientes, verificando-se que quanto mais abundante for a flora competidora presente menor será o crescimento e a produção de enterotoxinas por *Staph. aureus* no queijo (Gilmour e Harvey, 1990; Zottola e Smith, 1991; Gómez-Lucía et al., 1992; Abdalla et al., 1993; Asperger, 1994; Bachmann e Spahr, 1995; Ryser, 1998).

Em presença de flora competidora este microrganismo só se multiplica a pH 6-8 com temperaturas superiores a 20°C, enquanto aquela é capaz de se multiplicar com temperaturas inferiores e com valores de pH ligeiramente mais baixos (Asperger, 1994).

Staphylococcus aureus também é muito sensível à competição por agentes comuns de deterioração como pseudomonas, enterococos, lactobacilos e enterobactérias cuja actividade antagonista, competição por nutrientes e modificação das condições ambientais pode limitar o seu crescimento e a produção das suas enterotoxinas. Se por um lado, a proliferação destes microrganismos no alimento causa, geralmente, modificações facilmente detectáveis, como alterações da cor, cheiro, consistência etc, muito antes da população de *Staph. aureus* ser capaz de produzir quantidades de toxinas clinicamente significativas, por outro lado, em alimentos com baixa a_w , o crescimento desses microrganismos pode estar comprometido, não causando alterações organolépticas no produto e permitindo a proliferação e manutenção de *Staph. aureus* (Mossel e van Netten, 1990; Jay, 1992; Asperger, 1994).

A concentração de sal da maioria das variedades de queijo situa-se entre os 1,6 e os 2,5%. É, portanto, insuficiente para evitar o crescimento de

Staphylococcus aureus, uma vez que este microrganismo pode tolerar concentrações até 20%. As pequenas concentrações de sal podem mesmo contribuir para manter estável a sua população, ao exercerem efeitos adversos na flora saprofítica, nomeadamente láctica, menos halotolerante, anulando a sua actividade antagonista (Asperger, 1994; Spahr e Url, 1994; Ryser, 1998).

Também os valores de a_w encontrados para a maior parte das variedades de queijo variam entre 0,917 e 0,988, não sendo limitante para o crescimento de *Staphylococcus aureus* que se desenvolve bem em produtos cuja a_w se situa entre 0,86 e 0,90 (Asperger, 1994; Spahr e Url, 1994; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997; Ryser, 1998).

A temperatura a que o queijo está submetido durante a maturação também influencia a sobrevivência de *Staphylococcus aureus*. Em geral, quanto mais elevada for a temperatura durante a maturação, maior será o declínio da sua população ao longo deste período, embora este parâmetro possa ser influenciado pelo conteúdo de sal do produto. No entanto, o crescimento e a produção de enterotoxinas são quase inibidos a temperaturas inferiores a 7°C, e portanto, a utilização de temperaturas baixas durante a maturação do queijo também tem sido considerada como um factor importante na redução desta população (Gilmour e Harvey, 1990; Mossel e van Netten, 1990).

No queijo Serra da Estrela, as maiores percentagens de estafilococos coagulase positivos foram observadas nas coalhadas de Inverno. No entanto, estas espécies eram mais resistentes na Primavera e no Outono, uma vez que não foram isoladas dos queijos fabricados no Inverno. Provavelmente as coalhadas mais ácidas observadas nesta estação, em que a população láctica neste queijo era mais abundante, criaram condições desfavoráveis à sobrevivência deste microrganismo (Macedo et al., 1995).

Mas nos queijos La Serena, Los Ibore e Casar de Cáceres, a população de estafilococos coagulase positivos era menor na Primavera que no Inverno.

Neste último queijo, o comportamento desta população ao longo da maturação nas duas épocas do ano consideradas (Primavera e Inverno) segue o padrão observado para a maioria das outras populações microbianas presentes. Assim, as populações bacterianas observadas no Inverno são mais numerosas, os seus valores máximos são atingidos mais tardiamente e o seu decréscimo ao longo da maturação é menos acentuado que na Primavera. O declínio mais pronunciado das populações de estafilococos coagulase positivos observado na Primavera é atribuído ao maior conteúdo de sal e menor valor de a_w , relacionados com as temperaturas ambientais mais elevadas e as taxas de humidade relativa do ambiente mais baixas observadas na Primavera (Fernandez del Pozo et al., 1988; Pouillet et al., 1991; Más e González Crespo, 1993).

Também no queijo Los Ibores fabricado na Primavera não se detectaram *Staphylococcus aureus* no final da maturação, mas estão presentes, embora em pequeno número nos queijos fabricados no Inverno. Os valores de pH, muito próximos de 5 nos queijos fabricados na Primavera, são considerados responsáveis pela inibição deste microrganismo nesta época do ano. Por outro lado, no Inverno, o pH e a concentração de sal mais elevados e a menor a_w favorecem o seu crescimento (Más e González-Crespo, 1993).

Na maior parte dos queijos, a população de *Staphylococcus aureus* presente à superfície é superior à do interior uma vez que é favorecida pelos teores de humidade e sal e também pelas condições de aerobiose existentes nessa zona do queijo. Por outro lado, a proliferação de bolores e de leveduras utilizadoras do ácido láctico que geralmente ocorre à superfície, contribui para a subida dos valores de pH, favorecendo também a sobrevivência e o crescimento de *Staph. aureus* (Fernandez del Pozo et al., 1988; Pouillet et al., 1991).

Brucella spp.:

Tal como acontece com outros microrganismos, a sobrevivência de *Brucella* spp. no queijo está relacionada com o processo de fabrico deste produto, sendo influenciada principalmente pela acidez da coalhada e pelas condições em que decorre a maturação (Plommet et al., 1988; Garin-Bastuji e Verger, 1994).

Assim, as populações de *Brucella* spp., geralmente, vão decrescendo desde a fase de manufactura até ao final da maturação, verificando-se que a sua sobrevivência varia de 6 dias nos queijos de pasta dura a 18 a 57 dias nos queijos de pasta mole (Spahr e Url, 1994; Letondeur-Lafarge e Lahellec, 1997).

No entanto, o microrganismo persistiu durante períodos mais prolongados nalgumas variedades de queijo (90 dias no queijo Pecorino e 60 dias no queijo Roquefort), o que causa sérias preocupações do ponto de vista sanitário, uma vez que o período mínimo de 60 dias a temperaturas superiores ou iguais a 1,7°C, pode não ser suficiente para garantir a inocuidade do produto (Ryser, 1998).

Listeria monocytogenes:

Listeria monocytogenes tem a capacidade de sobreviver durante a manufactura e a maturação de diversas variedades de queijo, podendo nalgumas ser detectados valores da ordem dos 10^7 ufc/g de produto (Farber e Peterkin, 1991).

A presença de *Listeria monocytogenes* no queijo pode ter origem na utilização de leite contaminado e, uma vez que é um microrganismo ubiqüitário, presente em ambientes onde existem bactérias lácticas, os

produtos podem ser facilmente contaminados durante as fases do seu fabrico ou comercialização (Farber e Peterkin, 1991; Donnelly, 1994).

De uma forma geral, verifica-se que, em queijos fabricados com leite inoculado artificialmente, o número de bactérias observado nas coalhadas das diferentes variedades é superior ao da matéria-prima (Spahr e Url, 1994). Esta circunstância é atribuída principalmente ao aprisionamento físico das bactérias nas coalhadas, não sendo significativo o crescimento bacteriano, uma vez que o tempo de latência de *Listeria monocytogenes*, de cerca de 3,5 a 4 horas em Caldo de Triptona, a pH 5,6 e a 35°C, é superior ao tempo em que decorre a manufactura dos queijos (Ryser e Marth, 1987; Yousef e Marth, 1990; Buazzi et al., 1992a; b).

Por outro lado, nalgumas variedades, como no Emmental, no Gruyère e no Mozzarella, verifica-se uma redução da população desta bactéria durante o fabrico da coalhada, que é principalmente devida às elevadas temperaturas (53°C, 56°C e 40/58°C com dois minutos a 65°C, respectivamente) utilizadas nesta fase de fabrico (Buazzi et al., 1992a; b; Spahr e Url, 1994; Bachmann e Spahr, 1995).

Durante o período de maturação da maioria das variedades de queijo verifica-se o decréscimo da população de *Listeria monocytogenes*, sendo este declínio mais acentuado nos queijos Parmesão (Yousef e Marth, 1990) e Suíço de pasta dura (Emmental) (Buazzi et al., 1992a; Bachmann e Spahr, 1995) e mais suave nos queijos Cheddar, Colby, Gouda e Azul (Ryser e Marth, 1987; Schaffer et al., 1995). Contudo, existem também variedades em que se observa o aumento da população de *Listeria monocytogenes* ao longo da maturação, como é o caso do Camembert e dos queijos curados por bolores e do queijos Brick e Limburger (Ryser e Marth, 1989, Pearson e Marth, 1990; Faber e Peterkin, 1991; Spahr e Url, 1994).

No queijo Parmesão, é atribuído um papel importante à destruição de *Listeria monocytogenes*, ao longo da maturação, quer às características do produto,

nomeadamente valores de a_w baixos, quer às condições em que decorre a maturação, em que as temperaturas são mais ou menos elevadas (12,8°C). Quando inoculada em leite destinado ao fabrico do queijo, *L. monocytogenes* é submetida a temperaturas de aquecimento da coalhada de cerca de 51°C durante 45 min. O efeito desta temperatura associado ao efeito das substâncias antimicrobianas produzidas pelas culturas de arranque, como os ácidos orgânicos, danifica as células de *L. monocytogenes* que não encontram, durante a maturação do queijo, condições favoráveis à sua recuperação, morrendo mais rapidamente que as células saudáveis. Por isso, não são detectadas no produto final (Yousef e Marth, 1990).

Também no queijo Suíço de pasta dura (Emmental), a tecnologia utilizada no seu fabrico não facilita o crescimento deste microrganismo, quando presente na matéria-prima. As elevadas temperaturas utilizadas no fabrico das coalhadas (53°C) são responsáveis pela sua eliminação, não sendo detectado 1 dia após a manufactura (Bachmann e Spahr, 1995). No entanto, Buazzi et al. (1992a), utilizando temperaturas de 50°C no fabrico da coalhada, verificaram que a população decrescia nesta fase, mas não era completamente eliminada. Observou-se um decréscimo acentuado durante a salga a 7°C durante 30 horas e, um período de 10 dias a 7°C, também revelou uma diminuição contínua da população de *Listeria monocytogenes*. Esta população continuou a decrescer durante a maturação e não foi detectada após 80, 77 e 66 dias no queijo feito com leite inoculado com as diferentes estirpes California, Ohio e V7, respectivamente.

Estes autores consideram os efeitos combinados do pH, dos produtos de fermentação e dos metabolitos das bactérias lácticas, do conteúdo de sal, da a_w e das temperaturas de maturação como prejudiciais para a sobrevivência da bactéria no produto, contribuindo para a sua redução durante a maturação deste queijo (Buazzi et al., 1992a).

No queijo Suíço de pasta semi-dura (Tilsit), *Listeria monocytogenes* encontra condições para sobreviver durante mais de 90 dias de maturação e, apesar

de não se observar crescimento no interior do queijo, esta bactéria cresce abundantemente na superfície (Bachmann e Spahr, 1995).

No queijo Cheddar, a população de *Listeria monocytogenes* sofre um declínio durante a maturação, podendo ser detectada no final deste período. Inicialmente, verifica-se um ligeiro aumento de cerca de 0,1 a 0,8 unidades logarítmicas, mas aos 14-21 dias de maturação, esta população começa a decrescer. A sua sobrevivência pode ser longa, chegando aos 224, 154 ou 434 dias, conforme se trate das estirpes Scott A, California ou V7, respectivamente (Ryser e Marth, 1987).

Nesta variedade, os valores de pH de cerca de 5,0 a 5,15 e as concentrações de NaCl de cerca de 1,6% não são suficientes para eliminar a bactéria dentro do período de 60 dias a temperaturas superiores a 1,7°C, considerado necessário para que os queijos feitos com leite cru ou tratado termicamente, que não a pasteurização, estejam livres de microrganismos patogénicos (Ryser e Marth, 1987).

Mas a inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* é também atribuída ao efeito dos ácidos gordos libertados durante a lipólise do queijo, associado aos efeitos do pH, da concentração de sal e da temperatura de maturação (Pearson e Marth, 1990; Mehta e Tatini, 1994). Esta inibição é tanto mais acentuada quanto maior fôr a concentração de ácidos gordos livres presente no queijo e foi demonstrado que os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) têm efeito inibitório sobre *Listeria monocytogenes* (Schaffer et al., 1995).

Mais recentemente, Petrone et al. (1998) demonstraram o efeito dos diferentes ácidos gordos sobre *Listeria monocytogenes*. A presença de ácidos gordos de cadeia média - caprílico (C8:0), cáprico (C10:0) e láurico (C12:0) e de ácidos gordos insaturados de cadeia longa - linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3) quer no leite quer em solução utilizada para conservação do queijo Mozzarella, preserva estes produtos, inibindo o crescimento de

Listeria monocytogenes contaminante. Os efeitos adversos destes ácidos são consideravelmente notados a pH 5, inibindo completamente o crescimento desta bactéria.

Também durante a maturação do queijo Azul, a população de *Listeria monocytogenes* decresceu, apesar do aumento de pH de 4,9 para 6,8 que se verificou entre os 60 e os 120 dias de maturação. Atribui-se este decréscimo às elevadas concentrações de ácidos gordos livres presentes e/ou à concentração mais ou menos elevada de sal no queijo Azul (Schaffer et al., 1995).

Mas nas variedades de queijo pouco curadas, com elevado teor de humidade e pouco ácidas, como nos queijos Brick e Limburger, *Listeria monocytogenes* tem condições para crescer e sobreviver. No entanto, a capacidade de crescimento da bactéria nestes produtos, depende da estirpe considerada verificando-se que as estirpes Scott A e Ohio se mantiveram até ao final da maturação de 20 a 22 semanas, embora as estirpes V7 e California só fossem detectadas ocasionalmente (Ryser e Marth, 1989; Pearson e Marth, 1990).

Além disso, também foi observado que os números de *Listeria monocytogenes* eram mais elevados à superfície do queijo que no seu interior, provavelmente porque o pH daquela zona do queijo era mais favorável ao crescimento do microrganismo (Pearson e Marth, 1990).

O crescimento de *Listeria monocytogenes* no queijo está principalmente limitado às variedades de pasta mole e semi-mole, como o Brie e o Camembert. O aumento de pH que se verifica durante a maturação cria condições favoráveis ao crescimento desta bactéria, que pode atingir populações de cerca de 10^7 ufc/g (Pearson e Marth, 1990; Faber e Peterkin, 1991; Donnelly, 1994; Ryser, 1998).

Nestes queijos, a contaminação é geralmente abundante à superfície. Aparentemente, este fenômeno deve-se ao efeito do pH, uma vez que se desenvolve um gradiente de pH elevado, durante a maturação, que acompanha o crescimento de *Listeria monocytogenes* (Farber e Peterkin, 1991).

Genigeorgis et al. (1991) estudaram o comportamento de *Listeria monocytogenes* em vários tipos de queijo contaminados artificialmente pós-fabrico. Observaram que quando o pH era elevado (pH 6,2 a 6,7; 5,6 a 6,1 e 7,4) a bactéria podia crescer, ao contrário do que sucedia quando o pH era mais baixo (pH 4,2 a 5,7), e verificaram a existência de uma correlação significativa entre o crescimento de *L. monocytogenes* e valores de pH superiores a 5,5.

Contudo, nos queijos Limburger (pH 7,2) e Piedmont (pH 6,4) não foi observado crescimento devido à presença de uma abundante flora competidora e ao efeito associado dos ácidos orgânicos e substâncias antimicrobianas presentes quer nos ingredientes quer no leite inoculado. No queijo Cotija, as elevadas concentrações de sal (9,6% e 12,5%), os baixos valores de pH (5,6 a 5,5) e a presença de culturas de arranque contribuíram para a criação de um ambiente inóspito para o crescimento de *Listeria monocytogenes* (Genigeorgis et al., 1991).

Estes autores concluíram que os queijos com pastas mais duras, feitos com culturas de arranque e com valores de pH inferiores a 5,5, se contaminados pós-fabrico, não suportam o crescimento de *Listeria monocytogenes*, enquanto que os queijos de pastas moles sem estas características, necessitam de outros mecanismos inibitórios para que o crescimento desta bactéria seja prevenido (Genigeorgis et al., 1991).

Salmonella spp.:

Salmonella spp. tem sido implicada nalguns surtos relacionados com o consumo de queijo. Embora a utilização de processos tecnológicos modernos e a prática de regras de higiene adequadas ajudem a minimizar os riscos de contaminação dos produtos, os que são feitos com leite crú podem constituir uma ameaça para a saúde dos consumidores (Maipa et al., 1993; Papadopoulou et al., 1993; Zottola e Smith, 1993).

Os queijos de pasta dura raramente estão envolvidos em surtos de salmonelose. Nos queijos Suíços de pasta dura (Emmental), *Salmonella* spp. não foi detectada a partir do 1º dia após a manufactura. Esta morte rápida das bactérias deve-se à utilização de temperaturas elevadas no fabrico da coalhada (53°C) (Zottola e Smith, 1991; Bachmann e Spahr, 1995).

Nos queijos de pasta semi-dura (Tilsit), as bactérias potencialmente patogénicas, entre elas *Salmonella* Typhimurium, sobrevivem durante mais tempo que nos de pasta dura. Em queijos feitos com leite inoculado artificialmente, verifica-se, na coalhada, um aumento do número de bactérias, atribuído ao seu aprisionamento físico durante a formação do coágulo e após a sinerese (Bachmann e Spahr, 1995).

Pela mesma razão, durante a manufactura dos queijos Cheddar, Feta e Azul, também ocorre um ligeiro aumento do número de *Salmonella* spp., da ordem das 10 a 100 vezes (Maipa et al., 1993; Papadopoulou et al., 1993; Schaffer et al., 1995; Ryser, 1998).

No queijo Mozzarella, *Salmonella* Javiana sobreviveu e cresceu durante a fase de maturação ácida, mas foi completamente destruída quando a massa do queijo atingiu temperaturas de cerca de 60°C, durante o alongamento, não tendo sido detectada nas fases subsequentes (Zottola e Smith, 1991; El-Gazzar e Marth, 1992; Ryser, 1998). No entanto, quando a contaminação

acontece posteriormente a esta fase, nesta variedade de queijo, a bactéria pode estar presente, constituindo um risco sanitário (Ryser, 1998).

Igualmente no Cottage, o efeito das temperaturas utilizadas no fabrico da coalhada (52°C durante 20 minutos) inactivam completamente a bactéria. Contudo, a utilização de temperaturas inferiores (41,6 e 43,5°C) não impede a sua sobrevivência. Neste queijo, *Salmonella* spp. também pode permanecer como contaminante pós-pasteurização, durante o período de duração do produto (El-Gazzar e Marth, 1992; Ryser, 1998).

Durante a maturação dos queijos de pasta semi-dura, como o Tilsit, verificou-se que *Salmonella* Typhimurium decresceu acentuadamente aos 7 dias de maturação, podendo manter uma população reduzida por tempo considerável. Mas após dois meses, os números baixam para valores inferiores ao seu limite de detecção (Bachmann e Spahr, 1995).

O principal factor responsável pela eliminação destes microrganismos e de outras bactérias patogénicas, nos queijos de pasta semi-dura, é a rápida produção de ácido, sendo importante a utilização de uma cultura de arranque eficaz, que produzindo também outras substâncias inibitórias como o peróxido de hidrogénio, é capaz de suprimir o crescimento de bactérias patogénicas (Vlaemynck, 1994; Bachmann e Spahr, 1995).

No queijo Cheddar, *Salmonella* spp. pode sobreviver durante um longo período (9 meses) com valores elevados de pH (5,9), em consequência da utilização de culturas de arranque com capacidade de acidificação lenta. Esta sobrevivência resulta, também em parte, do elevado teor de humidade (43%±2%) deste queijo, sendo mais prolongada quando a maturação ocorre a temperaturas mais baixas (4,5 e 7°C) (El-Gazzar e Marth, 1992; Ryser, 1998).

O teor de gordura desta variedade de queijo também pode ter influência no declínio da população de *Salmonella* spp. ao longo da maturação. Mehta e

Tatini (1994), comparando o comportamento de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Senftenberg em queijos Cheddar com teores de gordura diferentes, constataram que nos queijos em que o teor de gordura era mais baixo, o declínio destas serovarietades era mais acentuado do que nos queijos com teores de gordura mais elevados. Provavelmente, a gordura desempenha um efeito protector sobre as salmonelas relativamente à acção dos ácidos e de outros metabolitos produzidos pelas bactérias lácticas.

Mas também foi observado um declínio mais rápido de *Salmonella* spp. em queijo Cheddar com teores de ácidos gordos mais elevados. O tipo de ácidos gordos desempenha um papel importante na destruição da bactéria, verificando-se que os queijos que tinham teores mais elevados de ácidos gordos de cadeia média e ácidos oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) eram aqueles em que o declínio era mais rápido (Schaffer et al., 1995).

A importância da quantidade e da taxa de produção de ácido na supressão e na sobrevivência de salmonela também foi demonstrada no queijo Colby, tendo sido concluído que o pH do queijo, o tipo e tamanho de cultura de arranque são mais relevantes que o teor de humidade e a presença de sal e aditivos (El-Gazzar e Marth, 1992).

No entanto, a concentração de sal utilizada no fabrico de queijo Domiati afectou a sobrevivência de *Salmonella* Typhi, observando-se que com concentrações de 5% de NaCl esta bactéria sobreviveu durante 34 dias, enquanto que com concentrações de 10% apenas permaneceu no queijo durante 16 dias (El-Gazzar e Marth, 1992).

Durante a maturação do queijo Feta, a população de *Salmonella* Enteritidis também é bastante reduzida, decrescendo até aos 23 dias de maturação, sobrevivendo até ao 38º dia, mas não estando presente ao 45º dia. Esta redução pode dever-se à descida do pH de 6,8 para 4,6, em consequência da produção de ácidos orgânicos pelas bactérias lácticas, nomeadamente ácidos láctico, acético, propiónico, butírico e fórmico, mas outros factores

como a a_w , a concentração da salmoura e a temperatura de conservação também podem contribuir para a inibição do crescimento desta serovariedade (Maipa et al., 1993; Papadopoulou et al., 1993).

PARTE II

TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III

VARIABILIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DE ÉVORA

INTRODUÇÃO:

O queijo produzido na região de Évora (Sudeste de Portugal), designado comercialmente por queijo de Évora, é um queijo curado de pasta dura ou semi-dura, fabricado com leite cru de ovelha, segundo técnicas artesanais. A época da sua produção inicia-se em Dezembro e estende-se até Maio/Junho. O leite utilizado no seu fabrico é aquecido a uma determinada temperatura, dependente da temperatura ambiente e avaliada empiricamente, a qual deve ser mantida durante a filtração subsequente. Esta é feita passando o leite aquecido por cerca de 6 a 9 panos de algodão, contendo o primeiro uma certa quantidade de sal grosso. É, então, adicionado o agente coagulante e a massa obtida é esmiuçada rapidamente, colocada em cinchos e coberta com sal grosso. Os queijos são curados durante cerca de 30 a 45 dias em condições ambientais de temperatura, humidade e ventilação avaliadas empiricamente. Como resultado obtêm-se queijos pequenos, com cerca de 60 a 90 g de peso e forma cilíndrica achatada com cerca de 6 cm de diâmetro e 2 a 3 cm de altura, ou queijos com pesos entre 120 a 200 g ou

200 a 300 g, com a mesma forma cilíndrica achatada mas diâmetros maiores sendo, então, designados por merendeiras.

A importância do seu estudo resulta do facto de ser o único produto, nesta região, fabricado a partir de leite produzido principalmente por ovinos de tripla vocação (carne, leite e lã), constituindo um acréscimo de rendimento quer para o produtor quer para o queijeiro. Por outro lado, as suas propriedades organolépticas tornam este produto característico da região de Évora, muito apreciado pelos consumidores. Por fim, sendo um produto fabricado a partir de leite cru, importa apreciar o comportamento dos diferentes grupos microbianos presentes durante a maturação, quer sejam os que tem importância tecnológica quer sejam os que podem comprometer a qualidade higiénica do produto e pôr em risco a Saúde Pública.

O objectivo deste trabalho foi estudar a evolução dos diferentes grupos microbianos envolvidos no processo de maturação do queijo, ao longo da época de fabrico e pesquisar a presença de alguns microrganismos que possam constituir uma ameaça para a saúde do consumidor.

MATERIAIS E MÉTODOS:

As amostras foram recolhidas numa queijaria situada no concelho de Viana, distrito de Évora, onde o queijo de ovelha é fabricado de forma artesanal, conforme descrito na Introdução.

A amostragem realizou-se durante três anos consecutivos. Nos dois primeiros anos os períodos de amostragem decorreram entre o início de Abril e o final de Maio ou início de Junho. No terceiro ano, o período de amostragem iniciou-se em Janeiro e terminou no final de Maio. As amostras de leite, coalhada e queijos com 3, 7, 30, 45 e 60 dias de maturação, fabricados a partir da mesma matéria-prima e na mesma queijaria, foram recolhidas quinzenalmente, envolvendo 4, 6 e 10 datas de fabrico,

respectivamente no primeiro, segundo e terceiro anos. Todas estas amostras foram transportadas ao laboratório imediatamente após colheita, sob refrigeração, e analisadas em seguida, tendo as análises de coalhada e de queijos nas diferentes idades de maturação sido processadas em triplicado (n=3).

Das amostras de leite, tomadas imediatamente após a filtração, recolheram-se 10 ml que foram diluídos em 90 ml de Solução de Ringer a $\frac{1}{4}$ (Oxoid) (Anexo I) e das de coalhada e queijos com diferentes idades de maturação foram recolhidos 10 g do seu interior e homogeneizados com 90 ml de Solução de Ringer a $\frac{1}{4}$. A partir destas soluções, fizeram-se as diluições decimais sucessivas achadas necessárias, também em Solução de Ringer a $\frac{1}{4}$.

A sementeira foi feita por incorporação, em triplicado, de cada uma das três diluições consecutivas escolhidas, em Plate Count Agar (Difco) para a contagem de bactérias viáveis totais (BVT), em MRS Agar (de Man, Rogosa, Sharpe) (Oxoid) para a contagem de bactérias lácticas (BL), em Violet Red Bile Agar (Oxoid) para a contagem de coliformes (Colif), em Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid) para a contagem de enterobactérias (Entb), em m-Enterococcus Agar (Difco) para a contagem de enterococos (Ent) e em Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (Oxoid) para a contagem de leveduras (Lev). (Anexo I).

A contagem das unidades formadoras de colónias (ufc) foi feita após um período de incubação de 48 horas a 37° C de todos os meios inoculados, excepto para o Rose-Bengal Chloramphenicol Agar que foi mantido à temperatura ambiente durante cinco dias. O número de ufc por mililitro ou por grama de produto foi calculado multiplicando a média das contagens numa diluição pelo inverso dessa diluição.

Para a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo foi feita a sementeira por espalhamento à superfície, em triplicado, de duas diluições consecutivas,

em meio Baird-Parker Agar (Difco) enriquecido com gema de ovo e telurito (Difco) (Anexo I). Após um período de incubação de 24 horas a 37°C foi feita a pesquisa de estafilococos coagulase positivo segundo o estipulado na NP 4196 de 1992.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. homogeneizaram-se 25 g da massa do queijo em 225 ml de Água Peptonada (Oxoid). Após um período de incubação de 24 horas a 37°C semearam-se 10 ml de cultura em 90 ml de Caldo Selenite Cistina (Difco) que após um período de incubação de 18 horas a 37°C foi inoculado por sementeira à superfície, em triplicado, nos meios Hektoen Enteric Agar (Oxoid), Xylose Lysine Desoxycholate Agar (Oxoid) e Verde Brilhante Agar (Difco). As colónias consideradas suspeitas foram inoculadas em Kliger Iron Agar (Difco) e Lysine Iron Agar (Difco), identificadas através de Api 20E (bioMérieux) e, posteriormente submetidas a confirmação sorológica. (Anexo I).

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* e de *Brucella* spp. realizou-se apenas no terceiro ano em que decorreu o presente estudo. Foram recolhidas amostras adicionais de leite, coalhada e queijos com 30, 45 e 60 dias de maturação, simultâneamente e nas mesmas condições que as destinadas às análises anteriormente descritas. Estas amostras foram enviadas ao Laboratório Nacional de Veterinária onde foram pesquisadas as referidas bactérias, segundo as técnicas adoptadas por esse Laboratório e descritas em Guerra (1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os valores médios das contagens dos diferentes grupos microbianos presentes no leite, coalhada e queijos em diferentes fases de maturação, realizadas em três anos consecutivos, entre o final do mês de Março e meados do mês de Junho são apresentados no Quadro III-1.

QUADRO III-1 - Contagens dos Diferentes Grupos Microbianos Presentes no Leite, Coalhada e Queijos com Diferentes Idades de Maturação, Fabricados em Três Anos Consecutivos, Durante a Época de Primavera (médias \pm desvios padrão, de quatro e seis semanas, respectivamente no primeiro ano e nos segundo e terceiro anos, em log ufc/ml ou log ufc/g.).

| Ano 1 | BVT | BL | Ent | Entb | Colif |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Leite | 4,31 \pm 0,01 | 4,18 \pm 0,02 | 4,02 \pm 0,07 | 3,76 \pm 0,65 | 4,00 \pm 0,07 |
| Coalhada | 6,59 \pm 0,42 | 6,46 \pm 0,42 | 6,12 \pm 0,55 | 5,47 \pm 0,5 | 5,32 \pm 0,03 |
| Queijo 3 Dias | 8,61 \pm 0,96 | 8,77 \pm 0,5 | 8,30 \pm 0,36 | 7,01 \pm 0,1 | 7,00 \pm 0,11 |
| Queijo 7 Dias | 9,43 \pm 0,43 | 9,34 \pm 0,36 | 8,62 \pm 0,06 | 7,94 \pm 0,83 | 8,46 \pm 0,12 |
| Queijo 30 Dias | 8,97 \pm 0,42 | 8,83 \pm 0,48 | 8,66 \pm 0,16 | 7,36 \pm 0,75 | 7,57 \pm 0,44 |
| Queijo 45 Dias | 8,91 \pm 0,40 | 8,72 \pm 0,46 | 8,67 \pm 0,39 | 6,76 \pm 0,43 | 7,14 \pm 0,15 |
| Ano 2 | BVT | BL | Ent | Entb | Colif |
| Leite | 5,87 \pm 0,4 | 5,06 \pm 0,98 | 3,72 \pm 1,04 | 4,25 \pm 1,19 | 4,42 \pm 1,37 |
| Coalhada | ND | ND | ND | ND | ND |
| Queijo 3 Dias | 8,85 \pm 0,51 | 8,71 \pm 0,44 | 7,67 \pm 0,23 | 7,65 \pm 0,47 | 7,62 \pm 0,45 |
| Queijo 7 Dias | 8,89 \pm 0,44 | 8,92 \pm 0,35 | 8,09 \pm 0,56 | 7,55 \pm 0,63 | 7,55 \pm 0,68 |
| Queijo 30 Dias | 8,14 \pm 0,41 | 8,47 \pm 0,45 | 7,91 \pm 0,30 | 6,06 \pm 0,39 | 6,53 \pm 0,80 |
| Queijo 45 Dias | 8,03 \pm 0,28 | 8,13 \pm 0,07 | 7,58 \pm 0,37 | 5,77 \pm 0,51 | 6,05 \pm 0,79 |
| Ano 3 | BVT | BL | Ent | Entb | Colif |
| Leite | 4,42 \pm 0,56 | 4,09 \pm 0,32 | 3,13 \pm 0,45 | 3,24 \pm 0,13 | 3,25 \pm 0,26 |
| Coalhada | 5,50 \pm 0,36 | 5,27 \pm 0,33 | 4,31 \pm 0,58 | 4,28 \pm 0,55 | 4,36 \pm 0,58 |
| Queijo 3 Dias | 8,95 \pm 0,63 | 8,78 \pm 0,63 | 7,46 \pm 0,36 | 7,91 \pm 0,41 | 8,00 \pm 0,40 |
| Queijo 7 Dias | 8,98 \pm 0,71 | 8,92 \pm 0,46 | 7,60 \pm 0,68 | 7,94 \pm 0,48 | 7,94 \pm 0,41 |
| Queijo 30 Dias | 8,46 \pm 0,75 | 8,29 \pm 0,48 | 7,18 \pm 0,53 | 7,03 \pm 0,39 | 7,05 \pm 0,33 |
| Queijo 45 Dias | 7,99 \pm 0,70 | 8,31 \pm 0,56 | 7,23 \pm 0,73 | 6,18 \pm 0,59 | 6,23 \pm 0,53 |

BVT - Bactérias Viáveis Totais; BL - Bactérias Lácticas; Ent - Enterococos;

Entb - Enterobactérias; Colif - Coliformes.

ND - Não Determinado.

No referido quadro foram omitidos os valores das contagens microbianas, realizadas nas amostras recolhidas no terceiro ano, respeitantes aos diferentes grupos microbianos presentes em queijos com 60 dias de maturação e respeitantes às leveduras em todas as fases de fabrico, uma

vez que não teriam termo de comparação com parâmetros homólogos dos outros anos em que se realizou o trabalho.

Como se pode verificar, o leite possuía uma elevada carga microbiana, apresentando contagens superiores a 3 unidades logarítmicas por mililitro, em todos os grupos microbianos.

Os valores encontrados para as bactérias viáveis totais (4,31; 5,87 e 4,42 log ufc/ml nos anos 1, 2 e 3, respectivamente) são próximos dos critérios microbiológicos aplicados ao leite de ovelha e cabra destinado ao fabrico de produtos com leite crú cujo processo de fabrico não inclua tratamento térmico, como é referido no “Regulamento das Normas Sanitárias Aplicáveis à Colocação no Mercado de Leite Crú, de Leite de Consumo Tratado Termicamente, de Leite Destinado à Transformação e de Produtos à Base de Leite, Destinados ao Consumo Humano” aprovado pela Portaria nº 533/93 de 23 de Maio e alterado pela Portarias nºs 1068/95 de 30 de Agosto e 56/96 de 22 de Fevereiro, que devem ser inferiores a 500 000 ufc/ml, ou seja 5,7 log ufc/ml.

Estes valores são também menores que os detectados em leite de ovelha destinado ao fabrico dos queijos César de Cáceres (Más et al., 1991; Pouillet et al., 1991), Los Pedroches (Sánchez et al., 1995) e La Serena (Fernandez del Pozo et al., 1988; Gonzalez et al., 1991; Nuñez et al., 1991) e aos de leite de cabra destinado ao fabrico de queijo Majorero (Fontecha et al., 1990) e Cendrat del Montsec (Mor-Mur et al., 1994). Foram também inferiores ao esperado, visto tratar-se de leite crú, obtido por ordenha manual e em fracas condições higiénicas.

Provavelmente, esta situação ficou a dever-se ao facto de o leite ser aquecido antes da filtração até uma temperatura considerada empiricamente óptima. Embora este aquecimento de modo nenhum possa ser considerado como uma pasteurização, pode ter sido suficiente para reduzir parte da micropopulação presente no leite.

Os valores de enterobactérias e coliformes são semelhantes aos encontrados no leite destinado ao fabrico de queijos La Serena (Fernandez del Pozo et al., 1988; Nuñez et al., 1991) e Los Pedroches (Sánchez et al., 1995), mas superiores aos detectados por Poulet et al. (1991) e Más et al. (1991) em leite utilizado no fabrico de queijo César de Cáceres.

Apesar de serem contaminantes frequentes de leite crú, a presença destes microrganismos no leite tem importância do ponto de vista higiénico e de saúde pública pois são considerados como indicadores de contaminação fecal e deste grupo fazem parte microrganismos como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* e *Yersinia* que incluem espécies enteropatogénicas. Assim, os elevados valores atingidos por estes microrganismos confirmam a existência de fracas condições higiénicas durante a obtenção e manipulação desta matéria prima (Tornadijo et al., 1993; Jay, 1994; Mor-Mur et al., 1994; Catsaras, 1995; Ledford, 1998).

Por outro lado, têm também implicações tecnológicas pois algumas espécies são fermentadoras da lactose e produzem gás, responsável por defeitos como o “inchaço precoce” ou a formação de “olhos”, indesejáveis em muitas variedades de queijo (Tornadijo et al., 1993; Plusquellet, 1995; Bergère e Lenoir, 1997).

As coalhadas apresentam contagens microbianas superiores às observadas para o leite, em todos os grupos microbianos. Este aumento foi observado noutras variedades de queijo como César de Cáceres (Poulet et al., 1991), Los Pedroches (Sánchez et al., 1995), La Serena (Fernandez del Pozo et al., 1988) e Armada Sobado (Tornadijo et al., 1993) e é atribuído não só à multiplicação microbiana que ocorre durante a coagulação, mas também ao aprisionamento físico dos microrganismos na rede da coalhada (Tatini et al., 1971). Estes autores concluíram que a retenção microbiana na coalhada é responsável por um aumento de cerca de uma unidade logarítmica, sendo o restante atribuído à multiplicação microbiana.

Durante a maturação, verifica-se que há, também, um aumento acentuado das contagens dos diferentes grupos microbianos da coalhada para o queijo com 3 dias de maturação e, a seguir, um decréscimo mais ou menos acentuado até ao final desse período, tendo sido observada esta tendência nos três anos em que decorreu o estudo.

As bactérias lácticas representam o grupo predominante durante toda a maturação e atingem o seu valor máximo aos sete dias (9,34; 8,92 e 8,92 log ufc/g), decrescendo depois, ligeiramente. A evolução dos enterococos, que integram o grupo das bactérias lácticas, foi semelhante ao destas, mantendo uma população numerosa até ao final da maturação.

O mesmo se observou nos queijos César de Cáceres (Pouillet et al., 1991) e Los Pedroches (Sánchez et al., 1995), fabricados na Primavera e no queijo Picante da Beira Baixa (Freitas et al., 1995). A numerosa população de enterococos encontrada leva a suspeitar que estes microrganismos desempenham, provavelmente, um papel importante durante a maturação do queijo (Pouillet et al., 1991; Sánchez et al., 1995).

Quanto às enterobactérias e aos coliformes, embora os seus valores se mantenham elevados durante a maturação, são inferiores aos das bactérias lácticas. Os máximos são alcançados aos três ou aos sete dias de maturação (7,94; 7,65 e 7,94 log ufc/g, para as enterobactérias e 8,46; 7,62 e 8,00 log ufc/g, para os coliformes), e diminuem em seguida, de um modo mais pronunciado que as bactérias lácticas, sendo esta diminuição superior a uma unidade logarítmica. No entanto, aos 45 dias de maturação, estas populações apresentam ainda valores elevados (6,76; 5,77 e 6,18 log ufc/g, para as enterobactérias e 7,14; 6,05 e 6,23 log ufc/g, para os coliformes), o que pode estar relacionado com a forte contaminação da matéria prima.

Ns primeiras fases de fabrico do queijo, a existência de condições favoráveis, nomeadamente pH, temperatura e disponibilidade de lactose, tem sido consideradas como responsáveis pelo crescimento de enterobactérias e

coliformes neste produto (Walstra et al., 1993). No entanto, à medida que a maturação progride, é reconhecido que a actividade das bactérias lácticas e as condições físico-químicas que se vão estabelecendo no queijo, principalmente pH, teor de humidade e concentração de sal e de ácidos gordos, dificultam o desenvolvimento microbiano, nomeadamente das enterobactérias e coliformes.

O pH desta variedade de queijo não é muito baixo (5,4 a 5,7 no final da maturação) e pode permitir a sobrevivência de enterobactérias e de coliformes. Contudo, a diminuição do teor de humidade (34% aos 30 dias e 19% aos 60 dias de maturação) e as crescentes concentrações de NaCl (9% aos 30 dias e 16% aos 60 dias) e de ácidos gordos livres (Pinheiro et al., 1998a; b), podem estar implicadas na redução destas populações, tal como foi observado noutras variedades (Nuñez et al., 1985; Fontecha et al., 1990; Tornadijo et al., 1993; Schaffer et al., 1995).

No terceiro ano, o período de amostragem teve o seu início em Janeiro e terminou em Junho, permitindo comparar o comportamento dos diversos grupos microbianos durante a maturação dos queijos fabricados no Inverno e na Primavera. Por outro lado, os resultados obtidos nos anos anteriores faziam suspeitar que o prolongamento do período de maturação até aos 60 dias, escolhido por ser o período de maturação aconselhado em diversos países para queijos feitos com leite não pasteurizado, podia esclarecer sobre o destino de diferentes grupos microbianos.

Assim, os Quadros III-2 e III-3, complementados pelos Gráficos III-1 e III-2, apresentam os valores das contagens microbianas em queijos fabricados no Inverno e na Primavera, respectivamente, durante um período de maturação de 60 dias.

Embora se verifique que os teores de bactérias viáveis totais, bactérias lácticas e enterococos presentes no leite são semelhantes, em ambas as

épocas de fabrico, as contagens de enterobactérias e coliformes são inferiores, em cerca de uma unidade logarítmica, na época de Primavera.

Quadro III-2 - Contagens dos Diferentes Grupos Microbianos Presentes no Leite, Coalhada e Queijos com Diferentes Idades de Maturação, Fabricados Durante a Época de Inverno. (média \pm desvio padrão das contagens de quatro semanas da época de Inverno, em log ufc/ml ou log ufc/g).

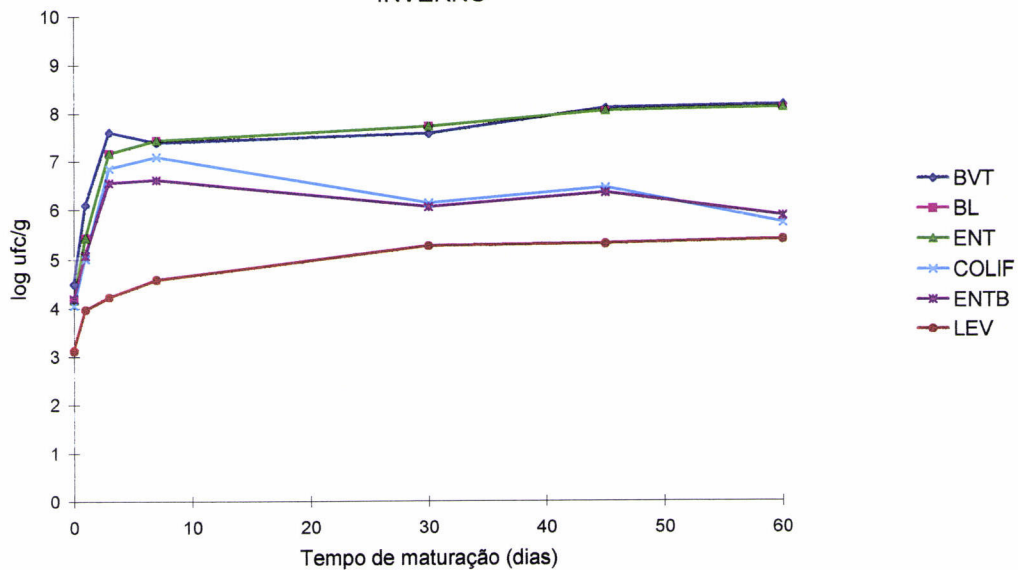
| Produto | BVT | BL | Ent | Entb | Colif | Lev |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Leite | 4,50 \pm 0,49 | 4,16 \pm 0,70 | 2,90 \pm 0,35 | 4,20 \pm 1,25 | 4,06 \pm 1,11 | 3,11 \pm 0,47 |
| Coalhada | 6,10 \pm 0,73 | 5,43 \pm 0,28 | 5,18 \pm 0,89 | 5,07 \pm 1,14 | 5,01 \pm 1,15 | 3,97 \pm 0,03 |
| Queijo 3 dias | 7,60 \pm 0,31 | 7,16 \pm 0,52 | 6,47 \pm 0,62 | 6,55 \pm 0,69 | 6,85 \pm 0,60 | 4,23 \pm 0,16 |
| Queijo 7 dias | 7,38 \pm 0,28 | 7,43 \pm 0,32 | 6,50 \pm 0,62 | 6,61 \pm 0,85 | 7,08 \pm 0,33 | 4,58 \pm 0,83 |
| Queijo 30 dias | 7,56 \pm 0,51 | 7,71 \pm 0,60 | 6,65 \pm 0,46 | 6,05 \pm 0,78 | 6,13 \pm 0,65 | 5,26 \pm 0,94 |
| Queijo 45 dias | 8,09 \pm 0,67 | 8,03 \pm 0,37 | 7,07 \pm 0,49 | 6,33 \pm 0,38 | 6,44 \pm 0,35 | 5,3 \pm 0,61 |
| Queijo 60 dias | 8,16 \pm 0,36 | 8,10 \pm 0,48 | 7,24 \pm 0,90 | 5,86 \pm 0,85 | 5,72 \pm 0,91 | 5,38 \pm 0,77 |

BVT - Bactérias Viáveis Totais; BL - Bactérias Lácticas; Ent - Enterococos;
Entb - Enterobactérias; Colif - Coliformes; Lev - Leveduras.

Os maiores crescimentos dos diferentes grupos microbianos ocorreram até aos 3 dias de maturação, em ambas as épocas de fabrico (Inverno e Primavera), verificando-se que as contagens são mais baixas no Inverno que na Primavera (Quadros III-2 e III-3).

Pela análise do Quadro III-2 e do Gráfico III-1, observamos que as contagens das bactérias viáveis totais, das bactérias lácticas e dos enterococos atingiram os valores mais elevados no final da maturação (45 e 60 dias), nos queijos feitos na época de Inverno (8,16; 8,10 e 7,24 log ufc/g, respectivamente) e, nos feitos na época de Primavera (Quadro III-3, Gráfico III-2), os valores mais elevados surgiram aos 3 e 7 dias de maturação (8,98; 8,92 e 7,60 log ufc/g, respectivamente), ultrapassando mesmo os valores obtidos nos queijos fabricados no Inverno, e decrescendo, em seguida, até ao final da maturação, para 7,49; 7,57 e 6,91 log ufc/g, respectivamente.

GRÁFICO III-1 - EVOLUÇÃO DOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS PRESENTES NO QUEIJO DURANTE A MATURAÇÃO, NA ÉPOCA DE INVERNO



Os factores ambientais sob os quais decorre a maturação, nomeadamente temperatura e humidade relativa, podem condicionar o desenvolvimento microbiano durante a maturação do queijo, como foi sugerido por Pouillet et al. (1991) e Macedo (1996). Assim, as temperaturas ambientais de Inverno são, provavelmente, menos favoráveis à multiplicação microbiana e, por isso, as contagens mais elevadas são menores e mais tardiamente atingidas que na Primavera. Por outro lado, nesta última época, os queijos no final da maturação estão sujeitos a uma maior dissecação que determina o decréscimo do número de microrganismos, ao contrário do que sucede no Inverno (Pouillet et al., 1991).

Quanto às enterobactérias e aos coliformes estão presentes em número elevado até ao final da maturação, em ambas as épocas de fabrico (Quadros III-2 e III-3). No entanto, nos queijos produzidos durante a época de Inverno, os valores mais elevados surgiram aos 7 dias, decrescendo em seguida, mas nos fabricados na época de Primavera este decréscimo, iniciado após os 3

dias de maturação, decorreu até ao final deste período, sendo mais acentuado que no Inverno.

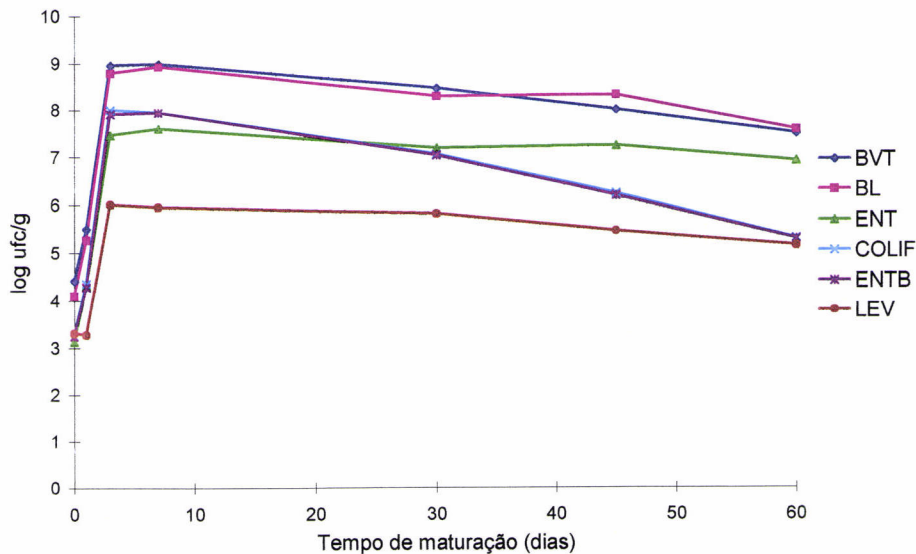
QUADRO III-3 - Contagens dos Diferentes Grupos Microbianos Presentes no Leite, Coalhada e Queijos com Diferentes Idades de Maturação, Fabricados Durante a Época de Primavera. (médias \pm desvios padrão das contagens de seis semanas da época de Primavera, em log ufc/ml ou log ufc/g).

| Produto | BVT | BL | Ent | Entb | Colif | Lev |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Leite | 4,42 \pm 0,56 | 4,09 \pm 0,32 | 3,13 \pm 0,45 | 3,24 \pm 0,13 | 3,25 \pm 0,26 | 3,30 \pm 0,74 |
| Coalhada | 5,50 \pm 0,36 | 5,27 \pm 0,33 | 4,31 \pm 0,58 | 4,28 \pm 0,55 | 4,36 \pm 0,58 | 3,27 \pm 0,91 |
| Queijo 3 dias | 8,95 \pm 0,63 | 8,78 \pm 0,63 | 7,46 \pm 0,36 | 7,91 \pm 0,41 | 8,00 \pm 0,40 | 6,00 \pm 0,31 |
| Queijo 7 dias | 8,98 \pm 0,71 | 8,92 \pm 0,46 | 7,60 \pm 0,68 | 7,94 \pm 0,48 | 7,94 \pm 0,41 | 5,95 \pm 0,42 |
| Queijo 30 dias | 8,46 \pm 0,75 | 8,29 \pm 0,48 | 7,18 \pm 0,53 | 7,03 \pm 0,39 | 7,05 \pm 0,33 | 5,81 \pm 0,88 |
| Queijo 45 dias | 7,99 \pm 0,70 | 8,31 \pm 0,56 | 7,23 \pm 0,73 | 6,18 \pm 0,59 | 6,23 \pm 0,53 | 5,45 \pm 0,61 |
| Queijo 60 dias | 7,49 \pm 0,50 | 7,57 \pm 0,50 | 6,91 \pm 0,65 | 5,29 \pm 0,81 | 5,30 \pm 0,74 | 5,15 \pm 1,11 |

BVT - Bactérias Viáveis Totais; BL - Bactérias Lácticas; Ent - Enterococos;
Entb - Enterobactérias; Colif - Coliformes; Lev - Leveduras.

As condições ambientais prevalentes no interior do queijo podem ter sido determinantes para a evolução destes grupos microbianos ao longo da maturação. É provável que a actividade da população láctica, mais abundante na época de Primavera, seja responsável pela produção de maiores quantidades de substâncias que contribuem para tornar o queijo num meio menos favorável ao crescimento microbiano (Pouillet et al., 1991; Más e Gonzalez-Crespo, 1993). Adicionalmente, as condições ambientais da Primavera, caracterizadas por temperaturas mais elevadas e menores teores de humidade relativa que as que se verificam no Inverno, podem influenciar os teores de humidade e a concentração de NaCl no queijo. Estes parâmetros, fortemente relacionados com a sobrevivência destes grupos microbianos, tornam o queijo num meio inóspito ao seu crescimento (Fernandez del Pozo et al., 1988; Fontecha et al., 1990; Tornadijo et al., 1993).

GRÁFICO III-2 - EVOLUÇÃO DOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS PRESENTES NO QUEIJO DURANTE A MATURAÇÃO NA ÉPOCA DE PRIMAVERA



Ao longo do período de maturação do queijo, as leveduras evoluem de forma semelhante à dos outros grupos microbianos, nas respectivas épocas de fabrico.

Assim, na época de Inverno o valor máximo (5,38 log ufc/g) é atingido no final da maturação (Quadro III-2) mas na Primavera o valor máximo (6,0 log ufc/g) é atingido aos 3 dias de maturação, decrescendo em seguida (Quadro III-3). Apesar da população de leveduras ser sensivelmente menor do que qualquer dos outros grupos, pensamos que a sua actividade pode ser importante para as características deste produto.

Em estudos realizados posteriormente (Dias et al., *in press*), verificámos que quase todas as espécies de leveduras isoladas (98%) desenvolvem actividade lipolítica sendo a actividade proteolítica apenas efectuada por um grupo reduzido (12%). No final da maturação, apenas 5% das leveduras isoladas demonstram ter capacidade proteolítica.

Assim, as leveduras presentes durante a maturação podem ter um papel determinante na lipólise, contribuindo para o desenvolvimento do flavour característico desta variedade de queijo.

Relativamente à pesquisa de microrganismos causadores de perturbações de origem alimentar, constatámos que a percentagem de *Staphylococcus* coagulase positivo foi muito reduzida, nas amostras analisadas. Nos queijos fabricados na época de Primavera, os valores máximos de *Staphylococcus* spp., atingidos aos 3 ou aos 7 dias de maturação, foram da ordem de 2 a 3 log ufc/g e decresceram ligeiramente até ao final da maturação. Nos queijos fabricados no Inverno, os valores máximos eram de cerca de 2 log ufc/g.

Assim, uma vez que são necessários, pelo menos, 10^5 a 10^6 microrganismos produtores de enterotoxinas por grama de alimento para que surjam problemas de intoxicação alimentar (Walker, 1988; Asperger, 1994; Burgess et al., 1994), parece-nos que este produto não constitui uma ameaça, em termos de intoxicação estafilocócica.

Nas amostras analisadas não foram detectados *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* nem *Brucella* spp.

CONCLUSÕES:

Os elevados teores microbianos, nomeadamente de enterobactérias e de coliformes observados no leite destinado ao fabrico desta variedade de queijo reflectem a existência de condições higiénicas não muito boas na recolha e manipulação da matéria-prima que podem comprometer a qualidade do produto final.

Parece-nos evidente a existência de duas épocas de produção do queijo de Évora, demonstrada pelo diferente comportamento dos vários grupos microbianos ao longo da maturação.

A evolução da população láctica, atingindo, precocemente, valores mais elevados na Primavera, poderá, através do seu efeito inibidor, retardar o crescimento das populações de coliformes e enterobactérias. O crescimento destes microrganismos, que podem ter efeitos nefastos na saúde do consumidor, parece também ser condicionado pelas condições ambientais prevalentes nesta época do ano. Este aspecto poderá ser importante se tivermos em consideração o facto de o queijo de Évora ser fabricado com leite que não é submetido a qualquer tratamento térmico eficaz.

Por outro lado, não foi detectada a presença de microrganismos patogénicos ou potencialmente patogénicos que podem ser veiculados por este tipo de produto, nomeadamente *Staphylococcus* coagulase positivo, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Brucella* spp.

Em face da expressão populacional das leveduras, com manifesta actividade lipolítica, é provável que desempenhem um papel importante na maturação do queijo, que em condições normais é caracterizada por uma intensa lipólise.

CAPÍTULO IV

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PRESENTES NO QUEIJO ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DE ÉVORA.

INTRODUÇÃO:

Tal como na maior parte dos queijos fabricados no Sul da Europa (Cogan et al., 1997), o fabrico do queijo artesanal da região de Évora depende essencialmente da actividade de uma flora láctica adventícia que, como foi anteriormente observado, constitui uma população numerosa que se mantém ao longo da maturação. Como está largamente documentado, esta flora desempenha um papel importante durante este período, influenciando as características organolépticas dos produtos, pelo seu envolvimento nos processos bioquímicos que caracterizam a maturação, e controlando o crescimento de alguns microrganismos indesejáveis, através de efeitos antagonistas que sobre eles exercem.

A flora láctica consiste num grupo heterogéneo de bactérias que inclui espécies pertencentes a vários géneros, entre os quais *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* e *Lactobacillus*. Têm em comum serem Gram positivas, catalase negativas, não esporuladas,

adaptadas a ambientes ricos em nutrientes e produzirem ácido láctico como principal produto da fermentação dos glúcidos.

A imposição de baixos teores microbianos no leite destinado ao fabrico de produtos feitos com leite cru que não incluam tratamento térmico, pode ter como consequência a redução desta flora, comprometendo a acidificação e afectando a qualidade do produto. A utilização de refrigeração favorece o desenvolvimento da flora psicrófila, nomeadamente Gram negativa, que também prejudica a qualidade do produto (Gaya et al., 1999; Gómez et al., 1999).

A presença de bactérias lácticas no leite resulta, essencialmente, da contaminação ambiental. Desta forma, os produtos fabricados com leite cru, segundo técnicas tradicionais, são, geralmente, bastante heterogêneos, sujeitos a variações sazonais e de qualidade variável, o que em nada contribui para a sua valorização (Gómez et al., 1999).

O queijo artesanal produzido na região de Évora, fabricado com leite cru de ovelha e segundo técnicas tradicionais, encontra-se nestas circunstâncias.

A utilização de culturas de arranque no fabrico de diversas variedades de queijo tem sido a forma de ultrapassar estes inconvenientes. No entanto, não devem ser menosprezadas as características organolépticas nem a tipicidade de cada produto, mas privilegiado o seu carácter único e inconfundível.

Assim, estas culturas tem sido constituídas a partir de estirpes autóctones que proliferam no produto original, uma vez que as variantes presentes nas culturas de arranque comerciais são, em geral, fisiologicamente bastante diferentes das isoladas de habitats naturais (Corroller et al., 1998).

O objectivo deste trabalho consistiu no isolamento e caracterização das bactérias lácticas presentes no queijo artesanal produzido na região de Évora no sentido de se identificarem as mais representativas que no futuro possam

vir a ser constituintes de culturas de arranque a utilizar no fabrico deste produto, com vista a melhorar os seus padrões de qualidade.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Foram recolhidas amostras de queijos, fabricados no início de Abril, com 3 e 45 dias de maturação, em triplicado, em três dias consecutivos e transportadas ao laboratório imediatamente após colheita.

De cada uma das amostras, retiraram-se 10 g da massa do queijo que foram homogeneizados com 90 ml de Solução de Ringer $\frac{1}{4}$ (Oxoid). (Anexo I). A partir destas soluções fizeram-se as diluições decimais sucessivas consideradas necessárias, também em Solução de Ringer a $\frac{1}{4}$ (Oxoid).

A sementeira foi feita por incorporação, em quaduplicado, de cada uma das três diluições consecutivas escolhidas, em MRS Agar (de Man, Rogosa, Sharpe) (Oxoid) para crescimento de bactérias lácticas; em M17 Agar (Oxoid) para crescimento de estreptococos lácticos; em Kanamicina Esculina Azida de Sódio Agar (KA₃) (Oxoid) para crescimento de enterococos; em APT Agar (Difco) para crescimento de lactobacilos heterofermentativos e outros microrganismos exigentes; e em Dextrose Triptona Agar (DTA) (Oxoid) para crescimento de microrganismos produtores de ácido. (Anexo I). Neste último meio foram ainda inoculadas mais três placas por diluição.

De cada meio inoculado, foram seleccionadas três placas por diluição que foram incubadas em condições de aerobiose e uma de cada diluição foi incubada em jarra de anaerobiose (Merck Mikrobiologie) com sistema de anaerobiose Anaerocult A (Merck Mikrobiologie). (Anexo I).

Após um período de incubação de 48 horas a 30°C, para todos os meios, exceptuando o meio KA₃, que foi incubado a 37°C durante 48 horas e o meio DTA que, além de incubado a 30°C durante 48 horas, foi também incubado a

10°C durante 7 dias, foi feita a contagem das unidades formadoras de colónias (ufc).

O número de ufc por grama foi calculado multiplicando a médias das contagens numa diluição pelo inverso dessa diluição.

Foram repicadas cerca de 1 ou 10% das colónias de cada placa cuja contagem era superior a 100 ufc ou inferior ou igual a 100 ufc, respectivamente, de todos os meios semeados, para meios de MRS caldo e agar (Oxoid) (Anexo I) e incubadas a 30°C durante 24 horas ou, caso não fosse observado crescimento, durante 48 horas.

A partir de todas as colónias foram feitos esfregaços corados pelo método de Gram e todas elas foram sujeitas à prova da catalase (por aplicação de peróxido de hidrogénio a 30 volumes sobre uma colónia colocada numa lâmina de microscopia). o caso de se encontrarem em cultura pura, serem Gram positivas e catalase negativas, foram semeadas em meio MRS caldo com 50% (v/v) de glicerol e congeladas a cerca de -20°C para análise posterior.

Após descongelação em meio MRS caldo, foram apreciadas as seguintes características: tipo fermentativo (crescimento em meio MRS caldo com tubo de Durham invertido, a 30°C durante 48 horas); crescimento a 10°C durante 7 dias e 45°C durante 48 horas; tolerância ao sal (crescimento em MRS caldo com 6,5% de NaCl); hidrólise da arginina (em meio MRS caldo sem glucose, extracto de carne e citrato de amónio mas contendo citrato de sódio e arginina (Anexo I) e utilizando o reagente de Nessler (Panreac); produção de acetoina (pelo teste de Voges-Proskauer); presença e tipo de hemólise; grupo serológico (através de Streptococcal Grouping Kit (Oxoid); presença ou ausência de ácido *meso*-diaminopimélico (m-DAP) na parede celular (por cromatografia em camada fina, segundo a técnica descrita por Kandler e Weiss (1986) e Tanasupawat et al. (1992); isómero do ácido láctico produzido a partir de glucose, em MRS caldo sem acetato de sódio (Anexo I)

(determinação enzimática utilizando D-Lactic acid/L-Lactic acid (Boehringer Mannheim), segundo o procedimento indicado pelo fabricante).

Fizeram-se testes de utilização das fontes de carbono, seguindo a técnica descrita por Gürakan et al. (1995), em placas de microtitulação esterilizadas, preparadas no laboratório com 20 µl de soluções a 10%, esterilizadas por filtração, de cada um dos seguintes compostos: ribose (Merck), arabinose (BDH), xilose (BDH), ramnose (BDH), manitol (Panreac), sorbitol (BDH), adonitol (Riedel-de Haën), glicogénio (Merck), glicerol (J.M.Vaz Pereira), frutose (Riedel-de Haën), manose (Sigma), galactose (Merck), glucose (BDH), lactose (BDH), maltose (BDH), sacarose (Merck), trealose (BDH), celobiose (Merck), rafinose (BDH), melibiose (BDH), melezitose (Sigma), salicina (BDH), gluconato (Sigma), amigdalina (BDH), esculina (BDH), fucose (BDH), turanose (Sigma), inulina (Riedel-de Haën), arbutina (Sigma) e dextrina (BDH). Após duas lavagens celulares em solução fisiológica estéril, cada estirpe foi semeada em meio MRS basal (sem glucose e extracto de carne e com 30 mg de púrpura de bromocresol (Riedel-de Haën) por litro de meio) (Anexo I), e foram inoculados 200 µl em cada poço contendo a fonte de carbono. A primeira leitura foi feita após incubação de 24 horas a 30°C e a segunda foi feita às 48 horas de incubação, adicionando 15 µl de uma solução a 0,2% de púrpura de bromocresol em etanol absoluto.

A identificação das bactérias lácticas presentes foi feita com base nas chaves de classificação de Garvie (1986a; b); Kandler e Weiss (1986); Mundt (1986); Schleifer (1987); Devriese et al. (1991a), (1993); Axelsson (1993); Collins et al. (1993); Holt et al. (1994).

A identificação ao nível da espécie das estirpes pertencentes ao género *Enterococcus* foi feita através de dendrograma obtido por UPGMA com o coeficiente de Jaccard utilizando o programa SPSS versão 8.0. As estirpes padrão, obtidas de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH (DSMZ), foram as seguintes: DSM 2146 - *Enterococcus faecium*; DSM 4838 - *Enterococcus mundtii*; DSM 6630 - *Enterococcus*

dispar; DSM 20160 - *Enterococcus hirae*; DSM 20376 - *Enterococcus faecalis*; DSM 20477^T - *Enterococcus faecium*; DSM 20478^T - *Enterococcus faecalis*; DSM 20633 - *Enterococcus durans*; DSM 20679 - *Enterococcus avium*; DSM 20680 - *Enterococcus casseliflavus*; DSM 20681 - *Enterococcus malodoratus* e DSM 20682 - *Enterococcus cecorum*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O Quadro IV-1 apresenta o número de estirpes isoladas e o número de estirpes de bactérias lácticas a identificar provenientes de queijos com 3 e 45 dias de maturação. Da análise do referido quadro (Quadro IV-1) podemos constatar que cerca de 32,7% da totalidade das estirpes isoladas (33,7% aos 3 dias e 31,4% aos 45 dias) não cresceu após o seu isolamento (13,6% aos 3 dias e 13,7% aos 45 dias) ou perdeu a viabilidade (20,1% aos 3 dias e 17,7% aos 45 dias) durante os procedimentos realizados para a sua caracterização. Neste último caso, a percentagem de estirpes perdidas foi ligeiramente inferior quando proveniente de queijos com 45 dias de maturação, o que pode estar relacionado com o facto de nesta fase estarem presentes, provavelmente, estirpes mais resistentes e que sobreviveram melhor durante a sua permanência no laboratório.

Contudo, o aspecto mais relevante é o facto de a percentagem de estirpes isoladas mas consideradas não lácticas ser bastante mais elevada entre as provenientes de queijos com 3 dias de maturação (14,3%), que entre as isoladas de queijos com 45 dias de maturação (3,6%). Entre estas estirpes não lácticas predominavam as Gram negativas que, provavelmente, encontraram condições que permitiram a sua sobrevivência no queijo aos três dias de maturação, mas que numa fase posterior mais dificilmente se mantiveram viáveis.

QUADRO IV-1 - Estirpes Isoladas de Queijos com 3 e 45 Dias de Maturação.

| | QUEIJO COM 3 DIAS DE MATURAÇÃO | QUEIJO COM 45 DIAS DE MATURAÇÃO | TOTAL |
|-----------------------------------|---|--|--------------------|
| ISOLADAS | 538 | 451 | 989 |
| SEM CRESCIMENTO | 73 (13,6%) | 62 (13,7%) | 135 (13,7%) |
| NÃO LÁCTICAS | 77 (14,3%) | 16 (3,6%) | 93 (9,4%) |
| PERDIDAS | 108 (20,1%) | 80 (17,7%) | 188 (19,0%) |
| LÁCTICAS A IDENTIFICAR | 280 (52,0%) | 293 (65,0%) | 573 (57,9%) |

O Quadro IV-2 mostra o número de estirpes lácticas que foi possível identificar a partir dos isolados de queijos com 3 e 45 dias de maturação. Das 573 estirpes de bactérias lácticas a identificar (280 provenientes de queijos com 3 dias de maturação e 293 provenientes de queijos com 45 dias de maturação), não foram identificadas com nenhum género deste grupo 67 estirpes, sendo 33 e 34 provenientes de queijos com 3 e 45 dias de maturação, respectivamente.

QUADRO IV-2 - Estirpes Lácticas Identificadas a Partir das Estirpes Isoladas de Queijos com 3 e 45 Dias de Maturação.

| | QUEIJO COM 3 DIAS DE MATURAÇÃO | QUEIJO COM 45 DIAS DE MATURAÇÃO | TOTAL |
|-----------------------------------|---|--|--------------|
| LÁCTICAS A IDENTIFICAR | 280 | 293 | 573 |
| IDENTIFICADAS | 247 (88,2%) | 259 (88,4%) | 506 (88,3%) |
| N/IDENTIFICADAS | 33 (11,8%) | 34 (11,6%) | 67 (11,7%) |

Os Quadros IV-3 e IV-4 apresentam o número de estirpes provenientes de queijos com 3 e 45 dias de maturação isoladas a partir de diferentes meios de cultura, em condições de aerobiose e anaerobiose, respectivamente.

Podemos observar que a percentagem de estirpes que não cresceu durante a realização dos diferentes procedimentos conducentes à sua caracterização bem como a percentagem de estirpes não lácticas foi muito reduzida quando isoladas a partir do meio KA₃. Este meio é considerado como bastante selectivo, permitindo, quase exclusivamente, o crescimento de enterococos e inibindo o desenvolvimento de bactérias Gram negativas e de algumas bactérias lácticas, incluindo os lactobacilos. Além disso, sendo os enterococos capazes de se adaptar a condições menos favoráveis, sobrevivem mais facilmente às condições de laboratório (Benkerroum et al., 1993; Tornadijo et al., 1995; Flahaut et al., 1997; López-Díaz et al., 2000).

Por outro lado, as estirpes isoladas do meio DTA-F (semeadas em meio DTA e incubadas a 10°C durante 7 dias) e as provenientes de queijos com 45 dias de maturação isoladas de MRS e M17, em condições de anaerobiose, foram as que apresentaram uma percentagem mais elevada de inviabilidade cuja causa, eventualmente, pode ser atribuída a uma certa incompatibilidade entre as condições de crescimento quando do isolamento e as que foram impostas, por exigências metodológicas, para a identificação das estirpes.

O meio M17 foi o que permitiu o crescimento de um maior número de estirpes não lácticas, principalmente provenientes de amostras com 3 dias de maturação (35,2%), mas também importante nas amostras com 45 dias de maturação (7,1%). De facto, este meio revelou-se moderadamente selectivo para o isolamento de lactococos (Pouillet et al., 1993; Tornadijo et al., 1995; Freitas et al., 1996) e pode ter permitido também o crescimento de outras bactérias, que não apenas as lácticas. No entanto, é considerado como o meio mais adequado para o isolamento de lactococos (Tornadijo et al., 1995; Corroller et al., 1998; López-Díaz et al., 2000).

QUADRO IV-3 - Distribuição das Estirpes Isoladas pelos Diferentes Meios de Cultura, em Condições de Aerobiose, Provenientes de Queijos com 3 e 45 Dias de Maturação.

| MEIO DE ISOLAMENTO | MRS | | M17 | | KA ₃ | | DTA | | DTA-F | | APT | |
|--------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 3 DIAS | 45 DIAS | 3 DIAS | 45 DIAS | 3 DIAS | 45 DIAS | 3 DIAS | 45 DIAS | 3 DIAS | 45 DIAS | 3 DIAS | 45 DIAS |
| FASE DE MATURAÇÃO | 71 | 64 | 54 | 70 | 80 | 45 | 111 | 59 | 48 | 80 | 81 | |
| ISOLADAS | | | | | | | | | | | | |
| SICRESCIMENTO | 12 (16,9%) | 9 (14,1%) | 9 (16,7%) | 3 (4,3%) | 2 (2,5%) | 3 (6,7%) | 14 (12,6%) | 9 (15,3%) | 23 (29,1%) | 16 (33,3%) | 10 (12,5%) | 9 (11,1%) |
| N/LÁCTICAS | 8 (11,3%) | 2 (3,1%) | 19 (35,2%) | 5 (7,1%) | 3 (3,8%) | 1 (2,2%) | 19 (17,1%) | 1 (1,7%) | 3 (3,8%) | 1 (2,1%) | 11 (13,8%) | 5 (6,2%) |
| PERDIDAS | 9 (12,7%) | 6 (9,4%) | 8 (14,8%) | 13 (18,6%) | 8 (10%) | 7 (15,6%) | 16 (14,4%) | 11 (18,6%) | 37 (46,8%) | 17 (35,4%) | 19 (23,8%) | 12 (14,8%) |
| A IDENTIFICAR | 42 (59,2%) | 47 (73,4%) | 18 (33,3%) | 49 (70%) | 67 (83,8%) | 34 (75,6%) | 62 (55,9%) | 38 (64,4%) | 16 (20,3%) | 14 (29,2%) | 40 (50%) | 55 (67,9%) |
| IDENTIFICADAS | 40 (56,3%) | 41 (64,1%) | 16 (29,6%) | 43 (61,4%) | 55 (68,8%) | 31 (68,9%) | 56 (50,5%) | 35 (59,3%) | 14 (17,7%) | 11 (22,9%) | 36 (45%) | 47 (58%) |
| N/IDENTIFICADAS | 2 (2,8%) | 6 (9,4%) | 2 (3,7%) | 6 (8,6%) | 12 (15%) | 3 (6,7%) | 6 (5,4%) | 3 (5,1%) | 2 (2,5%) | 3 (6,3%) | 4 (5%) | 8 (9,9%) |

MRS - de Man, Rogosa e Sharpe Agar; KA₃ - Kanamicina Esculina Azida de Sódio Agar; DTA - Dextrose Triptona Agar; DTA-F - Dextrose Triptona Agar incubado a 10°C durante 7 dias.

QUADRO IV-4 - Distribuição das Estirpes Isoladas pelos Diferentes Meios de Cultura, em Condições de Anaerobiose, Provenientes de Queijos com 3 e 45 dias de Maturação.

| MEIO DE ISOLAMENTO | MRS | | M17 | | KA ₃ | | DTA | | APT | |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | 3 DIAS | 45 DIAS | 3 DIAS | 45 DIAS | 3 DIAS | 45 DIAS | 3 DIAS | 45 DIAS | 3 DIAS | 45 DIAS |
| ISOLADAS | 13 | 14 | 15 | 30 | 12 | 19 | 11 | 13 | 12 | 8 |
| SICRESCIMENTO | 1 (7,7%) | 3 (21,4%) | 1 (6,7%) | 9 (30%) | 0 | 1 (5,3%) | 1 (9,11%) | 0 | 0 | 0 |
| N/LÁCTICAS | 2 (15,4%) | 0 | 5 (33,3%) | 1 (3,3%) | 1 (8,3%) | 0 | 3 (27,3%) | 0 | 3 (25%) | 0 |
| PERDIDAS | 2 (15,4%) | 2 (14,3%) | 2 (13,3%) | 7 (23,3%) | 3 (25%) | 3 (15,8%) | 2 (18,2%) | 1 (7,7%) | 2 (16,7%) | 1 (12,5%) |
| A IDENTIFICAR | 8 (61,5%) | 9 (64,3%) | 7 (46,7%) | 13 (43,3%) | 8 (66,7%) | 15 (79%) | 5 (45,5%) | 12 (92,3%) | 7 (58,3%) | 7 (87,5%) |
| IDENTIFICADAS | 6 (46,2%) | 8 (57,1%) | 6 (40%) | 11 (36,7%) | 7 (58,3%) | 15 (79%) | 5 (45,5%) | 12 (92,3%) | 6 (50%) | 5 (62,5%) |
| N/IDENTIFICADAS | 2 (15,4%) | 1 (7,1%) | 1 (6,7%) | 2 (6,7%) | 1 (8,3%) | 0 | 0 | 0 | 1 (8,3%) | 2 (25%) |

MRS - de Man, Rogosa e Sharpe Agar; KA₃ - Kanamicina Esculina Azida de Sódio Agar; DTA - Dextrose Triptona Agar.

Também nos meios MRS, DTA e APT se observou uma percentagem relativamente elevada de bactérias não lácticas isoladas de amostras de queijo com 3 dias de maturação, quer em aerobiose quer em anaerobiose, traduzindo a menor selectividade destes meios em comparação com o meio KA₃. As baixas percentagens de bactérias não lácticas obtidas a partir do meio DTA-F (3,8% e 2,1%) pode ser atribuída à selectividade exercida pelas condições utilizadas na incubação (cerca de 10°C), já que quando este meio era incubado a temperaturas de 30°C (DTA), a percentagem de bactérias não lácticas, principalmente aos 3 dias de maturação, era bastante mais elevada (17,1%).

O Quadro IV-5 apresenta a distribuição por géneros das 506 estirpes de bactérias lácticas (247 provenientes de queijos com 3 dias de maturação e 259 originárias de queijos com 45 dias de maturação).

QUADRO IV-5 - Distribuição por Géneros das Estirpes de Bactérias Lácticas Isoladas de Queijos, nas Duas Fases de Maturação Consideradas (3 e 45 dias).

| GÉNEROS | QUEIJO COM 3 DIAS DE MATURAÇÃO | QUEIJO COM 45 DIAS DE MATURAÇÃO | TOTAL |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------|
| Identificadas | 247 | 259 | 506 |
| <i>Enterococcus</i> | 194 (78,5%) | 206 (79,5%) | 400 (79%) |
| <i>Lactobacillus</i> | 30 (12,2%) | 39 (15,1%) | 69 (13,6%) |
| <i>Lactococcus</i> | 13 (5,3%) | 3 (1,2%) | 16 (3,2%) |
| <i>Pediococcus</i> | 3 (1,2%) | 4 (1,5%) | 7 (1,4%) |
| <i>Leuconostoc</i> | 3 (1,2%) | 4 (1,5%) | 7 (1,4%) |
| <i>Weissella</i> | 4 (1,6%) | 3 (1,2%) | 7 (1,4%) |

Foram considerados como pertencentes ao género *Enterococcus*, os cocos Gram positivos, catalase negativos, homofermentativos, que produziam predominantemente o isómero L do ácido láctico, que cresciam a 10° e a 45°C e em presença de 6,5% de NaCl, fermentadores de ribose, VP positivos e pertencentes ao grupo D de Lancefield, tal como é descrito por Mundt

(1986), Axelson (1993), Devriese et al. (1993), Holt (1994), Leclerc et al. (1996), Cogan et al. (1997) e Flahaut et al. (1997).

Assim, as estirpes de bactérias lácticas mais frequentemente isoladas, em ambas as fases de maturação, pertenciam ao género *Enterococcus* (78,5% aos 3 dias e 79,5% aos 45 dias). (Quadro IV-5). Esta observação confirma os dados obtidos no trabalho realizado previamente em que foi presumido que este era, provavelmente, o género de bactérias lácticas mais representativo, dadas as elevadas contagens microbianas registadas no meio m-Enterococcus Agar.

Também noutros queijos artesanais e feitos com leite cru de ovelha, como Cásar de Cáceres (Poulet et al., 1993), Pecorino de Umbria (Rossi et al., 1994a; b), Picante da Beira Baixa (Freitas et al., 1996), Serra (Macedo et al., 1995), Kasseri, Fiore Sardo e Manchego (Cogan et al., 1997), se verificou que a população de enterococos era bastante abundante, geralmente predominando sobre outros géneros de bactérias lácticas.

A presença de enterococos no queijo tem sido frequentemente observada em derivados de leite, nomeadamente de ovino. Como habitantes normais do aparelho digestivo, especialmente intestino, do Homem e de outros animais de sangue quente, estes microrganismos facilmente contaminam o leite. Devido à sua tolerância a concentrações salinas e a temperaturas mais ou menos elevadas, permanecem em números elevados em queijos artesanais, principalmente naqueles que são feitos com leite cru (Devriese et al., 1991a; Rossi et al., 1994a; b; Cogan et al., 1997; Flahaut et al., 1997).

Apesar de a prevalência de enterococos nestes produtos ser atribuída à existência de condições higiénicas deficientes durante a manufactura e maturação, as numerosas populações neles detectadas podem ser consideradas como parte integrante da sua microflora e não apenas como indicadores de contaminação fecal (Fontecha et al., 1990; Poulet et al., 1993; Rossi et al., 1994a; b; Macedo et al., 1995; Cuesta et al., 1996).

É-lhes conferido um papel relevante no processo de maturação do queijo, devido às suas actividades metabólicas e à libertação das suas enzimas intracelulares, após a sua lise. As actividades proteolítica e lipolítica que desempenham são importantes na maturação do queijo, contribuindo para o desenvolvimento do flavour e estimulando o crescimento de outros microrganismos, igualmente envolvidos no estabelecimento das características organolépticas do produto. Também tem sido referida a sua utilidade na produção de substâncias antagonistas, como peróxido de hidrogénio, ácidos orgânicos e enterocinas, que, em certa medida, inibem o desenvolvimento de diversos microrganismos indesejáveis (Rossi et al., 1994 a, b; Freitas et al., 1996, Cogan et al., 1997; Flahaut et al., 1997; López-Díaz et al., 2000).

Assim, valorizando a sua presença nos produtos lácteos, tem sido proposta a utilização de enterococos como componentes das culturas de arranque de certas variedades de queijo, com o objectivo de salvaguardar a sua tipicidade. No entanto, estes microrganismos podem ser responsáveis por graves problemas de saúde no Homem, designadamente endocardites e infecções urinárias, podem estar envolvidos em diversas infecções abdominais polimicrobianas e infecções nosocomiais e também na produção de aminas biogénicas (Devriese et al., 1991a; Rossi et al., 1994a; b; Freitas et al., 1996; Cogan et al., 1997; Flahaut et al., 1997; López-Díaz et al., 2000).

A partir do perfil de utilização de fontes de carbono realizado às 400 estirpes consideradas como sendo pertencentes ao género *Enterococcus*, foi feito o seu “agrupamento hierárquico”. O dendrograma apresentado na Figura IV-1 ilustra o resultado dessa análise estatística.

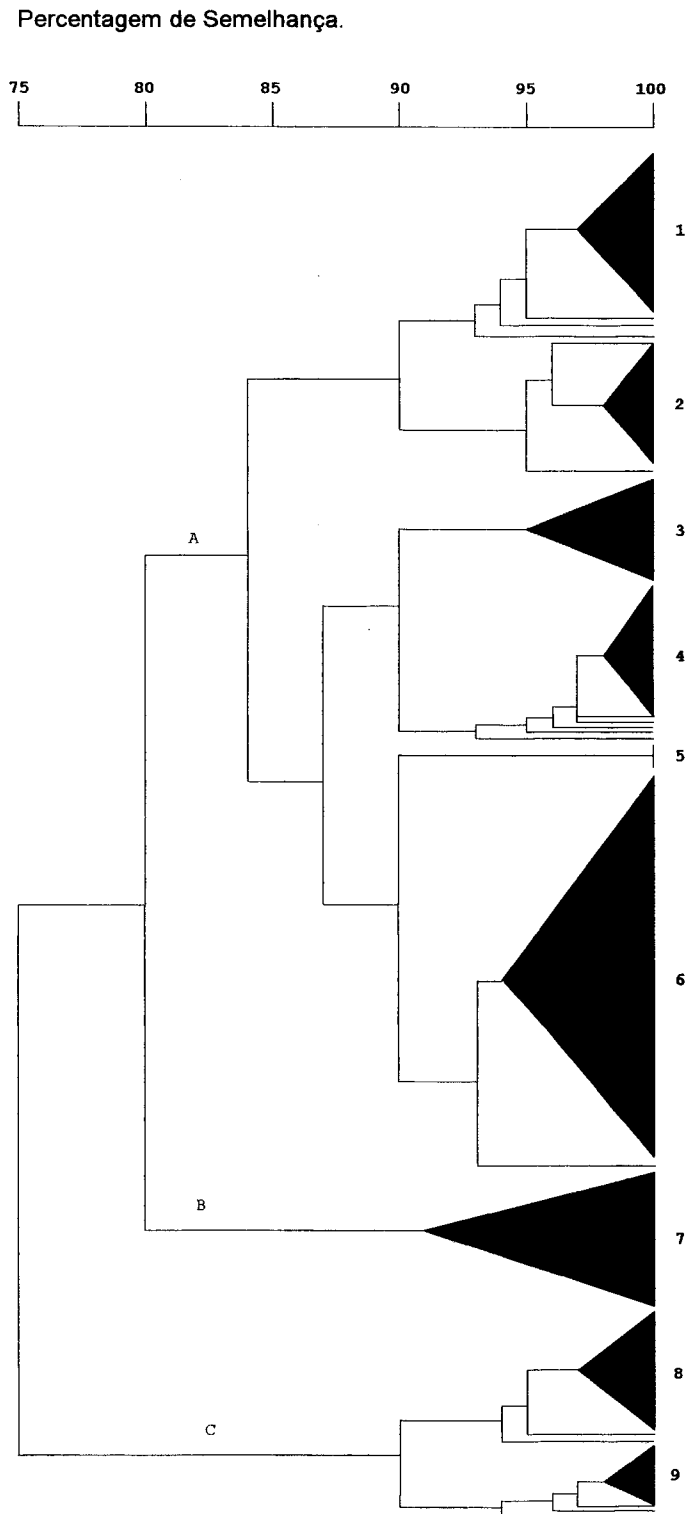


FIGURA IV - 1 - Dendrograma Obtido por UPGMA Utilizando o Coeficiente Jaccard a partir de 30 testes de Utilização de Fontes de Carbono Realizados nas Estirpes de Bactérias Lácticas Pertencentes ao Género *Enterococcus*.

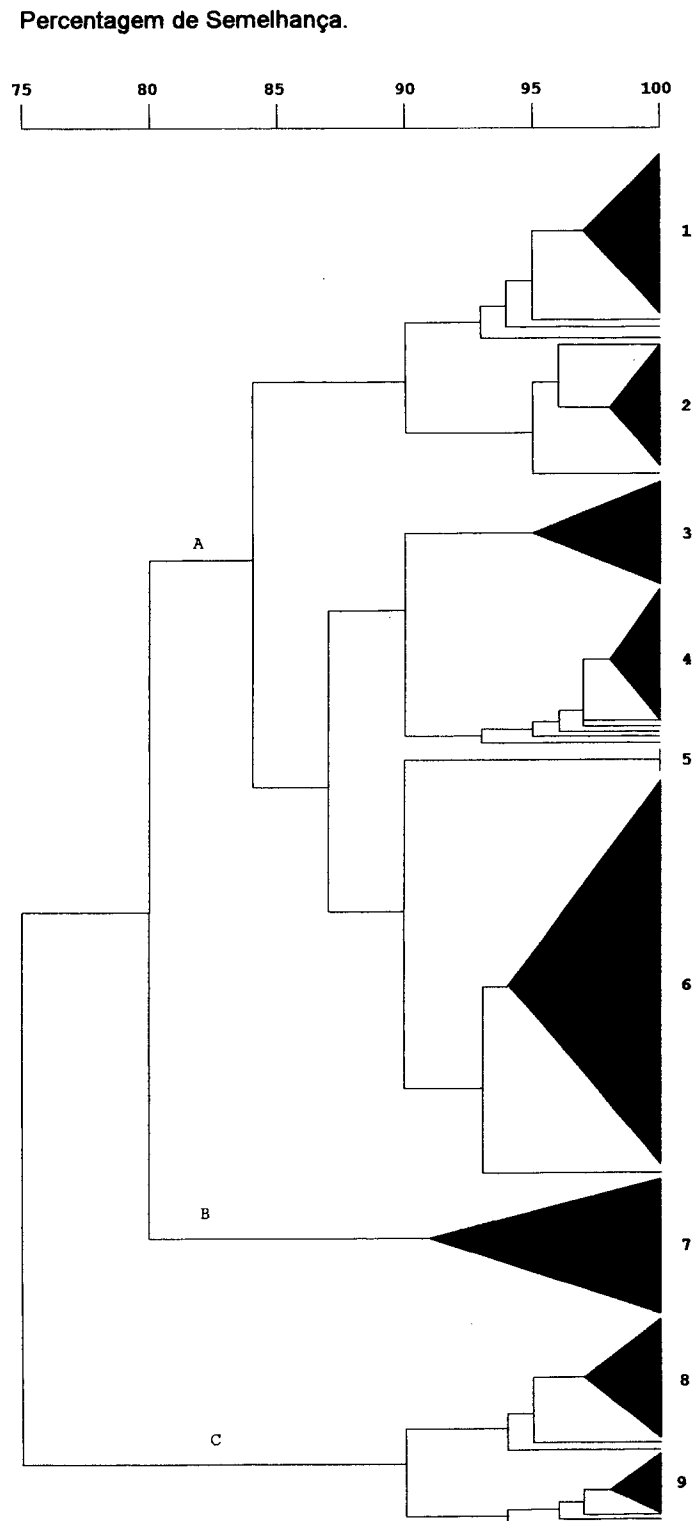


FIGURA IV - 1 - Dendrograma Obtido por UPGMA Utilizando o Coeficiente Jaccard a partir de 30 testes de Utilização de Fontes de Carbono Realizados nas Estirpes de Bactérias Lácticas Pertencentes ao Género *Enterococcus*.

Pode observar-se a existência de três grupos (A, B e C) e, considerando um nível de semelhança superior a 90% é possível detectar a existência de nove “clusters”, seis dos quais pertencem ao grupo A, um ao grupo B e dois ao grupo C, cujas características serão apreciadas individualmente. (Fig.IV-1).

Assim, o “cluster” 1 (Fig.IV-1) contém quarenta e sete estirpes totalmente idênticas fenotipicamente à estirpe referência DSM 20477^T - *Enterococcus faecium* e, por isso, foram identificadas como *Enterococcus faecium*. (Anexo II). Inclui, também, cinco estirpes que apresentaram pequenas diferenças relativamente às anteriores, mas, tratando-se de parâmetros que podem ser variáveis consoante a estirpe desta espécie (gluconato e xilose, segundo Devriese et al. (1993), permitiram que fossem consideradas também como *Ent. faecium*. De salientar que entre estas estirpes, quatro isolados revelaram-se sorbitol positivo, característica que é evidenciada nas estirpes de *Ent. faecium* tipicamente associadas a cães e raramente de origem humana (Devriese et al., 1992; 1993). Surgem ainda colocadas neste “cluster” as estirpes DSM 20680 - *Enterococcus casseliflavus* e DSM 20681 - *Enterococcus malodoratus*, além de uma estirpe com características completamente distintas que foi, por isso, considerada como *Enterococcus* spp.

O “cluster” 2 (Fig.IV-1) inclui trinta e oito estirpes cuja diferença relativamente à estirpe referência DSM 20477^T - *Ent. faecium* reside na sua incapacidade em utilizar a amigdalina. (Anexo II). Dada a semelhança do seu perfil de utilização de fontes de carbono com o da citada estirpe referência, foram consideradas como sendo *Ent. faecium* embora, segundo Devriese et al. (1993), esta característica apenas se observe nalgumas estirpes de *Enterococcus columbae*. Fazem também parte deste “cluster” três estirpes que diferem das anteriores por serem negativas à acidificação da arabinose e do manitol, apresentando características fenotípicas próximas de *Enterococcus durans/Enterococcus hirae* ou de *Enterococcus cecorum* (Holt, 1994; Devriese et al., 1991b), e uma que utilizava a xilose e o glicerol, não se

assemelhando com o perfil de nenhuma espécie. Foram, portanto, consideradas como *Enterococcus* spp.

Do “cluster” 3 (Fig.IV-1) fazem parte oito estirpes cuja única diferença para a estirpe referência DSM 20477^T - *Enterococcus faecium* consiste na capacidade em utilizar a dextrina. (Anexo II). Foram, também, identificadas como *Ent. faecium*, uma vez que esta característica pode estar presente nesta espécie, como se observou na estirpe DSM 2146 - *Enterococcus faecium* utilizada neste trabalho. Fazem também parte deste “cluster” vinte estirpes idênticas às referidas anteriormente, mas que não utilizavam a sacarose, diferindo, portanto, da estirpe referência DSM 20477^T - *Enterococcus faecium* pela capacidade em utilizar a dextrina e pela incapacidade em utilizar a sacarose. Uma vez que a utilização da sacarose é uma característica variável nesta espécie (Knudtson e Hartman, 1992; Devriese et al., 1993, Flahaut et al., 1997), foi assumido que estas estirpes eram *Ent. faecium*. Também se situaram neste “cluster” uma estirpe que não utilizava a arbutina e outra que diferia das anteriores por ser sorbitol e melizitose positivos. Foram igualmente consideradas como sendo *Ent. faecium*, pela razão anteriormente apontada.

O “cluster” 4 (Fig.IV-1) é formado por quarenta e quatro estirpes que se distinguem de DSM 20477^T - *Enterococcus faecium* pelo facto de não utilizarem a sacarose nem a amigdalina e serem dextrina positivo, tendo sido identificadas como *Ent. faecium*. (Anexo II). Estão também presentes cinco isolados cujas diferenças fenotípicas relativamente à estirpe referência, não permitem estabelecer qualquer relação com ela, verificando-se mesmo que duas eram semelhantes a *E.hirae/E. durans*. Neste “cluster” foi também incluída a estirpe DSM 20682 - *Enterococcus cecorum*, detentora de um perfil fenotípico bastante diferente de todas as estirpes presentes. Assim, na impossibilidade de identificação com qualquer das espécies, quer por comparação com as estirpes referência quer através de dados referidos na bibliografia consultada, estas cinco estirpes foram consideradas como sendo *Enterococcus* spp.

Pela mesma razão, as seis estirpes agrupadas no “cluster” 5 (Fig.IV-1) foram igualmente identificadas como *Enterococcus spp.* (Anexo II).

O “cluster” 6 (Fig.IV-1) foi o que incluiu o maior número de estirpes (cento e dezanove) bem como a estirpe DSM 2146 - *Enterococcus faecium*. Seis estirpes foram considerados como sendo *Ent. faecium*, uma vez que apenas diferem de DSM 20477^T - *Enterococcus faecium* pela incapacidade em utilizarem a sacarose e cento e dois isolados apresentaram um perfil fenotípico muito semelhante, diferindo apenas pelo facto de serem ou manitol negativo (dois) ou amigdalina negativo (noventa e oito) ou rafinose positivo (dois). (Anexo II). Segundo Devriese et al. (1993, 1995), *Ent. faecium* é, geralmente, manitol positivo e a maioria das estirpes desta espécie é rafinose negativo. No entanto, as estirpes de origem avícola são geralmente rafinose positivo, o que não acontece com as estirpes isoladas de mamíferos (Devriese et al., 1991b). Assim, os cento e dois isolados referidos foram considerados como *Ent. faecium*, dada a elevada semelhança com esta espécie. As restantes onze estirpes, exibindo um perfil atípico, foram consideradas como *Enterococcus spp.* Apesar da maior parte dos isolados ser bastante semelhante, fenotipicamente, à estirpe referência DSM 20477^T - *Enterococcus faecium* incluída no “cluster” 1 (apenas diferem em sacarose e amigdalina), a estirpe DSM 2146 - *Enterococcus faecium* ficou colocada neste “cluster”, apresentando maiores discrepâncias com os isolados (xilose, melibiose, melzitose e dextrina). (Anexo II). Estas diferenças podem estar relacionadas com o facto de se tratar de um estirpe laboratorial, como sugerem Server-Busson et al. (1999), a propósito de estirpes referência de *Leuconostoc* que utilizaram. Por outro lado, quando se comparou o perfil obtido nas nossas condições com o que foi fornecido por outros autores que utilizaram a mesma estirpe referência verificámos algumas discrepâncias que podem ser atribuídas à dificuldade em reproduzir fielmente os resultados obtidos por este método nos diferentes laboratórios (Knudtson e Hartman, 1992) ou por uma eventual contaminação não detectada.

O “cluster” 7 (Fig.IV-1) compreende a estirpe DSM 20633 - *Enterococcus durans* e um isolado fenotipicamente igual a ela, além de mais quatro estirpes que, ao contrário desta estirpe referência, são sacarose positivo. (Anexo II). Neste “cluster” também estão incluídas cinco estirpes iguais à estirpe DSM 20160 - *Enterococcus hirae* e mais uma que, ao contrário das outras, é gluconato positivo, vinte e sete estirpes iguais entre si, que apenas diferem das anteriores por não acidificarem a amigdalina, e, finalmente, mais três estirpes que são, respectivamente, melizitose positivo, melizitose e gluconato positivos ou glicerol e amigdalina positivos. Como anteriormente foi referido, apenas algumas estirpes de *Ent. columbae* são amigdalina negativo (Devriese et al., 1993). No entanto, o perfil fenotípico exibido por estas estirpes é bastante diferente daquele que é referido por Devriese et al. (1993) para *Ent. columbae*, aproximando-se bastante de *Ent. hirae*.

A distinção entre *Ent. durans* e *Ent. hirae* é feita com base na acidificação da sacarose e da melibiose, sendo negativa para a primeira espécie e positiva para a segunda. *Ent. durans* é sacarose e melibiose negativos, enquanto *Ent. hirae* é sacarose e melibiose positivos. Contudo, podem ser reconhecidas como *Ent. durans* algumas estirpes sacarose positivo e, também, algumas estirpes de *Ent. hirae* podem não produzir ácido a partir da utilização destes substratos (Devriese et al., 1995). Assim, seguindo a preferência destes autores, o “cluster” 7 (grupo B) foi considerado como constituído pelas estirpes que identificadas como pertencentes ao complexo *Ent. hiraе/Ent. durans*.

Separados dos anteriores a um nível de semelhança de 75%, encontram-se os “clusters” 8 e 9 (Fig.IV-1), formando um grupo individualizado (grupo C), e contendo, essencialmente, os isolados identificados como *E. faecalis*.

O “cluster” 8 (Fig.IV-1) contém quatro estirpes cuja diferença para a estirpe DSM 20376 - *Enterococcus faecalis* é serem melibiose positivo e para a estirpe referência DSM 20478^T - *Enterococcus faecalis* é serem ramnose negativo. (Anexo II). Segundo Devriese et al. (1991a; b) *Ent. faecalis* é

geralmente melibiose negativo, podendo existir estirpes melibiose positivo e para Holt (1994) e Flahaut et al. (1997) entre 21 e 79% das estirpes de *E. faecalis* são ramnose positivo.

Este “cluster” agrupa, ainda, trinta estirpes, fenotipicamente iguais à estirpe referência DSM 20376 - *Enterococcus faecalis*, e duas que apenas diferem em arabinose e em amigdalina, respectivamente. Estão também incluídos dois isolados, com diferenças mais acentuadas (três substratos em cada um) e, portanto, considerados como *Enterococcus* spp. e a estirpe DSM 20679 - *Enterococcus avium*, bastante diferente de todas as outras estirpes.

O “cluster” 9 (Fig.IV-1) é formado por dezoito isolados com um perfil intermédio entre ambas as estirpes padrão *Ent. faecalis* utilizadas. Estes isolados revelaram ser arabinose e melibiose positivos e ramnose negativo e as estirpes referência são arabinose, melibiose e ramnose negativos, no caso de DSM 20376 - *Enterococcus faecalis* e arabinose negativo, melibiose e ramnose positivos em DSM 20478^T - *Enterococcus faecalis*. (Anexo II). Também neste “cluster” se incluíram duas estirpes, consideradas como *Enterococcus* spp., e a estirpe DSM 6630 - *Enterococcus dispar*.

Assim, como se pode observar no Quadro IV-6, *Enterococcus faecium* foi a espécie predominante (68%) e era mais abundante no final da maturação (84,8%) que no início deste período (62,5%). Por outro lado, *Enterococcus faecalis*, a segunda espécie mais frequente (13,5%), estava presente em maior número no início da maturação (23,9% e 6,3% aos 3 e aos 45 dias de maturação, respectivamente), tal como o complexo *Enterococcus hirae/Enterococcus durans*, o menos numeroso (10,3%, sendo 13,6% e 8,9% aos 3 e aos 45 dias de maturação, respectivamente).

Podemos também referir que a maioria das estirpes colocadas no “cluster” 2 (*Ent. faecium*) era proveniente de amostras com 45 dias de maturação, enquanto que no “cluster” 4 (*Ent. faecium*) estava situada uma percentagem maior de estirpes originárias de queijos com 3 dias de maturação.

Noutras variedades de queijo de ovelha, como Fiore Sardo (Ledda et al., 1994) e Pecorino d'Abruzzo (Dellaglio et al., 1995), *Ent. faecium* constituía também uma população importante e no queijo Picante da Beira Baixa foi a espécie mais abundante, seguida de *Ent. faecalis* e *Ent. durans*, diminuindo estes últimos à medida que a maturação progredia (Freitas et al., 1996). *Ent. faecium* também representava uma percentagem importante da população de bactérias lácticas na coalhada do queijo Serra de Estrela, diminuindo acentuadamente no queijo maturado (Macedo et al., 1995). No entanto, no queijo César de Cáceres, as espécies mais abundantes eram *Ent. faecalis* e *Ent. avium*, sendo menos numerosas *Ent. faecium* e *Ent. gallinarum*. Nesta variedade de queijo, foram detectadas várias estirpes cujo perfil metabólico foi considerado intermédio entre *Ent. faecalis* e *Ent. faecium* (Pouillet et al., 1993).

QUADRO IV-6 - Frequência de Isolamento das Espécies de *Enterococcus* em Queijos com 3 e 45 dias de Maturação.

| | QUEIJO COM 3 DIAS DE MATURAÇÃO | QUEIJO COM 45 DIAS DE MATURAÇÃO | TOTAL |
|-------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------|
| <i>Ent. faecium</i> | 110 (62,5%) | 162 (84,8%) | 272 (68%) |
| <i>Ent. faecalis</i> | 42 (23,9%) | 12 (6,3%) | 54 (13,5%) |
| <i>Ent. hirae/Ent. durans</i> | 24 (13,6%) | 17 (8,9%) | 41 (10,3%) |
| <i>Enterococcus spp.</i> | 18 (10,2%) | 15 (7,9%) | 33 (8,3%) |
| TOTAL | 176 (100%) | 191 (100%) | 400 (100%) |

O segundo género mais frequentemente observado, embora com muito menor expressão que o anterior, foi o *Lactobacillus* (12,1% e 15,1% em queijos com 3 e 45 dias de maturação, respectivamente) (Quadro IV-5).

Este género, muito heterogéneo, inclui numerosas espécies com grande diversidade metabólica (Axelsson, 1993). Foram considerados como pertencentes ao género *Lactobacillus*, os bacilos Gram positivos, catalase

negativos, não esporulados e imóveis como indicado por Kandler e Weiss (1986), Schleifer (1987), Gürakan et al. (1995) e Gancel et al. (1997).

Nalgumas variedades de queijo de ovelha, como o Feta e o Teleme, os lactobacilos constituem o principal grupo de bactérias lácticas presente, representando, no final da maturação cerca de 95% da flora láctica. O efeito selectivo exercido pelas condições de acidez e pela elevada concentração de sal que caracterizam estes produtos é o principal responsável pelo favorecimento do crescimento destes microrganismos (Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetaki, 1992).

Também no queijo Picante da Beira Baixa, em que a concentração de sal é bastante elevada, os lactobacilos, especialmente as espécies mais tolerantes ao sal, como *Lactobacillus plantarum* e *Lb. paracasei*, sobrevivem durante quase todo o período de maturação (Freitas et al., 1996).

No caso presente, embora as concentrações de sal sejam elevadas (9% e 16% aos 30 e aos 60 dias de maturação, respectivamente (Pinheiro et al., 1998a), provavelmente não exercem uma pressão selectiva suficiente para inibir outras bactérias, nomeadamente os enterococos. Estes, mantendo uma população numerosa durante toda a maturação, podem sobrepor-se ao desenvolvimento de outras bactérias lácticas (López-Díaz et al., 2000). No entanto, a percentagem de lactobacilos no final da maturação, é ligeiramente superior à do início, indicando que estas bactérias se multiplicam durante a maturação deste queijo.

De facto, quando o leite é excretado não contém lactobacilos, sendo rapidamente contaminado por poeiras, utensílios e equipamentos que com ele contactam. Com o rápido crescimento de outros grupos microbianos, nomeadamente estreptococos, a população de lactobacilos mantém-se reduzida e, só após prolongada incubação, pode atingir valores elevados, devido à sua capacidade de crescimento sob condições selectivas como baixo E_h , baixo pH e limitação de açúcares, características de queijos

maturados, o que pode em parte explicar a sua dominância durante a maturação de alguns queijos (Kandler e Weiss, 1986; Peterson e Marshall, 1990; López e Mayo, 1997).

As espécies de lactobacilos mais frequentemente encontradas foram *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. casei* e *Lb. curvatus* em ambas as fases de maturação, sendo mais frequentes no final da maturação (45 dias). Na fase inicial (3 dias) também se encontrou *Lb. helveticus*, uma espécie termófila, comum em produtos lácteos, que não foi detectada no final da maturação.

Lactobacillus paracasei também estava presente durante a maturação dos queijos Picante da Beira Baixa e Serra da Estrela, revelando, neste último, tendência para crescer uma vez que a percentagem no final da maturação era superior à do início deste período (Macedo et al., 1995; Freitas et al., 1996).

No início da maturação do queijo Picante da Beira Baixa foi identificado *Lactobacillus curvatus* que tinha sido anteriormente detectado no queijo César de Cáceres (Pouillet et al., 1993; Freitas et al., 1995).

Estas espécies são frequentemente encontradas no leite e nos produtos lácteos, entre os quais o queijo, participando na proteólise e na lipólise durante a maturação e contribuindo para o desenvolvimento do flavour (Kandler e Weiss, 1986; Bhowmik e Marth, 1990; Peterson e Marshall, 1990).

As estirpes identificadas como sendo pertencentes ao género *Lactococcus* eram cocos Gram positivos, catalase negativos, homofermentativos, produtores de ácido L-láctico, com crescimento a 10° mas não a 45°C, nem em presença de 6,5% de NaCl (Mundt, 1986; Schleifer, 1987; Axelsson, 1993; Holt, 1994).

Como tem sido observado noutras variedades de queijo, o género *Lactococcus* estava presente com maior frequência nos queijos com 3 dias de maturação (5,3%) que nos queijos com 45 dias de maturação (1,2%) (Quadro IV-5). De facto, nos queijos César de Cáceres, Serra, Picante da Beira Baixa estas bactérias, muito sensíveis às condições de acidez e salinidade, estão presentes no início da maturação, decrescendo acentuadamente até ao final deste período (Pouillet et al., 1993; Macedo et al., 1995; Freitas et al., 1996).

No queijo César de Cáceres e Picante da Beira Baixa também se observou uma percentagem reduzida destes microrganismos quando comparada com os outros géneros de bactérias lácticas encontradas. No queijo Teleme, os lactococos apenas estavam presentes na coalhada (38,7%) e em queijos com 5 dias de maturação (12,7%), provavelmente devido aos efeitos inibidores do pH ácido e do elevado conteúdo em sal (>4,6%) (Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetakis, 1992; Pouillet et al., 1993; Freitas et al., 1996). No entanto, a sua autólise pode desempenhar um papel relevante na maturação do queijo, não só pela libertação de enzimas intracelulares como também constituindo um substrato importante para o crescimento de outros microrganismos, nomeadamente dos lactobacilos (Khalid e Marth, 1990; Olson, 1990; Peterson e Marshall, 1990).

No caso presente, é provável que durante a coagulação ou em fases de maturação mais precoces que os 3 dias em que se procedeu à amostragem, a população de lactococos seja mais numerosa. Aos três dias de maturação estes microrganismos já estiveram sujeitos à acção prejudicial do pH ácido e do sal difundido desde a superfície do queijo, após a sua adição à superfície.

Por outro lado, suspeitamos que a baixa percentagem de lactococos detectada, principalmente nas amostras de queijos com 3 dias de maturação, possa também estar relacionada com o grande número de estirpes que se perderam durante os processos de identificação, pois sendo mais sensíveis

que outros géneros bacterianos podem não ter resistido às condições de manutenção e conservação utilizadas.

A espécie mais frequentemente encontrada foi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, considerada como uma espécie importante na acidificação do leite e contribuindo para a formação da coalhada. Em menor proporção foram também detectadas estirpes com o fenótipo de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* diferenciando-se da primeira pela sua incapacidade em hidrolisar a arginina e fermentar a ribose (Mundt, 1986; Marshall, 1992; Corroler et al., 1998). Esta sub-espécie é isolada apenas de ambientes lácteos, especialmente de produtos lácteos fermentados em que são utilizadas culturas de arranque e não sobrevivendo na natureza. No entanto, tem sido também isolada de leites crus que fermentam espontaneamente devido ao seu enriquecimento microbiano natural (Marshall, 1992; Corroler et al., 1998).

Relativamente aos outros três géneros incluídos no grupo das bactérias lácticas, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella*, a sua expressão foi reduzida em ambas as fases de maturação consideradas (Quadro IV-5).

A principal característica do género *Pediococcus* é a sua forma de apresentação em tétradas, pares ou cadeias curtas. Além disso, são cocos Gram positivos, catalase negativos, homofermentativos, produtores de ácido DL- ou L-láctico, com temperaturas de crescimento óptimas entre 25 e 40°C, podendo algumas espécies crescer a 10°C ou a 45°C (Garvie, 1986a; Bhowmik e Marth, 1990; Axelsson, 1993; Holt, 1994).

O leite é um meio pobre para o crescimento destas bactérias, pois este depende da presença de um açúcar rapidamente disponível, como a glucose e outros monossacáridos (Garvie, 1986a). Por esta razão, a baixa percentagem de *Pediococcus* encontrada não surpreende e é semelhante à encontrada noutras variedades de queijos como Cheddar (Litopoulou-Tzanetakis et al., 1989) e Pecorino d'Abruzzo (Dellaglio et al., 1995), não sendo sequer referida a presença destes microrganismos nos trabalhos

respeitantes aos queijos Cásar de Cáceres (Pouillet et al., 1993), Serra da Estrela (Macedo et al., 1995) e Picante da Beira Baixa (Freitas et al., 1996).

A espécie mais representativa foi *P. pentosaceus*. Esta espécie dificilmente se diferencia, através das suas características morfológicas, culturais e fisiológicas, de *P. acidilactici*. No entanto, a sua capacidade em fermentar a maltose é considerada como uma característica diferenciadora, relativamente a *P. acidilactici* (Garvie, 1986a). Por outro lado, a única estirpe que revelou incapacidade em acidificar a arabinose levou-nos a considerá-la como *P. pentosaceus* subsp. *intermedius*, de acordo com Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetakis (1989).

O género *Leuconostoc* é constituído por microrganismos Gram positivos, de forma cocoide irregular, heterofermentativos, que produzem predominantemente ácido D-láctico a partir de glucose, crescem a 10° mas não a 45° C e não hidrolizam a arginina (Garvie, 1986b; Axelsson, 1993; Holt, 1994; Thunell, 1995).

Estes microrganismos surgem nos mesmos habitats que os lactobacilos e lactococos, sendo frequentemente encontrados no leite e nos produtos lácteos (Garvie, 1986b; Thunell, 1995). São considerados como produtores de aromas nos queijos e leites fermentados, principalmente devido à sua capacidade em metabolizar o ácido cítrico e produzir compostos voláteis (Cogan e Jordan, 1994; Vedamuthu, 1994; Macedo et al., 1995; Server-Busson et al., 1999).

Devido ao seu carácter heterofermentativo, a presença de *Leuconostoc* nos queijos pode estar relacionada com a formação de “olhos”, característica da pasta de alguns queijos, e com o desenvolvimento de uma textura aberta necessária para o desenvolvimento de outros microrganismos. Nalguns queijos curados por bolores esta textura é importante para o desenvolvimento de alguns deles, responsáveis pelas características peculiares dessas

variedades de queijo (Pouillet et al., 1993; Cogan e Jordan, 1994; Vedamuthu, 1994; Macedo et al., 1995; López-Díaz et al., 2000).

Segundo López e Mayo (1997), os *Leuconostoc* atingem densidades elevadas nas variedades de queijos feitos com leite de ovelha crú. No queijo Serra da Estrela, estas bactérias constituem uma parte importante da sua flora, sendo *Leuconostoc lactis* uma das espécies de bactérias lácticas mais resistente ao longo da maturação, estando também presente, até ao final deste período, *Leuconostoc mesenteroides* (Macedo et al., 1995; Cogan et al., 1997). No queijo César de Cáceres foi isolado *Leuconostoc mesenteroides*, durante todo o período de maturação (Pouillet et al., 1993).

Por outro lado, nos queijos Teleme e Picante da Beira Baixa, os *Leuconostoc* foram detectados apenas no início da maturação, devido à sua sensibilidade ao elevado conteúdo de sal deste queijo, sendo as principais espécies *Leuconostoc lactis* e *Leuconostoc mesenteroides* (Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetakis, 1992; Freitas et al., 1996).

No caso presente, a espécie mais representativa foi *Leuconostoc lactis* detectando-se também duas estirpes que apresentaram um perfil intermédio entre *Leuconostoc lactis* e *Leuconostoc mesenteroides*.

O género *Weissella* é constituído por microrganismos Gram positivos, catalase negativos, de forma cocoide ou de bacilo pequeno, com extremidades arredondadas, simples, em pares ou formando pequenas cadeias, heterofermentativos, geralmente produtores de ácido DL-láctico (excepto *W. paramesenteroides* e *W. hellenica*, que produzem ácido D-láctico) com crescimento a 10°C mas não a 45°C (Collins et al., 1993).

Como foi referido na Parte I - Revisão Bibliográfica, o género *Weissella* foi recentemente criado e inclui *Leuconostoc paramesenteroides*, actualmente designado por *Weissella paramesenteroides*, e espécies relacionadas, ou

seja, os lactobacilos heterofermentativos atípicos *Lb. confusus*, *Lb. minor*, *Lb. kandleri*, *Lb. halotolerans* e *Lb. viridescens* (Collins et al., 1993).

A espécie predominante no queijo de Évora foi *W. paramesenteroides*, em ambas as fases de maturação, também frequente no queijo Teleme (Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetaki, 1992).

Os Quadros IV-7 e IV-8 mostram a frequência com que os vários géneros de bactérias lácticas provenientes de queijos com 3 e 45 dias de maturação, respectivamente, foram isolados a partir dos diferentes meios de cultura utilizados.

O género *Enterococcus* foi isolado a partir de todos os meios de cultura utilizados e em todas as condições de incubação, devido não só à sua abundância nas amostras analisadas, mas também pelo facto de nenhum destes meios se mostrar selectivo relativamente a estes microrganismos, tal como foi constatado por Poulet et al. (1993), Tornadijo et al. (1995) e López-Díaz et al. (2000).

O género *Lactobacillus* foi predominantemente isolado a partir do meio MRS, quer em condições de aerobiose quer em anaerobiose, embora também tenha sido frequente o seu isolamento a partir do meio APT, principalmente em amostras com 45 dias de maturação. De facto, este meio de cultura também é indicado para o isolamento de lactobacilos.

O género *Lactococcus*, proveniente das amostras com 3 dias de maturação, foi isolado a partir do meio M17, considerado o mais apropriado para o isolamento de bactérias pertencentes a este género (Tornadijo et al., 1995), enquanto que os outros três géneros também encontrados (*Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella*) se distribuíam pelos meios MRS, M17 e DTA. De salientar que o meio KA₃ se revelou o mais selectivo, uma vez que nele apenas foram identificados enterococos.

QUADRO IV-7 - Distribuição dos Diferentes Gêneros de Bactérias Lácticas Provenientes de Queijos com 3 dias de Maturação, pelos Diferentes Meios de Cultura Utilizados para o seu Isolamento.

| | <i>Enterococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Lactococcus</i> | <i>Pediococcus</i> | <i>Leuconostoc</i> | <i>Weissella</i> | NI | TOTAL |
|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|-----------|------------|
| MRS | 24 | 15 | | | | 1 | 2 | 40 |
| M17 | 10 | | 6 | 1 | | 1 | 2 | 20 |
| KA ₃ | 53 | | | | | | 14 | 67 |
| DTA | 47 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 6 | 62 |
| APT | 30 | 6 | | | | | 4 | 40 |
| MRS-A | 1 | 5 | | | | | 2 | 8 |
| M17-A | 1 | | 4 | | | 1 | 1 | 7 |
| KA ₃ -A | 7 | | | | | | 1 | 8 |
| APT-A | 5 | 1 | | | | | 1 | 7 |
| DTA-A | 4 | | 1 | | | | | 5 |
| DTA-F | 12 | 1 | | | 1 | | 2 | 16 |
| TOTAL | 194 | 30 | 13 | 3 | 3 | 4 | 33 | 280 |

MRS - de Man, Rogosa e Sharpe Agar; KA₃ - Kanamicina Esculina Azida de Sódio Agar; DTA - Dextrose Triptona Agar;

DTA -F - Dextrose Triptona Agar incubado a 10°C durante 7 dias.

O sufixo -A significa que os respectivos meios foram incubados em condições de anaerobiose.

NI - Não Identificadas

QUADRO IV-8 - Distribuição dos Diferentes Gêneros de Bactérias Lácticas Provenientes de Queijos com 45 dias de Maturação, pelos Diferentes Meios de Cultura Utilizados para o seu Isolamento.

| | <i>Enterococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Lactococcus</i> | <i>Pedfococcus</i> | <i>Leuconostoc</i> | <i>Weissella</i> | NI | TOTAL |
|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|-----------|------------|
| MRS | 29 | 14 | | | 2 | | 6 | 51 |
| M17 | 38 | 4 | 1 | | | 1 | 6 | 50 |
| KA ₃ | 31 | | | | | | 3 | 34 |
| DTA | 32 | 2 | | | 1 | | 3 | 38 |
| APT | 33 | 13 | | 1 | | | 8 | 55 |
| MRS-A | 6 | 2 | | | | | 1 | 9 |
| M17-A | 7 | 1 | 2 | | | | 2 | 12 |
| KA ₃ -A | 15 | | | | | | | 15 |
| APT-A | 4 | 1 | | | | | 2 | 7 |
| DTA-A | 9 | 1 | | 2 | | | | 12 |
| DTA-F | 6 | 1 | | 1 | | 2 | 3 | 14 |
| TOTAL | 210 | 39 | 3 | 4 | 4 | 3 | 34 | 297 |

MRS - de Man, Rogosa e Sharpe Agar; KA₃ - Kanamicina Esculina Azida de Sódio Agar; DTA - Dextrose Triptona Agar;

DTA-F - Dextrose Triptona Agar incubado a 10°C durante 7 dias.

O sufixo -A significa que foram incubadas em condições de anaerobiose;

NI - Não Identificadas

CONCLUSÕES:

Os resultados apresentados sugerem que os géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus*, representados por estirpes que revelam características próprias diferentes das estirpes referência e constituindo mais de 95% da flora láctica natural presente neste queijo, desempenham um papel relevante na sua maturação.

No género *Enterococcus* predomina a espécie *Enterococcus faecium*, embora a população de *Enterococcus faecalis* e o complexo *Enterococcus hirae/Enterococcus durans* também sejam importantes, especialmente no início da maturação do queijo. Em relação ao género *Lactobacillus*, que manifestou um ligeiro crescimento para o final da maturação, as espécies mais abundantes foram *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus casei*. Quanto ao género *Lactococcus*, mais numeroso no início da maturação do que no final deste período, quase todas as estirpes isoladas foram identificadas como sendo *Lactococcus lactis*.

Também presentes, mas com muito menor expressão foram detectadas as espécies *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc lactis* e *Weissella paramesenteroides*.

Assim, pode ser considerada a possibilidade de se constituírem culturas de arranque a partir de estirpes autóctones de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus casei* e *Lactococcus lactis* destinadas ao fabrico do queijo de Évora. A utilização destas culturas pode ser um meio de valorizar as suas características organolépticas e de tipicidade e promover a sua qualidade higiénica, assegurando a sua identidade.

Relativamente aos meios de cultura utilizados no isolamento das estirpes de bactérias lácticas, o meio KA₃ foi o que revelou maior selectividade. Além de ter evidenciado o crescimento de uma reduzida percentagem de bactérias

não lácticas, permitiu o isolamento de enterococos, exclusivamente. Aliás, estes microrganismos cresceram em todos os meios de cultura utilizados. Os meios MRS e APT revelaram uma selectividade moderada, permitindo ambos o crescimento de bactérias não lácticas, tendo também sido possível isolar a partir destes meios o maior número de enterococos e de lactobacilos. Quanto aos meios M17 e DTA foram os que se mostraram menos selectivos, ao permitir o desenvolvimento quer de uma percentagem elevada de bactérias não lácticas quer de quase todos os géneros de bactérias lácticas detectados. Contudo, foram os únicos que permitiram o crescimento de lactococos, sendo por isso úteis para esta finalidade.



CAPÍTULO V

VIABILIDADE DE AGENTES PATOGÉNICOS (*Listeria monocytogenes* Scott A e *Salmonella* Enteritidis) NO QUEIJO, AO LONGO DO PROCESSO DE MATURAÇÃO

INTRODUÇÃO:

Listeria monocytogenes e *Salmonella* spp., para além de *Escherichia coli* enteropatogénica, devido à sua larga disseminação no ambiente, têm sido classificados como microrganismos de alto risco para a indústria queijeira (Zottola e Smith, 1991; 1993).

A listeriose humana só foi considerada como uma doença de origem alimentar na década de 80. Apesar de o número de casos ser baixo, quando comparado com outras doenças de origem alimentar, esta doença, além de uma elevada taxa de mortalidade (cerca de 30%), tem consequências dramáticas sobre os indivíduos que constituem os grupos de risco (mulheres grávidas, crianças recém-nascidas e imunodeprimidos) (Ryser e Marth, 1989; Pearson e Marth, 1990; Farber e Peterkin, 1991; Schofield, 1992).

A listeriose humana, com incidência crescente na Europa, constitui actualmente uma preocupação de saúde pública mundial e *Listeria*

monocytogenes, seu agente etiológico, tem sido alvo de um interesse cada vez maior por parte das autoridades sanitárias e de cientistas de todo o mundo (Ryser e Marth, 1989; Pearson e Marth, 1990; Yousef e Marth, 1990; Farber e Peterkin, 1991).

Esta bactéria tem sido isolada de vários alimentos, como vegetais, carne, ovos, peixe, marisco e também do leite e derivados. Aliás, a listeriose de origem alimentar tem sido frequentemente associada ao consumo de produtos lácteos, sendo o queijo aquele em que *Listeria monocytogenes* foi isolada com maior frequência. Este produto, onde a bactéria pode atingir concentrações de 10^4 a 10^7 ufc/g, constitui um importante veículo de listeriose de origem alimentar (Pearson e Marth, 1990; Yousef e Marth, 1990; Farber e Peterkin, 1991; Guerra e Bernardo, 1999a).

Segundo Yousef e Marth (1990), a presença de *Listeria monocytogenes* é mais provável no queijo que noutros produtos lácteos, por várias razões: Por um lado, o queijo pode ser fabricado a partir de leite crú ou de leite submetido a tratamentos térmicos menos drásticos que a pasteurização, permitindo a sobrevivência do microrganismo. Por outro lado, mesmo que presente em pequeno número, *Listeria monocytogenes* é capaz de sobreviver por períodos prolongados, neste produto. Finalmente, algumas variedades de queijo, particularmente as curadas por bolores, podem suportar o crescimento do microrganismo durante a sua maturação e conservação.

Sendo um microrganismo ubiqüitário, a presença de *Listeria monocytogenes* no queijo pode ainda resultar de contaminações durante ou pós-fabrico. O maior perigo reside no facto de poder crescer activamente às temperaturas de refrigeração, em atmosferas com elevada humidade e baixa temperatura (Zottola e Smith, 1991; Schofield, 1992; Piccinin e Shelef, 1995).

O comportamento deste microrganismo durante o fabrico do queijo é variável, podendo ocorrer um decréscimo abrupto no início da maturação e a

sua total destruição, não sendo detectado no produto final, ou um decréscimo gradual, menos acentuado. Noutras situações pode verificar-se uma estabilização ou mesmo um aumento apreciável do número de microrganismos no produto (Zottola e Smith, 1991; Spahr e Url, 1994).

Nalguns queijos, a presença de *Listeria monocytogenes* revela que este microrganismo pode sobreviver ultrapassando os mínimos de 60 dias a temperaturas superiores ou iguais a 1,7°C, propostos para a maturação de queijos feitos com leite cru ou tratado termicamente (Ryser e Marth, 1989; Buazzi et al., 1992a, Ryser, 1998).

Tem-se afirmado que se *Listeria monocytogenes* estiver presente no leite utilizado no fabrico do queijo, o seu crescimento, embora não seja completamente reprimido, pode ser retardado pelas culturas de arranque, em consequência, essencialmente da produção de substâncias inibitórias, como os ácidos orgânicos, o peróxido de hidrogénio e as bacteriocinas (Farber e Peterkin, 1991; Zottola e Smith, 1991).

Por outro lado, as características do produto, nomeadamente pH, teor de humidade, concentração de ácidos e sal e a_w são também factores que influenciam a viabilidade de *Listeria monocytogenes*, verificando-se que nos queijos de pastas mole e semi-mole pode haver crescimento de *Listeria monocytogenes* até níveis que constituem uma ameaça potencial para a saúde dos consumidores (Ryser e Marth, 1989).

Em Portugal, em leites de ovelha cru (n=102), a frequência de isolamento de *Listeria monocytogenes* foi de 2% (Guerra e Bernardo, 1999a).

Em vários queijos portugueses de pasta mole, entre eles o Queijo Fresco, o Queijo de Azeitão, o Queijo Serra da Estrela, o Queijo das Serras do Rabaçal, o Queijo Castelo Branco, Queijo “tipo Camembert” e o Queijo “tipo Pur-Chèvre”, num total de 65 amostras, foi isolada *Listeria monocytogenes* em 17 amostras, representando um total de 26,2%. O queijo Serra da Estrela

foi o que demonstrou maior número de resultados positivos (12 em 15) o que corresponde a 70,5% de amostras positivas nesta variedade. Em queijo Castelo Branco e no queijo “tipo Pur-Chèvre” em 8 amostras pesquisadas duas eram positivas e em queijo “Tipo Camembert” apenas 1 em 9 amostras analisadas era positiva (Santos et al., 1994/95).

Nos queijos alentejanos (n=68), em 11,8% das amostras foi detectada *Listeria monocytogenes*. Entre os fabricados com leite de ovelha crú (n=24) e leite de mistura de ovelha e cabra (n=40), 16,7% e 10%, respectivamente, demonstraram a presença de *Listeria monocytogenes*. Este microrganismo não foi detectado em queijos de pasta dura nem semi-mole mas 15,4% dos queijos de pasta semi-dura (n=52) estavam contaminados. Nos queijos curados (n=25) observou-se uma percentagem de contaminação de 16%, enquanto que nos de meia-cura (n=43) este valor era de 9,3% (Guerra e Bernardo, 1999b).

Também *Salmonella* spp. tem estado implicada nalguns surtos de infecção com origem no consumo de produtos lácteos, entre eles o queijo (El-Gazzar e Marth, 1992; Maipa et al., 1993; Papadopoulou et al., 1993; Vlaemyck, 1994; Ziprin, 1994).

Uma das razões atribuídas ao aumento da incidência de salmonelose no Mundo relaciona-se com o hábito crescente de consumir produtos crus ou insuficientemente cozinhados, pelo que o consumo de queijo fabricado com leite crú pode representar um perigo para a saúde (Vlaemyck, 1994).

A salmonelose humana pode manifestar-se de uma forma relativamente benigna, com perturbações gastrointestinais ou como uma doença mais grave (febres tifóide e paratifóide), com septicémia, por vezes responsável por infecções tissulares localizadas que causam sérias sequelas e podem mesmo conduzir à morte. A gravidade da doença depende de vários factores ligados não só à susceptibilidade individual mas também ao agente etiológico (El-Gazzar e Marth, 1992; Ziprin, 1994; Ryser, 1998).

Em Portugal, segundo dados da Direcção-Geral de Saúde (2000), entre os anos 1994 e 1998 foram detectados 1118 casos de salmoneloses, que não as febres tifóide e paratifóide, atingindo, especialmente, crianças até aos 14 anos (695 casos) e ocorrendo o maior número (339 casos) no ano de 1998. No entanto, dada a natureza auto-limitante da doença, é provável que menos de 10% dos casos sejam registados e, portanto, estes dados subestimem a dimensão da doença (Ziprin, 1994).

Tal como acontece com outros microrganismos patogénicos, as populações de *Salmonella* spp. presentes no leite também aumentam durante a manufactura do queijo. Mas durante o período de maturação, estas populações decrescem, sendo o seu declínio mais lento a temperaturas mais baixas e não se observando crescimento à superfície e nem no interior do queijo (Sparh e Url, 1994).

No entanto, como se observou em relação a *Listeria monocytogenes*, nalgumas variedades de queijo, *Salmonella* spp. é capaz de se manter viável por um período superior a 60 dias a temperaturas superiores a 1,7°C, pelo que nem sempre a maturação garante a inocuidade do produto (El-Gazzar e Marth, 1992).

Como tem sido demonstrado em relação a outros microrganismos, também o comportamento de *Salmonella* spp. nos produtos alimentares é influenciado pelas características intrínsecas do produto, nomeadamente composição química, pH, teor de humidade, bem como pelos factores extrínsecos a que está sujeito. Igualmente, a comunidade microbiana presente nestes produtos, designadamente a população de bactérias lácticas, pode desempenhar um importante papel no controlo da viabilidade destes microrganismos no alimento, através da produção de substâncias capazes de inibir o crescimento desta bactéria (Motlagh et al., 1991; El-Gazzar e Marth, 1992; Jay, 1992; Abdalla et al., 1993; González et al., 1993; Radford e Board, 1995).

A presença de *Salmonella* Enteritidis nos alimentos tem repercussões importantes na saúde pública, uma vez que é uma das serovariedades mais virulentas para o Homem e um dos agentes etiológicos mais frequentes da gastroenterite humana. Por outro lado, os indivíduos atingidos podem manter-se como excretores durante um período de tempo mais ou menos prolongado, constituindo uma fonte de disseminação do microrganismo (Burguess et al., 1994; Ziprin, 1994; Glebel e Corbion, 1995).

Tem sido feitos estudos sobre o comportamento de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* Enteritidis durante o fabrico de diversos queijos como Cheddar (Ryser e Marth, 1987), Parmesão (Yousef e Marth, 1990), Suíço (Buazzi et al., 1992a), Emmental e Tilsit (Bachmann e Spahr, 1995); Mozzarella (Zottola e Smith, 1991; Buazzi et al., 1992b), Brick e Limburger (Ryser e Marth, 1989), Feta (Maipa et al., 1993; Papadopoulou et al., 1993), mas não é do nosso conhecimento que estudos semelhantes tenham contemplado o queijo artesanal produzido na região de Évora, apesar de Guerra (1995) ter pesquisado a presença de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* spp., entre outros microrganismos, neste queijo, ao longo do processo de fabrico.

Assim, foi objectivo deste estudo, apreciar a evolução de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* Enteritidis presentes no queijo artesanal produzido na região de Évora, ao longo do seu período de maturação.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Prepararam-se suspensões com cerca de 10^8 bactérias/ml de *Listeria monocytogenes* Scott A e de *Salmonella* Enteritidis em Solução de Ringer a $\frac{1}{4}$ (Oxoid). (Anexo I).

De um total de 24 coalhadas fabricadas a partir da mesma matéria-prima, 21 foram inoculadas, imediatamente a seguir à moldagem, com 1 ml de suspensão bacteriana, e 3 não o foram, servindo de testemunha.

A inoculação das coalhadas foi feita em cinco locais diferentes e a profundidades também diferentes, com o intuito de disseminar o inóculo pela sua massa.

Foram recolhidas amostras de coalhadas não inoculadas e inoculadas com a suspensão bacteriana, em triplicado. As restantes 18 coalhadas inoculadas foram submetidas a um período de maturação de 60 dias, seguindo os procedimentos utilizados no fabrico deste queijo e foram recolhidas, em triplicado, aos 3, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação.

Todas as amostras foram transportadas para o laboratório imediatamente após colheita, sob refrigeração e processadas em seguida.

Foi feita a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* Enteritidis no interior da massa das coalhadas não inoculadas, eliminando a parte superficial e recolhendo a amostra a partir da massa interior misturada.

Para *Listeria monocytogenes* retiraram-se 25 g da massa da coalhada que se homogeneizaram com 225 ml de Caldo de Enriquecimento Selectivo adicionado de Suplemento de Enriquecimento Selectivo *Listeria* (Oxoid). (Anexo I). Após 24 e 48 horas e 7 dias de incubação a 30°C, inocularam-se, por esgotamento à superfície, em triplicado para cada uma das diluições, 1ml e 0,1 ml em *Listeria* Selective Agar suplementado com *Listeria* Selective Enrichment Supplement. (Anexo I). O período de incubação foi de 48 horas a 30°C.

No caso de *Salmonella* Enteritidis foram homogeneizados 25 g de massa da coalhada em 225 ml de Água Peptonada (Oxoid). Após incubação de 24 horas a 37°C, inocularam-se 10 ml da cultura em 90 ml de Caldo de Selenite

Cistina (Difco) e incubaram-se a 37°C, durante 18 horas. Foi feita a sementeira por esgotamento à superfície, em triplicado, em Hektoen Enteric Agar (Oxoid) e em Verde Brilhante Agar (Difco) que foram submetidos a incubação de 24 horas a 37°C. (Anexo I).

Nas coalhadas e nos queijos inoculados com as suspensões bacterianas anteriormente referidas, não foram feitos os enriquecimentos das culturas. A preparação da amostra foi semelhante à das coalhadas não inoculadas (retirando a parte superficial e misturando a massa a partir da qual se colhe a amostra).

Para a contagem de *Listeria monocytogenes* retiraram-se 25 g da massa do queijo que foram homogeneizados com 225 ml de Solução de Ringer a ¼. A partir desta solução fizeram-se diluições decimais sucessivas, também em Solução de Ringer a ¼, até à diluição considerada conveniente para a contagem dos microrganismos previamente inoculados.

A sementeira foi feita por esgotamento à superfície, em triplicado, de cada um das três diluições consecutivas escolhidas, em meio de Listeria Selective Agar adicionado de Listeria Selective Supplement (Oxoid). (Anexo I). A incubação foi feita a 30°C, por um período de 24 horas.

Das placas de uma das diluições de cada amostra foram seleccionadas cerca de 10% (quando as contagens eram inferiores a 100 ufc por placa) ou 5% (quando as contagens eram superiores a 100 ufc por placa) das colónias suspeitas de serem *Listeria monocytogenes* (colónias pretas) e foram feitas as provas da catalase e da oxidase e esfregaço corado por Gram. Às colónias que revelassem ser catalase positivas, oxidase negativas e cocobacilos Gram+ era feita a confirmação através da galeria bioquímica API Listeria (bioMérieux).

Para a contagem de *Salmonella* Enteritidis retiraram-se 25 g da massa do queijo que foram homogeneizados com 225 ml de Solução de Ringer a ¼. A

partir desta solução fizeram-se diluições decimais sucessivas, também em Solução de Ringer a $\frac{1}{4}$, até à diluição considerada conveniente para a contagem dos microrganismos previamente inoculados.

A sementeira foi feita, em triplicado, por esgotamento à superfície, a partir de cada um das diluições consecutivas escolhidas, em meio de Hektoen Enteric Agar (Oxoid). A incubação foi feita a 37°C, por um período de 24 horas.

Das placas de uma das diluições de cada amostra foram seleccionadas cerca de 10% (quando as contagens eram inferiores a 100 ufc por placa) ou 5% (quando as contagens eram superiores a 100 ufc por placa) das colónias suspeitas de serem *Salmonella* spp. (colónias azul esverdeadas com ou sem centro preto) e foram semeadas por picada e estria em Kligler Iron Agar (Difco) e em Lysine Iron Agar (Difco) e incubadas durante 24 horas a 37°C. A confirmação de *Salmonella* spp. foi feita através da galeria bioquímica API 20E (bioMérieux) e a confirmação de *Salmonella* Enteritidis foi feita por serotipificação a 12 estirpes de *Salmonella* spp., escolhidas casualmente, entre *Salmonella* spp. isoladas.

Em cada uma das amostras inoculadas foi também feita a contagem de bactérias lácticas, por sementeira por incorporação, em triplicado, de três diluições sucessivas em MRS Agar (de Man, Rogosa e Sharpe) (Oxoid), incubado a 30°C durante 48 horas. (Anexo I).

O número de ufc/g de produto foi calculado multiplicando a média das contagens numa diluição pelo inverso dessa diluição.

O pH da massa do queijo misturada e moída à mão, foi medido através de potenciómetro WTW pH530.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A maioria dos trabalhos realizados sobre o comportamento de microrganismos potencialmente patogénicos ao longo do período de maturação do queijo, avaliando diferentes parâmetros e estádios de fabrico das diversas variedades e utilizando estirpes bacterianas distintas, fornece resultados nem sempre fáceis de comparar. A metodologia mais frequentemente utilizada para estes estudos baseia-se na inoculação artificial das estirpes a estudar em leite previamente pasteurizado, de modo a evitar a interferência dos possíveis efeitos da flora normal presente na matéria-prima (Spahr e Url, 1994).

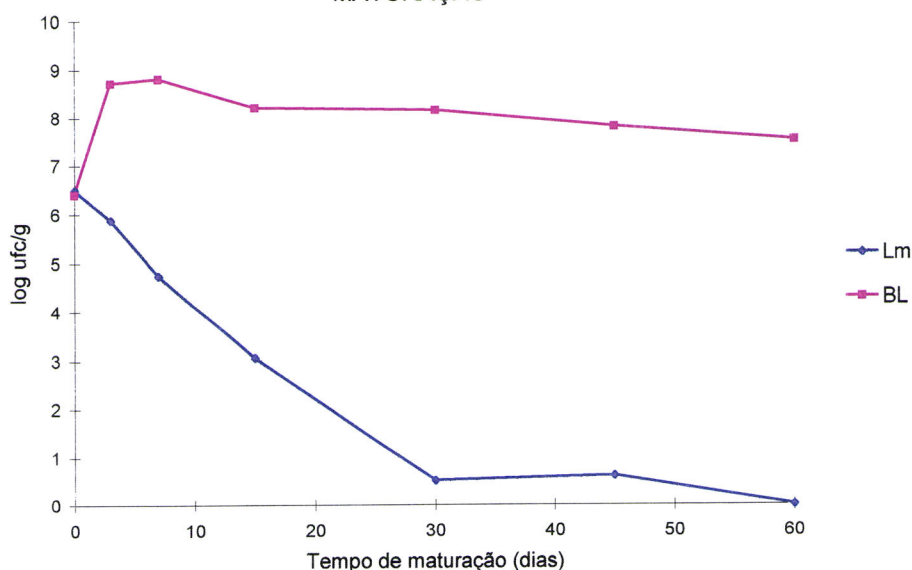
Por razões ligadas à disponibilidade de recursos no momento da realização deste trabalho e dado que seriam manipuladas estirpes que apresentavam riscos para a saúde humana, optámos por executá-lo inoculando as coalhadas artificialmente e evitando o processamento de leite contaminado para o fabrico dos queijos a analisar. Esta opção permitiu-nos apreciar o comportamento destes microrganismos, caso a contaminação ocorra nesta fase do fabrico do produto.

Pelas mesmas razões apontadas, apenas foi possível utilizar um número reduzido de amostras pelo que os dados obtidos devem ser encarados como indicadores do comportamento provável das espécies inoculadas, ao longo do período de maturação do queijo produzido na região de Évora.

Nas amostras de coalhada não inoculadas não foram detectadas unidades formadoras de colónias de *Listeria monocytogenes* nem de *Salmonella* Enteritidis, tal como se verificou num estudo prévio feito sobre o queijo produzido na região de Évora (Guerra, 1995).

O Gráfico V-1 representa o comportamento de *Listeria monocytogenes* e das bactérias lácticas presentes nos queijos analisados, ao longo da maturação.

GRÁFICO V-1 - EVOLUÇÃO DE *Listeria monocytogenes* (Lm) E DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS (BL) PRESENTES NO QUEIJO DURANTE A MATURAÇÃO



As contagens efectuadas nas coalhadas inoculadas com *Listeria monocytogenes* foram de $6,5 \pm 0,42$ log ufc/grama. Este valor é próximo do número de microrganismos inoculado, uma vez que o peso médio das coalhadas era de cerca de 200 gramas.

A partir desta fase de maturação, a população de *Listeria monocytogenes* decresceu ao longo do período de maturação, sendo detectada em valores reduzidos a partir dos 30 ou dos 45 dias de maturação. De facto, *Listeria monocytogenes* foi apenas detectada numa amostra, atingindo valores de 1,5 e 1,8 log ufc/g, sendo negativas as restantes amostras. Aos 60 dias de maturação o microrganismo não foi isolado do produto. (Gráfico V-1).

As bactérias lácticas presentes nestes queijos constituem uma população abundante, atingindo contagens máximas da ordem de 8 a 9 log ufc/g aos sete dias de maturação e decrescendo lentamente até ao final, mantendo, no entanto, valores elevados (Gráfico V-1).

Os valores médios de pH observados, descritos no Quadro V-1, variaram entre 5,92 e 5,30. Os valores mais elevados foram medidos nas coalhadas e os valores mínimos foram atingidos aos 3 ou aos 7 dias de maturação. A partir desta fase verificou-se um ligeiro aumento até ao final da maturação.

QUADRO V-1 - Valores Médios de pH Medidos, ao Longo da Maturação, nas Amostras de Coalhada e Queijo Inoculadas com *Listeria monocytogenes*.

| PRODUTO | pH |
|----------------|------|
| Coalhada | 5,92 |
| Queijo 3 dias | 5,30 |
| Queijo 7 dias | 5,31 |
| Queijo 15 dias | 5,53 |
| Queijo 30 dias | 5,61 |
| Queijo 45 dias | 5,63 |
| Queijo 60 dias | 5,60 |

O comportamento de *Listeria monocytogenes* nas diferentes variedades de queijo está relacionado com diversos factores. Para além de depender da estirpe considerada, a tecnologia de fabrico, as características do produto, nomeadamente pH, teor de humidade, concentração de ácidos orgânicos e/ou gordos, concentração de sal e actividade da água, as condições ambientais a que se encontra exposto como a temperatura e a humidade, e, finalmente, as interações biológicas que se estabelecem no produto, constituem factores determinantes da presença desta bactéria no produto final.

Assim, quando contaminante da matéria-prima, a população de *Listeria monocytogenes* é destruída, pelo menos parcialmente, pelas elevadas temperaturas utilizadas no fabrico das coalhadas dos queijos Parmesão e Emmental. Dadas as características intrínsecas destes produtos, posteriormente, esta população não encontra condições favoráveis à recuperação das células danificadas. É, portanto, eliminada durante a

maturação (Yousef e Marth, 1990; Buazzi et al., 1992a; Bachmann e Spahr, 1995).

As condições físico-químicas que caracterizam os queijos Parmesão e Emmental, não são muito favoráveis ao crescimento de *Listeria monocytogenes*. São produtos com teores de humidade baixos (inferiores a 32 e 41%, respectivamente) e com valores de pH levemente ácidos (5,0-5,1 e 5,2-5,4, respectivamente) (Yousef e Marth, 1990; Buazzi et al., 1992a). Apesar de ser um microrganismo capaz de crescer num largo espectro de condições culturais, não sendo estes parâmetros, por si sós, limitantes do seu crescimento, muito provavelmente a conjugação dos seus efeitos associada ao efeito das elevadas temperaturas de maturação (10-20°C) e ao efeito inibitório desempenhado pelas bactérias lácticas contribuem para a inactivação de *Listeria monocytogenes* nestas variedades (Yousef e Marth, 1990; Buazzi et al., 1992a).

No queijo Mozzarella esta bactéria também é destruída durante a fase de alongamento que decorre entre 58 e 65°C, permanecendo a pasta, pelo menos, durante 2 minutos a 65°C (Buazzi et al., 1992b).

Mas *Listeria monocytogenes* tem capacidade de sobreviver nalgumas variedades de queijo. Nos queijos Azul e Cheddar, apesar das suas populações decrescerem ao longo da maturação, ainda podem ser detectadas no final deste período (Schaffer et al., 1995). Estes autores verificaram que, apesar dos valores de pH, em determinada fase de maturação do queijo Azul (pH 6,8), permitir o crescimento desta bactéria, a sua população é reduzida devido aos efeitos exercidos pelas elevadas concentrações de ácidos gordos livres e de sal presentes no produto.

Como está largamente documentado e foi referido na Parte I - Revisão Bibliográfica, as bactérias lácticas desenvolvem frequentemente actividades antagonistas, relativamente a *Listeria monocytogenes*, quer através dos produtos de fermentação (ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio, diacetil)

e de outros metabolitos, como as bacteriocinas, quer causando o esgotamento de nutrientes em consequência da sua rápida multiplicação, reconhecendo-se que estes mecanismos antagónicos causam a redução de *Listeria monocytogenes*, mas podem não a eliminar completamente dos produtos alimentares.

Também se tem considerado que os efeitos combinados do pH, dos produtos de fermentação e dos metabolitos das bactérias lácticas, do conteúdo de sal, da a_w e das temperaturas de maturação são prejudiciais à sobrevivência de *Listeria monocytogenes* no queijo, contribuindo para a redução da sua população durante a maturação deste produto (Yousef e Marth, 1990; Buazzi et al., 1992a; Spahr e Url, 1994; Bachmann e Spahr, 1995).

Assim, a redução acentuada de *Listeria monocytogenes* observada nos queijos testados, pode ficar a dever-se a uma multiplicidade de factores, tal como se verifica noutras variedades.

O crescimento de *Listeria monocytogenes* no queijo cessa quando o pH atinge valores inferiores a 5,0, causando um decréscimo acentuado na sua população durante a maturação e verifica-se um crescimento acentuado com valores de pH superiores a 5,75 ou 5,5, quando não são adicionadas culturas de arranque durante a manufactura (Papageorgiou et al., 1996).

O decréscimo de pH verificado nos primeiros dias de maturação do queijo produzido em Évora, atingindo valores da ordem dos 5,3, pode ter contribuído para o declínio da população de *Listeria monocytogenes* Scott A, que manifestou uma redução de cerca de 1,7 unidades logarítmicas na primeira semana.

As populações de bactérias lácticas, que se mantiveram numerosas durante todo o período de maturação, podem ter desempenhado um papel decisivo no decréscimo de *Listeria monocytogenes*, através da actividade antagonista que desenvolvem, uma vez que a produção normal de ácido láctico pelas

culturas lácticas é considerado como um passo importante na prevenção do crescimento de várias bactérias patogénicas, nos estadios iniciais do fabrico do queijo (Spahr e Uri, 1994). Neste caso, uma redução do pH de cerca de 0,6 unidades, para valores de 5,3, pode ter sido decisiva na redução da população de *Listeria monocytogenes*. No entanto, uma vez que o crescimento de *Listeria monocytogenes* está significativamente correlacionado com os valores de pH superiores a 5,5, a falha na produção de ácido pelas culturas de arranque e a subida do pH durante a maturação podem levar ao crescimento das bactérias sobreviventes (Genigeorgis et al., 1991).

Mas também outras características físico-químicas do produto, nomeadamente o teor de humidade de cerca de 30% e 19%, aos 30 e aos 60 dias de maturação, respectivamente (Pinheiro et al., 1993; Pinheiro et al., 1998a) e o teor de sal, de cerca de 9% e 16%, aos 30 e aos 60 dias de maturação, respectivamente (Pinheiro et al., 1998a) não são muito favoráveis à proliferação de vários microrganismos, entre eles, *Listeria monocytogenes*, desempenhando um papel importante na sua eliminação, mesmo que os valores de pH permitam o seu crescimento.

A inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* no queijo Cheddar é atribuída ao efeito das elevadas concentrações de ácidos gordos libertados pela lipólise durante a maturação, associado ao efeito do pH, concentração de sal e temperatura de maturação, e foi demonstrado que os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e linoleico (C18:2) desempenham uma forte actividade inibitória sobre esta bactéria (Schaffer et al., 1995).

Petrone et al. (1998) demonstraram o efeito dos ácidos gordos sobre *Listeria monocytogenes*. A presença de ácidos gordos insaturados de cadeia longa e de ácidos gordos de cadeia média, nomeadamente linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3), e caprílico (C8:0), cáprico (C10:0) e láurico (C12:0), respectivamente, inibiu o crescimento de *Listeria monocytogenes*, sendo esta inibição completa e mais acentuada a pH 5 que a pH 7.

As concentrações de ácidos gordos livres observadas no queijo produzido em Évora, nomeadamente caprílico (C8:0), cáprico (C10:0) e láurico (C12:0), atingindo concentrações médias de 62,43µg/g, 115,59µg/g e 34,37µg/g, respectivamente (Pinheiro et al., 1998b), podem ser também efectivas para, em sinergia com outros factores inibitórios, impedir o crescimento de *Listeria monocytogenes* Scott A e determinar a sua redução ao longo do período de maturação.

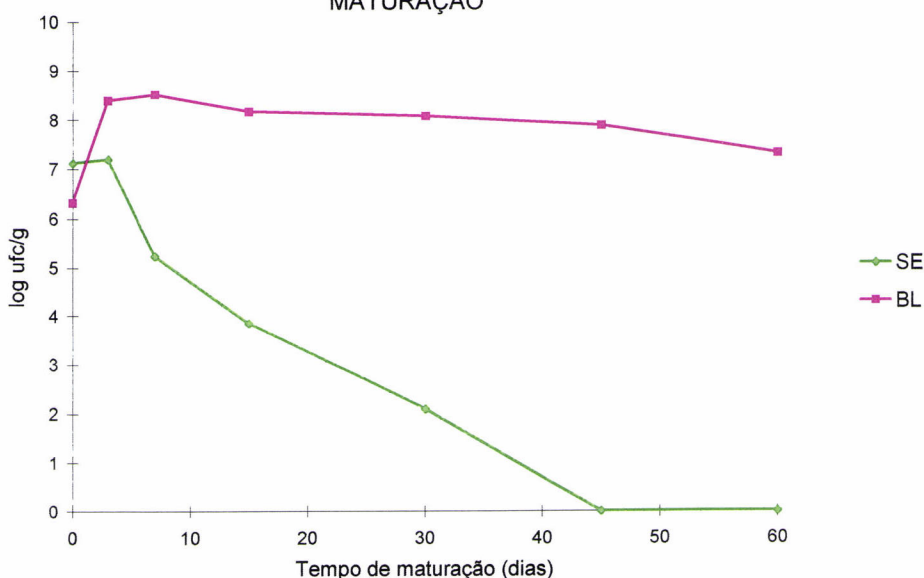
As elevadas temperaturas ambientais sob as quais decorreu a maturação constituem outro factor limitante do crescimento de *Listeria monocytogenes*. Neste caso, em que a maturação decorreu nos meses de Junho e Julho, as elevadas temperaturas ambientais (temperatura média do ar de 23,7 e 25,6°C; temperatura máxima de 34,5 e 37,8°C; temperatura mínima de 13 e 14°C, nos meses de Junho e Julho, respectivamente) e os baixos teores de humidade relativa (50,4% e 46,9%, nos meses de Junho e Julho, respectivamente) podem ter exercido uma acção importante na redução da população de *Listeria monocytogenes* Scott A nestes queijos.

O Gráfico V-2 representa o comportamento de *Salmonella* Enteritidis e das bactérias lácticas presentes nos queijos analisados, ao longo da maturação.

As contagens efectuadas nas coalhadas inoculadas com *Salmonella* Enteritidis foram de $7,13 \pm 0,3$ log ufc/g. Tal como foi observado para *Listeria monocytogenes* este valor está de acordo com o número de microrganismos inoculado nas coalhadas (cerca de 6,70 log ufc/g).

Apesar de se ter verificado um ligeiro aumento (cerca de 0,07 log ufc/g) nas contagens microbianas até aos 3 dias de maturação, *Salmonella* Enteritidis decresceu até aos 45 dias, não sendo detectada a partir desta fase até ao final do período de maturação, em todas as amostras analisadas.

GRÁFICO V-2 - EVOLUÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis (SE) E DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS (BL) PRESENTES NO QUEIJO DURANTE A MATURAÇÃO



As bactérias lácticas presentes nestes queijos revelaram novamente uma população numerosa, que atingiu os seus valores máximos aos 7 dias de maturação e decrescendo suavemente até ao final desse período.

Os valores médios de pH observados nas amostras de coalhadas e queijos inoculados com *Salmonella* Enteritidis, descritos no Quadro V-2, variaram entre 5,9 e 5,16. Também neste caso os valores mais elevados foram observados nas coalhadas e os valores mais baixos foram atingidos aos 7 dias de maturação, aumentando, até ao final da maturação, cerca de 0,33 unidades.

Alguns autores estudaram o comportamento de *Salmonella* spp. ao longo do fabrico de diversas variedades de queijo. Tal como acontece com *Listeria monocytogenes*, também *Salmonella* spp. pode ser eliminada por alguns dos procedimentos utilizados durante a manufactura de algumas variedades como é o caso dos queijos Emmental, Mozzarella e Cottage (Zottola e Smith, 1991; El-Gazzar e Marth, 1992; Bachmann e Spahr, 1995).

QUADRO V-2 - Valores Médios de pH Medidos, ao Longo da Maturação nas Amostras de Coalhada e Queijo Inoculadas com *Salmonella* Enteritidis.

| PRODUTO | pH |
|----------------|------|
| Coalhada | 5,90 |
| Queijo 3 dias | 5,29 |
| Queijo 7 dias | 5,16 |
| Queijo 15 dias | 5,49 |
| Queijo 30 dias | 5,54 |
| Queijo 45 dias | 5,55 |
| Queijo 60 dias | 5,49 |

No entanto, esta bactéria pode sobreviver por períodos mais prolongados noutras variedades como nos queijos Cheddar, Tilsit, Feta e Domiati (El-Gazzar e Marth, 1992; Maipa et al., 1993; Papadopoulou et al., 1993; Bachmann e Spahr, 1995).

A sobrevivência de *Salmonella* spp. nestes queijos está principalmente relacionada com as condições ambientais que se vão estabelecendo no produto. Além de serem significativos para o seu declínio, o teor de humidade, o pH e o teor de sal, também foi atribuída grande importância à produção rápida de ácido, por uma cultura de arranque eficaz, de modo a que sejam atingidas concentrações de ácidos que inibam o crescimento desta bactéria (El-Gazzar e Marth, 1992; Vlaemynck, 1994; Bachmann e Spahr, 1995).

Assim, no caso presente, pensamos que o decréscimo acentuado de pH de cerca de 0,74 unidades observado até aos 7 dias de maturação foi importante para causar um declínio na população de *Salmonella* Enteritidis que, até esta fase, evidenciou o maior decréscimo (cerca de 1,89 log ufc/g). Apesar de *Salmonella* spp. poder sobreviver com os valores de pH encontrados neste queijo (cerca de 5,4), uma variação de mais de 0,2 unidades revela-se significativa para as populações de enterobactérias e, provavelmente também para *Salmonella* Enteritidis (Gaya et al., 1983, citados por Nuñez et al., 1985).

Por outro lado, os valores de pH atingidos no queijo são críticos para o crescimento de *Salmonella* spp., caso o agente acidificante seja o ácido acético (Papadopoulou et al., 1993). Este ácido, bem como os ácidos propiónico e butírico, são componentes voláteis importantes neste produto (Pinheiro et al, 1998b).

Além disso, ao longo do período de maturação as características físico-químicas desta variedade de queijo, nomeadamente teor de humidade, concentração de sal e concentração de certos ácidos gordos, atingindo os valores referidos anteriormente, em nada facilitam o crescimento ou a sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis. Esta bactéria não sobrevive a concentrações elevadas de NaCl (Papadopoulou et al., 1993) e, uma vez que são atingidas concentrações superiores a 10% no final da maturação é pouco provável que *Salmonella* Enteritidis seja detectada no queijo produzido na região de Évora.

Apesar de o teor em gordura do produto poder exercer um efeito protector sobre *Salmonella* spp., tendo-se verificado que o declínio destas bactérias era mais acentuado no queijo com menor teor de gordura (Mehta e Tatini; 1994), também se observou que as concentrações mais elevadas de ácidos gordos determinaram um decréscimo mais rápido de *Salmonella* spp. no queijo Cheddar (Schaffer et al., 1995).

Por outro lado, o tipo de ácidos gordos desempenha um papel importante na redução de *Salmonella* spp., durante a maturação. Assim, foi demonstrado que alguns ácidos gordos, nomeadamente os ácidos gordos de cadeia média e os ácidos oleico e linoleico também tinham capacidade inibitória em relação a *Salmonella* spp. (Schaffer et al., 1995).

Estes ácidos gordos, presentes em concentrações elevadas no final da maturação do queijo produzido em Évora, provavelmente também contribuíram para o rápido declínio da bactéria neste produto.

CONCLUSÕES:

Nas condições em que decorreu este trabalho, a observação de resultados negativos em relação à presença de *Listeria monocytogenes* pode não significar a inocuidade do produto, relativamente a este microrganismo. Pretendendo quantificar a sua população, não utilizámos qualquer método de enriquecimento que pudesse facilitar o crescimento de microrganismos danificados pelas condições de *stress* ambiental a que estiveram submetidos, durante o processo fermentativo.

A detecção, por esta metodologia, de 1,82 log ufc/g de *Listeria monocytogenes*, numa das amostras, no final da maturação, pode indicar que, apesar desta população sofrer uma redução significativa, durante a maturação, pode não ser completamente eliminada. No entanto, dadas as características físico-químicas deste produto, é pouco provável que *Listeria monocytogenes*, presente durante a maturação, seja capaz de atingir valores suficientemente elevados para constituir uma ameaça para a saúde pública, assumindo que a dose infecciosa é de 10^3 células por grama de produto para os indivíduos que fazem parte dos grupos de risco (Ryser, 1998).

Assim, estes indivíduos devem ser alertados para os perigos do consumo deste tipo de produtos, até porque o microrganismo também pode estar presente em consequência de contaminações várias, incluindo as que sucedem pós-maturação.

Em relação a *Salmonella* Enteritidis, também admitimos que o facto de não ter sido feita a pesquisa desta bactéria após um período prévio de enriquecimento pode conduzir a falsos resultados negativos, nos queijos obtidos a partir das coalhadas inoculadas. No entanto, dadas as características físico-químicas do produto bem como a dimensão da população láctica presente até ao final do período de maturação, também parece pouco provável que *Salmonella* Enteritidis sobreviva em condições tão hostis.

As características deste queijo, nomeadamente o baixo teor de humidade, a elevada concentração de NaCl e uma intensa lipólise, associados a uma população láctica numerosa, contribuem, provavelmente, para o declínio acentuado das populações de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* Enteritidis durante a maturação do queijo artesanal produzido em Évora.

Parece-nos, portanto, que este produto, se fabricado sob condições higiénicas e não estando sujeito a fortes contaminações durante o seu fabrico pode ser considerado como um produto seguro em relação a estes dois microrganismos.

CAPÍTULO VI

INIBIÇÃO DE *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis POR BACTÉRIAS LÁCTICAS

INTRODUÇÃO:

Em trabalho anterior verificámos que *Listeria monocytogenes* Scott A e *Salmonella* Enteritidis inoculadas na coalhada destinada ao fabrico de queijo não eram detectadas no final da maturação.

As modificações das condições ambientais que se sucedem no queijo, à medida que a maturação progride, principalmente a diminuição do teor de humidade e o aumento da concentração de NaCl e de ácidos gordos livres, contribuem para a inibição do crescimento de vários microrganismos entre os quais se encontram alguns microrganismos patogénicos ou potencialmente patogénicos. Adicionalmente, as bactérias lácticas, através da sua actividade metabólica, desenvolvem uma acção antagonista também importante no controlo das várias populações microbianas presentes no produto.

Esta acção protagonizada pelas bactérias lácticas resulta não só da sua capacidade competitiva por nutrientes essenciais, mas também da produção de vários produtos, como os ácidos orgânicos, o peróxido de hidrogénio, o

etanol, o diacetil, as bacteriocinas e outras substâncias não identificadas provenientes da sua actividade metabólica.

Estes produtos, que por vezes são produzidos em quantidades muito reduzidas para desenvolverem, isoladamente, uma acção inibitória, podem actuar em sinergia, dificultando o crescimento de alguns microrganismos (Davidson e Hoover, 1993; Choisy et al., 1997b).

Listeria monocytogenes e *Salmonella* Enteritidis são microrganismos cuja presença nos alimentos e, particularmente no queijo, é indesejável, dadas as consequências nefastas que têm na saúde dos consumidores e que foram já referidas anteriormente.

Foi objectivo deste estudo verificar quais as formas de antagonismo evidenciadas por algumas estirpes de bactérias lácticas, previamente isoladas de queijo produzido na região de Évora, em relação a *Listeria monocytogenes* Scott A e a *Salmonella* Enteritidis.

MATERIAIS E MÉTODOS:

DETERMINAÇÃO DAS ESTIRPES PRODUTORAS DE SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS (INIBIGRAMAS DE SELECÇÃO).

Foram escolhidas cinquenta e cinco estirpes de bactérias lácticas isoladas de queijo de Évora, previamente identificadas presumptivamente como sendo *Enterococcus faecium* (27), *Enterococcus faecalis* (7), *Enterococcus hirae/Enterococcus durans* (8), *Lactococcus lactis* (2), *Pediococcus pentosaceus* (2), *Leuconostoc lactis* (3) e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (3) e *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (3), como potenciais produtoras de substâncias inibidoras de *Listeria monocytogenes* Scott A e de *Salmonella* Enteritidis que foram utilizadas como estirpes indicadoras.

As estirpes de bactérias lácticas escolhidas foram semeadas em MRS Agar (de Man, Rogosa e Sharpe) (Oxoid) (Anexo I) após descongelação, e incubadas a 30°C durante 18 horas.

As estirpes indicadoras foram semeadas por incorporação, em duplicado, em Tryptone-Soya Broth (Oxoid) com 0,6% de Extracto de Levedura (Óxoid) e 1% de Agar (Difco) (TSYE), em Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid) e em Plate Count Agar (PCA) (Oxoid) na concentração de 10^6 ufc/ml. (Anexo I).

Em seguida, as estirpes suspeitas de produzir substâncias inibidoras foram semeadas à superfície do meio de cultura inoculado com a estirpe indicadora, formando estrias concêntricas com cerca de 0,5 cm de diâmetro. As placas foram então incubadas a 30°C e as observações efectuadas às 18, 24 e 48 horas de incubação.

A formação de um halo transparente, não evidenciando o crescimento da estirpe indicadora, foi considerada positiva (Foto VI-1).

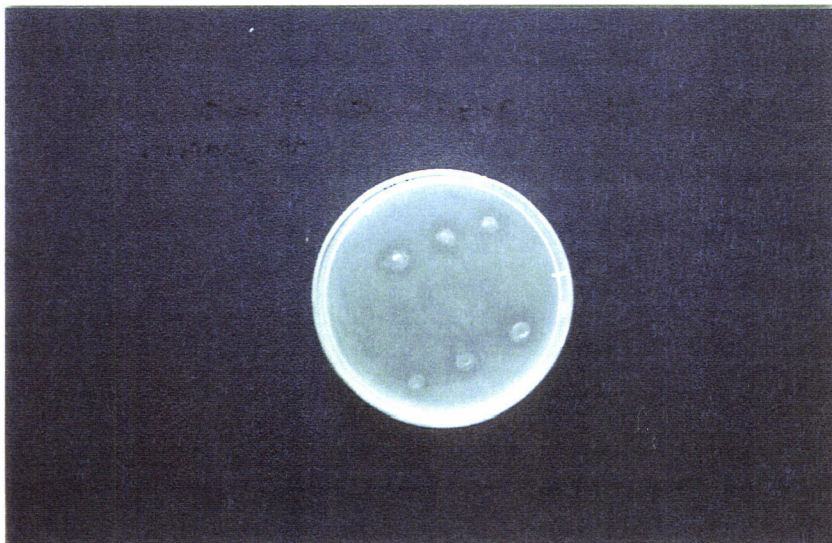


Foto VI-1 - Inibigrama de Seleção.

DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE ACÇÃO INIBITÓRIA:

As estirpes que na prova anterior demonstraram capacidade de inibir as estirpes indicadoras foram semeadas em Caldo MRS (Oxoid) e, após incubação de 24 h a 30°C, foram centrifugadas a 4 000 g durante 10 min em centrífuga Hettich EBA 12. O “pellet” resultante foi semeado em Caldo de MRS e incubado durante 5 h a 30°C.

Retirou-se 1ml de cultura e a restante foi centrifugada a 4 000 g durante 20 min e esterilizada por filtração (0,22 µm) (SUPOR®200, Gelman Sciences).

O sobrenadante filtrado foi distribuído e tratado da seguinte forma:

Tratamento 1 - 1 ml de sobrenadante filtrado + 500 UI de catalase (Sigma) e incubação a 30°C durante 30 min para eliminar a acção inibitória causada pelo peróxido de hidrogénio;

Tratamento 2 - 1 ml de sobrenadante filtrado neutralizado com NaOH 1M, para eliminar a acção inibitória causada pelos ácidos orgânicos;

Tratamento 3 - 1 ml de sobrenadante filtrado + 0,1mg de Pronase E (Sigma) em Tris HCl 20mM pH7,8 e incubação a 37°C durante 1 hora, para eliminar a acção inibitória causada por substâncias de natureza proteica;

Tratamento 4 - 1 ml de sobrenadante filtrado submetido a ebulição durante 15 min. Após arrefecimento, adição de 0,1mg de Pronase E em Tris HCl 20mM pH 7,8, para eliminar a acção inibitória causada por substâncias de natureza proteica, termossensíveis;

Tratamento 5 - 1 ml de sobrenadante filtrado neutralizado com NaOH 1M + 500 UI de catalase + 0,1mg de Pronase E em Tris HCl 20mM pH 7,8 e incubação a 37°C durante 1 hora para eliminar a acção inibitória conjunta do peróxido de hidrogénio, ácidos orgânicos e substâncias de natureza proteica;

Tratamento 6 - 1 ml de sobrenadante filtrado, para evidenciar a acção inibitória conjunta do peróxido de hidrogénio, ácidos orgânicos e substâncias de natureza proteica;

Tratamento 7 - 1 ml de suspensão bacteriana, para evidenciar a acção inibitória causada pela cultura microbiana e seus metabolitos.

As estirpes de *Listeria monocytogenes* Scott A e *Salmonella* Enteritidis (estirpes indicadoras) foram semeadas por incorporação, em duplicado, em PCA (Oxoid) na concentração de 10^6 ufc/ml. Após solidificação do meio de cultura, depositaram-se 50 μ l da suspensão bacteriana e de cada um dos diferentes sobrenadantes filtrados e tratados como indicado antes, provenientes das estirpes de bactérias lácticas, em orifícios mais ou menos equidistantes, com cerca de 9 mm de diâmetro feitos no meio de cultura. A incubação foi feita a 30°C e realizaram-se leituras dos resultados após 24 e 48 horas de incubação.

O aparecimento de um halo transparente em torno do(s) orifício(s) onde foi depositada a suspensão bacteriana ou os sobrenadantes filtrados foi considerado positivo (Foto VI-2).

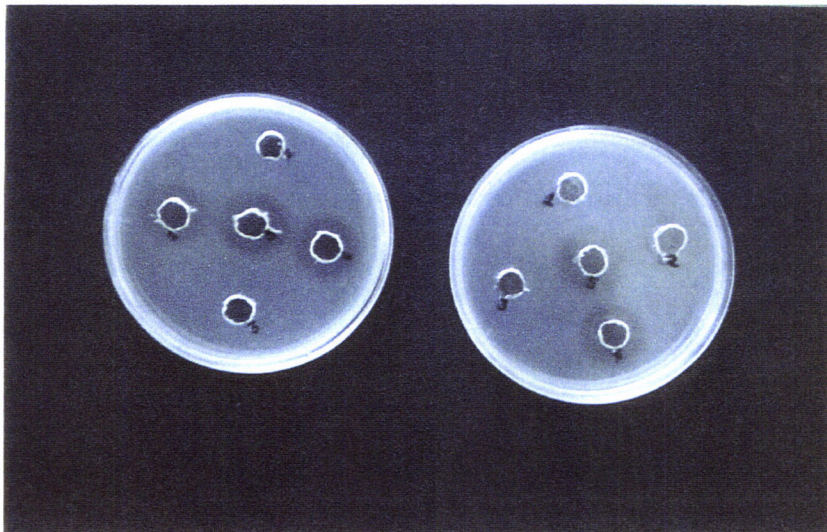


FOTO VI - 2 - Determinação do Mecanismo de Acção Inibitória.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O crescimento das estirpes indicadoras (*Listeria monocytogenes* Scott A e *Salmonella* Enteritidis) para a realização dos inibigramas de selecção foi feito em três meios de cultura. O meio TSYE é o meio utilizado em trabalhos semelhantes pela maioria dos autores. É um meio muito nutritivo de uso geral, indicado para o isolamento e cultura de microrganismos exigentes. É também indicado para a realização de testes microbiológicos e de verificação da eficácia de conservantes antimicrobianos (Difco, 1985). A adição de 1% de Agar ao meio em caldo permite a sua solidificação, conferindo-lhe uma consistência reduzida que facilita a difusão das substâncias inibidoras.

As dificuldades encontradas na obtenção de resultados fiáveis devido à difícil solidificação do meio, à não aderência do meio às placas e, principalmente, ao inexplicável reduzido crescimento das estirpes indicadoras, levaram-nos a testar o meio MHA.

A nossa opção baseou-se no facto de este ser um meio indicado para a realização de testes de sensibilidade a antibióticos e sulfamidas, pelas técnicas de difusão em agar. Foi também o meio escolhido por Gálvez et al. (1998) para pesquisa de bacteriocinas e outros autores (Atrih et al., 1993; Mathieu et al., 1993) utilizaram também meios destinados à realização de testes de sensibilidade a antibióticos, como o caldo IP modificado, em trabalhos semelhantes. No entanto, os resultados por nós obtidos também não foram aceitáveis, pelo que foi testado o meio PCA.

Neste meio, as estirpes indicadoras revelaram um crescimento satisfatório e os halos de inibição, reflectindo a actividade antagonista causada pelas estirpes produtoras de substâncias inibidoras, puderam ser observados com clareza.

Assim, PCA foi o meio de cultura escolhido para a realização dos inibigramas de selecção, a todas as estirpes potencialmente inibidoras, e para a determinação do mecanismo antagonista evidenciado por cada uma das que revelaram um resultado positivo na prova anterior.

A escolha das estirpes de bactérias lácticas para pesquisa da potencial produção de substâncias inibidoras baseou-se em dados obtidos no trabalho previamente realizado sobre as bactérias lácticas isoladas de queijo artesanal produzido na região de Évora, tendo sido feita a selecção proporcionalmente à frequência do seu isolamento.

Das 55 estirpes escolhidas para determinação da produção de substâncias inibidoras relativamente a *Listeria monocytogenes* Scott A e *Salmonella* Enteritidis apenas 7 - *Enterococcus faecium* (3), *Ent. hirae/Ent. durans* (1), *Leuconostoc lactis* (1) e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (2) - não manifestaram actividade inibidora face às estirpes indicadoras.

As restantes 48 estirpes foram utilizadas para determinação do mecanismo inibidor.

O Quadro VI-1 apresenta os diferentes tipos de antagonismo desenvolvidos pelas estirpes de bactérias lácticas seleccionadas em relação às duas estirpes indicadoras, após 24 e 48 horas de incubação.

Assim, a actividade antagonista mais frequentemente observada em relação a *Listeria monocytogenes* Scott A e a *Salmonella* Enteritidis foi evidenciada pelos sobrenadantes filtrados tratados com pronase E (com e sem ebulição), pelo sobrenadante filtrado sem qualquer tratamento e pela suspensão bacteriana. Como os sobrenadantes filtrados tratados exclusivamente com ou catalase ou com NaOH provenientes das culturas das mesmas estirpes não demonstraram qualquer efeito inibitório, este resultado indica que nem o peróxido de hidrogénio nem os ácidos orgânicos, por si sós, foram capazes de inibir o crescimento das estirpes indicadoras. No entanto, quando estes

compostos estavam presentes simultaneamente já revelavam essa capacidade. Assim, consideramos que o efeito associado dos ácidos orgânicos, do peróxido de hidrogénio e de outras substâncias não proteicas, termoestáveis, eventualmente presentes nos sobrenadantes filtrados constitui, o mecanismo inibidor mais frequentemente desenvolvido pelas bactérias lácticas escolhidas (Quadro VI-1). (Por facilidade de expressão, passaremos a designar este efeito apenas por “efeito associado dos ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogénio”).

QUADRO VI-1 - Tipos de Antagonismo Evidenciados pelas Bactérias Lácticas em Relação a *Listeria monocytogenes* Scott A e a *Salmonella* Enteritidis, após 24 e 48 horas de Incubação.

| ESTIRPE INDICADORA | <i>Listeria monocytogenes</i> | | <i>Salmonella</i> Enteritidis | |
|-----------------------------------|-------------------------------|-----------|-------------------------------|-----------|
| | INCUBAÇÃO | | | |
| MEC. INIBIÇÃO | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas |
| AcO+H ₂ O ₂ | 36 | 26 | 42 | 27 |
| Susp.Bact. | 9 | 18 | 3 | 16 |
| H ₂ O ₂ | 2 | 2 | 0 | 0 |
| AcO | 1 | 1 | 3 | 3 |
| Sem inibição | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Total | 48 | 48 | 48 | 48 |

MEC. INIBIÇÃO - Mecanismo de Inibição; AcO+H₂O₂ - Efeito associado dos ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogénio; Susp.Bact.- Efeito da suspensão bacteriana; H₂O₂ - Efeito do peróxido de hidrogénio; AcO - Efeito dos ácidos orgânicos.

Pela leitura do Quadro VI-1 também se pode verificar que este efeito era mais frequentemente observado após 24 horas de incubação do que às 48 horas, em relação quer a *Listeria monocytogenes* Scott A quer a *Salmonella* Enteritidis.

A suspensão bacteriana evidenciou exercer também alguma actividade inibidora em relação às estirpes indicadoras utilizadas, principalmente em relação a *Listeria monocytogenes* Scott A. Por outro lado, ao contrário do que foi observado relativamente ao efeito associado dos ácidos orgânicos e do

peróxido de hidrogénio, a inibição causada pela suspensão bacteriana era mais frequentemente observada após 48 horas de incubação do que às 24 horas (Quadro VI-1).

Relacionando os dois efeitos inibitórios já mencionados, verificámos que as estirpes que tinham capacidade de inibir as estirpes indicadoras através do efeito associado dos ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogénio apenas às 24 horas de incubação, eram as que, às 48 horas, as inibiam através da actividade da suspensão bacteriana.

Assim, pensamos que o antagonismo causado pela suspensão bacteriana às 24 horas de incubação pode ficar a dever-se à competição por nutrientes levando à sua depleção, em consequência da rápida multiplicação das bactérias lácticas (Raccach e Geshell, 1993). Contudo, aquele que é manifestado após 48 horas de incubação pelas estirpes que às 24 horas exerciam outro tipo de antagonismo dever-se-á, provavelmente, também à produção continuada das substâncias inibidoras, incluindo ácidos orgânicos e peróxido de hidrogénio, uma vez que as células presentes na suspensão bacteriana permaneceram metabolicamente activas. Muito provavelmente, os ácidos orgânicos e o peróxido de hidrogénio produzidos pelas culturas bacterianas e que estavam presentes, às 24 horas, nos sobrenadantes filtrados, foram inactivados, deixando de exercer a sua actividade antagonista.

Foi atribuída ao peróxido de hidrogénio presente no sobrenadante filtrado a inibição de *Listeria monocytogenes* Scott A por duas estirpes, verificando-se que o crescimento de *Salmonella* Enteritidis não foi inibido por esta substância (Quadro VI-1).

Esta situação pode estar de acordo com o facto de as bactérias Gram negativas serem mais resistentes à acção dos metabolitos do oxigénio, devido à camada lipolissacarídica da parede celular, que aprisiona o oxigénio molecular activo (Piard e Desmazeaud, 1991).

No entanto, a composição do meio de cultura das bactérias lácticas influencia, de forma significativa, a sua capacidade de produção de peróxido de hidrogénio, uma vez que quanto menor for a concentração de glucose no meio, maior será a produção de peróxido de hidrogénio, sendo considerada apropriada uma concentração de 0,2 g de glucose por litro (Berthier, 1993). O meio de cultura utilizado para o crescimento das bactérias lácticas (MRS), apesar de ser o meio indicado para este fim, pode reduzir a detecção de peróxido de hidrogénio, uma vez que a concentração de glucose é de cerca de 20 g por litro. A produção de peróxido de hidrogénio está inversamente relacionada com a produção de ácidos (Davidson e Hoover, 1993; Frey e Hubert, 1993) que, neste caso, mesmo que não tenham revelado um efeito inibidor frequente (Quadro VI-1), estavam presentes em quantidades significativas, dado o decréscimo de pH observado nos sobrenadantes filtrados (resultados não apresentados) e a concentração de açúcar presente no meio.

Os ácidos orgânicos presentes nos sobrenadantes filtrados também foram uma das causas de inibição de *Listeria monocytogenes* Scott A e de *Salmonella* Enteritidis, sendo mais frequentemente observado em relação a esta espécie (Quadro VI-1).

Nos Quadros VI-2 e VI-3 são apresentados os diferentes tipos de antagonismo evidenciados pelas várias espécies de bactérias lácticas relativamente a *Listeria monocytogenes* Scott A e a *Salmonella* Enteritidis, respectivamente.

Todas as espécies (mas não estirpes) de bactérias lácticas testadas manifestaram uma actividade antagonista sobre *Listeria monocytogenes* Scott A causada pelos efeitos associados dos ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogénio (Quadro VI-2). Como foi referido, este efeito era menos frequentemente observado às 48 horas que às 24 horas ao contrário do que sucedia com o efeito inibitório da suspensão bacteriana. Esta situação

ocorreu com estirpes de *Ent. faecium*, *Ent. faecalis*, do complexo *Ent. hirae/Ent. durans* e *Lactococcus lactis* (Quadro VI-2).

QUADRO VI-2 - Distribuição dos Diferentes Tipos de Antagonismo Evidenciados pelas Estirpes de Bactérias Lácticas sobre *Listeria monocytogenes* Scott A.

| TIPO DE ANTAGONISMO | AcO+H ₂ O ₂ | | Susp.Bact | | H ₂ O ₂ | | AcO | | S/ Inibição | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|------|-----------|------|-------------------------------|------|------|------|-------------|------|
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| EST.INIBIDORA | | | | | | | | | | |
| <i>Ent. faecium</i> (n=24) | 19 | 13 | 4 | 9 | 1 | 1 | | | | 1 |
| <i>Ent. faecalis</i> (n=7) | 7 | 5 | | 2 | | | | | | |
| <i>Ent. hirae/Ent.durans</i> (n=7) | 2 | 1 | 4 | 5 | 1 | 1 | | | | |
| <i>Lactococcus lactis</i> (n=2) | 2 | 1 | | 1 | | | | | | |
| <i>P. pentosaceus</i> (n=2) | 1 | 1 | | | | | 1 | 1 | | |
| <i>Leuconostoc lactis</i> (n=2) | 2 | 2 | | | | | | | | |
| <i>Lb. paracasei</i> (n=2) | 2 | 2 | | | | | | | | |
| <i>Lb. casei</i> (n=2) | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | |
| TOTAL (n=48) | 36 | 26 | 9 | 18 | 2 | 2 | 1 | 1 | | 1 |

EST.INIBIDORA - Estirpe inibidora; AcO+H₂O₂ - Efeito associado dos ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogénio; Susp.Bact. - Efeito da suspensão bacteriana; H₂O₂ - Efeito do peróxido de hidrogénio; AcO - Efeito dos ácidos orgânicos.

Em relação a *Salmonella* Enteritidis (Quadro VI-3), também algumas estirpes de *Ent. faecium*, *Ent. faecalis* e do complexo *Ent. hirae/Ent. durans* passaram a manifestar às 48 horas uma actividade inibitória que foi atribuída ao efeito da suspensão bacteriana, ao contrário do que exibiam às 24 horas devida ao efeito associado dos ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogénio presentes nos sobrenadantes filtrados.

O efeito do peróxido de hidrogénio presente nos sobrenadantes filtrados sobre *Listeria monocytogenes* Scott A foi evidenciado por uma estirpe de *Ent.*

faecium e a outra do complexo *Ent. hirae/Ent. durans* (Quadro VI-2) não tendo sido observado este efeito sobre *Salmonella* Enteritidis (Quadro VI-3).

QUADRO VI-3 - Distribuição dos Diferentes Tipos de Antagonismo Evidenciados pelas Estirpes de Bactérias Lácticas sobre *Salmonella* Enteritidis.

| TIPO DE ANTAGONISMO | AcO+H ₂ O ₂ | | Susp.Bact | | H ₂ O ₂ | | AcO | | S/ Inibição | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|------|-----------|------|-------------------------------|------|------|------|-------------|------|
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| INCUBAÇÃO | | | | | | | | | | |
| EST.INIBIDORA | | | | | | | | | | |
| <i>Ent. faecium</i> (n=24) | 22 | 11 | 2 | 11 | | | | | | 2 |
| <i>Ent. faecalis</i> (n=7) | 7 | 4 | | 3 | | | | | | |
| <i>Ent. hirae/Ent.durans</i> (n=7) | 6 | 5 | 1 | 2 | | | | | | |
| <i>Lactococcus lactis</i> (n=2) | 2 | 2 | | | | | | | | |
| <i>P. pentosaceus</i> (n=2) | 1 | 1 | | | | | 1 | 1 | | |
| <i>Leuconostoc lactis</i> (n=2) | 2 | 2 | | | | | | | | |
| <i>Lb. paracasei</i> (n=2) | 2 | 2 | | | | | | | | |
| <i>Lb. casei</i> (n=2) | | | | | | | 2 | 2 | | |
| TOTAL (n=48) | 42 | 27 | 3 | 16 | | | 3 | 3 | | 2 |

EST.INIBIDORA - Estirpe Inibidora; AcO+H₂O₂ - Efeito associado dos ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogénio; Susp.Bact. - Efeito da suspensão bacteriana; H₂O₂ - Efeito do peróxido de hidrogénio; AcO - Efeito dos ácidos orgânicos.

Quanto ao efeito inibitório causado pelos ácidos orgânicos presentes nos sobrenadantes filtrados sobre *Listeria monocytogenes* Scott A foi exercido por uma estirpe de *Pediococcus pentosaceus* (Quadro VI-2) enquanto que sobre *Salmonella* Enteritidis o foi por uma estirpe de *P. pentosaceus* e pelas duas estirpes de *Lactobacillus casei* seleccionadas (Quadro VI-3).

Seria de esperar que um maior número de estirpes inibidoras revelasse este tipo de antagonismo, uma vez que, após o seu crescimento, o pH dos sobrenadantes filtrados se situava entre 4 e 5 (resultados não apresentados), indicando a presença de ácidos produzidos pelas estirpes lácticas testadas.

Contudo, o crescimento de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* Enteritidis só é completamente inibido com valores de pH inferiores a 4,75 e 4,4, respectivamente (Piard e Desmazeaud, 1991), especialmente quando o agente acidificante é o ácido láctico (Piard e Desmazeaud, 1991; Östling e Lindgren, 1993). De facto, os únicos sobrenadantes filtrados que apresentaram valores de pH próximos de 4 foram os obtidos a partir das culturas de *Pediococcus pentosaceus* e de *Lactobacillus casei*, pelo que o ácido láctico presente nos outros sobrenadantes filtrados, com pH mais elevado, provavelmente, não exerceria um efeito inibidor apreciável.

Dado que as estirpes inibidoras eram bactérias lácticas homofermentativas, como foi verificado no estudo anterior em que se procedeu à sua identificação, o ácido láctico foi, provavelmente, o ácido orgânico presente em maior quantidade. No entanto, também se deve referir que algumas bactérias lácticas, nomeadamente os lactobacilos, em condições de aerobiose, têm capacidade de produzir ácido acético, que, nestas condições de pH, é uma substância antibacteriana muito mais eficaz que o ácido láctico, em relação a *Listeria monocytogenes* (Frey e Hubert, 1993).

Por outro lado, segundo Davidson e Hoover (1993), os lactobacilos são fortes produtores de peróxido de hidrogénio e a sua actividade inibitória em relação a *Listeria monocytogenes* é parcialmente atribuída a esta substância. Outros autores (Tharrington e Sorrells, 1992; Raccach e Geshell, 1993) também demonstraram que, para além de desenvolverem mecanismos de competição por nutrientes essenciais, os ácidos orgânicos, o peróxido de hidrogénio, o diacetil e as bacteriocinas, associada ou isoladamente, podem estar envolvidos na inibição de *Listeria monocytogenes* pelos lactobacilos

Finalmente, entre as estirpes de bactérias lácticas testadas, não foi detectada nenhuma produtora de substâncias proteicas, nomeadamente bacteriocinas, capaz de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* Enteritidis.

CONCLUSÕES:

A maior parte das estirpes de bactérias lácticas utilizadas evidenciaram exercer vários tipos de antagonismo, em relação às estirpes patogénicas de *Listeria monocytogenes* Scott A e *Salmonella* Enteritidis.

O tipo de antagonismo mais comum resultou do efeito associado das diferentes substâncias produzidas pelo metabolismo das bactérias lácticas, entre as quais se encontram os ácidos orgânicos, o peróxido de hidrogénio e, eventualmente outras substâncias não identificadas como o diacetil e o etanol.

Também é expressiva a actividade inibitória desencadeada pela suspensão bacteriana, envolvendo, provavelmente, quer a competição por nutrientes essenciais quer a persistência da produção de substâncias antimicrobianas, como as que foram anteriormente referidas.

Foram escassas as estirpes de bactérias lácticas cujo efeito inibitório foi provocado, exclusivamente, pela produção ou de ácidos orgânicos ou de peróxido de hidrogénio e não foi detectada nenhuma estirpe produtora de substâncias proteicas com actividade antimicrobiana, designadamente bacteriocinas.

Consideramos que uma das causas para esta situação pode estar relacionada com as condições culturais a que foram submetidas as estirpes inibidoras, uma vez que quer a composição do meio de cultura, a disponibilidade de nutrientes e o seu pH, quer a temperatura e duração da incubação, são factores que podem influenciar a produção de bacteriocinas. Contudo, sendo o principal objectivo deste trabalho a determinação das diferentes formas de antagonismo evidenciadas pelas várias espécies de bactérias lácticas isoladas do queijo produzido na região de Évora, houve necessidade de estabelecer condições que permitissem apreciar estes

mecanismos, eventualmente comprometendo a capacidade de produção de bacteriocinas das estirpes em estudo.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES GERAIS

O queijo artesanal produzido na região de Évora, proveniente da queijaria estudada, situada no concelho de Viana, distrito de Évora e fabricado com leite cru de ovelha, revelou a presença de teores de enterobactérias e de coliformes muito elevados. Estes valores, traduzindo a existência de fracas condições higiénicas na obtenção, manipulação e transformação da matéria-prima, podem constituir uma preocupação, sob o ponto de vista de saúde pública, podendo também representar riscos tecnológicos. No entanto, não foi detectada a presença de microrganismos patogénicos ou potencialmente patogénicos como *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Os baixos níveis de *Staphylococcus* coagulase positivo encontrados, provavelmente, também não constituem uma ameaça para a saúde dos consumidores.

A análise da evolução dos diferentes grupos microbianos presentes no queijo artesanal produzido na região de Évora revelou a existência de duas épocas de fabrico: Inverno e Primavera. Na época de Inverno, os diferentes grupos microbianos crescem até ao final do período de maturação, tendo sido observado que as populações de enterobactérias e coliformes eram bastante numerosas. Na época de Primavera, as populações microbianas atingem os

seus valores máximos aos três ou sete dias de maturação, ultrapassando os valores homólogos verificados no Inverno, e decrescem, depois, até ao final do período de maturação. Este decréscimo é mais acentuado nas enterobactérias e nos coliformes cujas populações, no final da maturação, se tornam menores que as observadas na época de Inverno. Este aspecto, aliado ao facto de as populações de bactérias lácticas serem mais abundantes, sugere que estas podem exercer efeitos antagonistas com alguma relevância no controlo de enterobactérias e coliformes e, eventualmente, de outros microrganismos indesejáveis no produto.

Apesar de estarem presentes em populações menos numerosas que os outros grupos microbianos, as leveduras podem desempenhar um papel importante na maturação desta variedade de queijo, caracterizada por uma intensa lipólise, uma vez que quase todas demonstraram possuir actividade lipolítica.

De entre as bactérias lácticas presentes no queijo artesanal produzido na região de Évora, predominam os géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus*, estando também presentes, em menor expressão, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella*. As espécies de bactérias lácticas mais frequentemente identificadas foram *Enterococcus faecium*, complexo *Ent. hirae/Ent. durans* e *Ent. faecalis* e também *Lactobacillus casei* e *Lb. paracasei*. No início da maturação também estava presente *Lactococcus lactis*. As estirpes identificadas revelaram possuir algumas características próprias, distintas das estirpes padrão utilizadas para a sua identificação. Seria, portanto, vantajoso que pudessem vir a entrar na constituição de culturas de arranque a utilizar no fabrico do queijo de Évora, com vista a melhorar os seus padrões de qualidade sem alterar a sua especificidade.

Embora os resultados obtidos sobre a viabilidade de microrganismos patogénicos durante a maturação do queijo artesanal produzido na região de Évora devam ser apreciados com alguma reserva, sugerem que, dada a incompatibilidade entre as condições de crescimento oferecidas por este

produto e as requeridas por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, é pouco provável que estes microrganismos sobrevivam a um período de maturação de sessenta dias, realizado nas condições habituais, de modo a representarem um risco sanitário.

A inviabilidade de crescimento destes microrganismos no queijo, para além de poder ser devida às propriedades físico-químicas do produto e às condições sob as quais decorre a maturação é, provavelmente, também causada pela presença de um elevado número de bactérias lácticas, ao longo da maturação. A capacidade manifestada por estas bactérias em competir pelos nutrientes e produzir diversas substâncias, entre elas os ácidos orgânicos e o peróxido de hidrogénio, cujos efeitos, especialmente se associados, determinam a inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, apresenta perspectivas promissoras no controlo de algumas espécies de microrganismos indesejáveis que podem estar presentes neste produto.

Assim, a utilização destas estirpes como culturas de arranque pode tornar-se vantajosa, não só pela salvaguarda das características específicas mas também como promoção da qualidade higio-sanitária do queijo de Évora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-SALAM, M.H., ALICHANIDIS, E., ZERFIRIDIS, G.K. - 1993 - Domiati and Feta Type Cheeses. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. II - Major Cheese Groups" pp. 301 - 335. Ed. P.F. Fox. Chapman & Hall. 577 pp.

ABDALLA, O.M., DAVIDSON, P.M., CHRISTEN, G.L. - 1993 - Survival of Selected Pathogenic Bacteria in White Picked Cheese Made With Lactic Acid Bacteria or Antimicrobials. J. Food Protect. 56 : 972 - 976.

ALTING, A.C., ENGELS, W.J.M., van SCHALKWIJK, S., EXTERKATE, F.A. - 1995 - Purification and Characterization of Cystathionine β -Lyase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* B78 and its Possible Role in Flavor Development in Cheese. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 4037 - 4042.

ANTUNES, T.M., SANTOS, I.A. - 1943 - Elementos para o Estudo do Queijo da Serra. Bol. Pec. Ano XI (2) 7:202.

ASPERGER, H. - 1994 - *Staphylococcus aureus*. In "The Significance of Pathogenic Microorganisms in Raw Milk". pp 24 - 42. Publ. International Dairy Federation. Brussels. 215 pp.

ATRIH, A., REKHIF, N., MILLIERE, J.B., LEFEBVRE, G. - 1993 - Detection and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* C19. Can.J.Microbiol., 39 : 1173 - 1179.

AXELSSON, L.T. - 1993 - Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In "Lactic Acid Bacteria" pp 1 - 63. Ed. S. Salminen, A. von Wright. Marcel Dekker Inc. 442 pp.

BACHMANN, H.P., SPAHR, U. - 1995 - The Fate of Potentially Pathogenic Bacteria in Swiss Hard and Semihard Cheeses Made from Raw Milk. J. Dairy Sci. 78 : 476 - 483.

BADINAND - 1994 - Maîtrise du Taux Cellulaire du Lait. Rec. Med. Vet. 170 : 419 - 427.

BELLENGIER, P., RICHARD, J., FOUCAUD, C. - 1994 - Associative Growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* Strains in Milk. J. Dairy Sci. 80 : 1520 - 1527.

BENKERROUM, N., MISBAH, M., SANDINE, W.E., ELARAKI, A.T. - 1993 - Development and Use of a Selective Medium for isolation of *Leuconostoc* spp. from Vegetables and dairy Products. Appl. Environm. Microbiol. 59 : 607 - 609.

BERGÈRE, J.L., LENOIR, J. - 1997 - Les Accidents de Fromagerie et les Defauts des Fromages. In "Le Fromage". pp. 509 - 543. 3^e Ed. Coord. A. Eck J.-C. Gillis. Ed. Lavoisier Tec&Doc. Paris. 891 pp.

BERTHIER, F. - 1993 - On the Screening of Hydrogen Peroxide-Generating Lactic Acid Bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 16 : 150 - 153.

BERTRAND, F. - 1988 - Le Fromage Grand Oeuvre des Microbes. Rev. Gen. Froid 78 : 519 - 527.

BHOWMIK, T., MARTH, E.H. - 1990 - Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* in Cheese Ripening: A Review. J. Dairy Sci. 73 : 859 - 866.

BISWAS, S.R., RAY, P., JOHNSON, M.C., RAY, B. - 1991 - Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin Ach, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl. Environm. Microbiol. 57 : 1265 - 1267.

BODDY, L., WIMPENNY, J.W.T. - 1992 - Ecological Concepts in Food Microbiology. J. Appl. Microbiol. 73 : 23S-38S.

BOUIX, M., LEVEAU, J.-Y. - 1995 - Identification. In "Microbiological Control for Foods and Agricultural Products". pp 97 - 107. Ed. C.M. Bourgeois e J.-Y. Leveau. Trad. S. Davids. VCH Publishers , Inc. 542 pp.

BOURGEOIS, C.M. - 1995 - Total Aerobic Mesophilic Microflora. In "Microbiological Control for Foods and Agricultural Products". pp 175 - 179. Ed. C.M. Bourgeois e J.-Y. Leveau. Trad. S. Davids. VCH Publishers , Inc. 542 pp.

BRENNER, D.J. - 1984 - Family I. Enterobacteriaceae. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 1 - Section 5 - Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods. pp 408 - 420. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins. 964 pp.

BRITO, R.S., BAPTISTA, F.O. - 1994 - Atividades do Espaço Rural e Sua Evolução. In "Portugal - Perfil Geográfico" Dir. R.S.Brito. Ed. Estampa. 415 pp.

BROTHWELL, P., BROTHWELL, D. - 1969 - A Alimentação na Antiguidade. Col. História Mundi. Dir. G. Daniel. Ed. Verbo.

BRUNO, M.E.C., MONTVILLE, T.J. - 1993 - Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 3003 - 3010.

BUAZZI, M.M., JOHNSON, M.E. MARTH, E.H. - 1992a - Survival of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture and Ripening of Swiss Cheese. J. Dairy Sci. 74 : 380 - 386.

BUAZZI, M.M., JOHNSON, M.E., MARTH, E.H. - 1992b - Fate of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture of Mozzarella Cheese. J. Food Protect. 55: 80 - 83.

BUCHANAN, R.L., GOLDEN, M.H., WHITING, R.C. - 1993 - Differentiation of the Effects of pH and Lactic or Acetic Acid Concentration on the Kinetics of *Listeria monocytogenes* Inactivation. J. Food Protect. 56 : 474 - 478.

BUCKENHÜSKES, H.J. - 1993 - Selection Criteria for Lactic Acid Bacteria To Be Used as Starter Cultures for Various Food Commodities. FEMS Microbiol. Rev. 12 : 253 - 272.

BURGUESS, K., HEGGUM, C., WALKER, S., van SCHOTHORST, M. - 1994 - Recommendations for the Hygienic Manufacture of Milk and Milk Based Products. Bull IDF 292: 1- 32.

CANILLAC, N., MOUREY, A. - 1993 - Sources of Contamination by *Listeria* During the Making of Semi-Soft Surface-Ripened Cheese. Sci. Alim. 13 : 533 - 544.

CANTÉRI, G. - 1997 - Les Levains Lactiques. In "Le Fromage." pp175 - 195. 3^o Ed. Coord. A. Eck J.-C. Gillis. Ed. Lavoisier Tec&Doc. Paris. 891 pp.

CASTRO, P. de - 1989 - The Market of Typical Italian Cheeses. I - The Pecorino Romano. Options Mediterr. Ser. Sem. 6 : 205 - 212.

CATSARAS, M.V. - 1995 - Indicators of Fecal Contamination. In "Microbiological Control for Foods and Agricultural Products". pp 293 - 308. Ed. C.M. Bourgeois e J.-Y. Leveau. Trad. S. Davids. VCH Publishers , Inc. 542 pp.

CATTEAU, M. - 1995b - The Genus *Listeria*. In "Microbiological Control for Foods and Agricultural Products". pp 373 - 382. Ed. C.M. Bourgeois e J.-Y. Leveau. Trad. S. Davids. VCH Publishers , Inc. 542 pp.

CHAIA, A.P., de SAAD, A.M.S., HOLGADO, A.P.R., OLIVER, G. - 1994 - Influence of Propionate on Growth and Fermentative Activity of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.* 77 : 134 - 139.

CHOISY, C., DESMAZEAUD, M., GRIPON, J.-C., LAMERET, G., LENOIR, J. - 1997a - La Biochimie de L'Affinage. In "Le Fromage". pp. 86 - 161. 3^o Ed. Coord. A. Eck J.-C. Gillis. Ed. Lavoisier Tec&Doc. Paris. 891 pp.

CHOISY, C., DESMAZEAUD, M., GUEGUEN, M., LENOIR, J., SCHMIDT, J.-L., TOURNEUR, C. - 1997b - Les Phénomènes Microbiens. In "Le Fromage". pp. 377 - 446. 3^o Ed. Coord. A. Eck J.-C. Gillis. Ed. Lavoisier Tec&Doc. Paris. 891 pp.

CHRISTEN, G.L., DAVIDSON, P.M., McALLISTER, J.S., ROTH, L.A. - 1992 - Coliform and Other Indicator Bacteria. In "Standard Methods for the Examination of Dairy Products". 16 th Edition pp 247 - 269. R.T. Marshall, Ed. American Public Health Association. Washington, DC. 546 pp.

CHRISTENSEN, D.P., HUTKINS, R.W. - 1992 - Collapse of the Proton Motive Force in *Listeria monocytogenes* Caused by a Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 3312 - 3315.

CHRISTIANSEN, P.S., OVERBY, A.J. - 1988 - Quality and Requirements of Milk for Processing. In "Meat Science, Milk Science and Technology" pp 201 - 209. Ed. H.R.Cross, A.J.Overby. World Animal Science B3. Elsevier Science Publishers. 458 pp.

COCAIGN-BOUSQUET, M., GARRIGUES, C., LOUBIERE, P., LINDLEY, N.D. - 1996 - Physiology of Pyruvate Metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70 : 253 - 267.

COGAN, T.M. - 1995 - Flavour Production by Dairy Starter Cultures. *J. Appl. Bact. Symp Suppl.* 79 : 49S - 64S.

COGAN, T.M., BARBOSA, M., BEUVIER, E., BIANCHI-SALVADORI, B., COCCONCELLI, P.S., FERNANDES, I., GOMEZ, J., KALANTZOPOULOS, G., LEDDA, A., MEDINA, M., REA, M.C., RODRIGUEZ, E. - 1997 - Characterization of the Lactic Acid Bacteria in Artisanal Dairy Products. *J. Dairy Res.* 64 : 409 - 421.

COGAN, T.M., HILL, C. - 1993 - Cheese Starters Cultures. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. I - General Aspects" pp. 193 - 255. Ed. P.F. Fox. Chapman & Hall. 601 pp.

COGAN, T.M., JORDAN, K.N. - 1994 - Metabolism of *Leuconostoc* Bacteria. J. Dairy Sci. 77 : 2704 - 2717.

COLLINS, M.D., SAMELIS, J., METAXOPOULOS, J., WALLBANKS, S. - 1993 - Taxonomic Studies on Some *Leuconostoc*-like Organisms from Fermented Sausages: Description of a New Genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* Group of Species. J. Appl. Bact. 75 : 595 - 603.

CONDE DE FICALHO - 1979 - Notas Históricas acerca de Serpa e o Elemento Árabe na Linguagem dos Pastores Alentejanos. Lisboa. 175 pp.

CONDON, S. - 1987 - Responses of Lactic Acid Bacteria to Oxygen. FEMS Microbiol. Rev. 46 : 269 - 280.

COOKE, R.D., TWIDDY, D.R., REILLY, P.J.A. - 1987 - Lactic-Acid Fermentation as a Low-Cost Means of Food Preservation in Tropical Countries. FEMS Microbiol. Rev. 46 : 369 - 379.

CORBEL, M.J., BRINLEY-MORGAN, W.J. - 1984 - Genus *Brucella*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 1 - Section 4 - Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci. pp 377 - 388. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins. 964 pp.

CORROLER, D., MANGIN, I., DESMASURES, N., GUEGUEN, M. - 1998 - An Ecological Study of Lactococci Isolated from Raw Milk in the Camembert Cheese Registered Designation of Origin Area. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 4729 - 4735.

CUESTA, P., FERNANDÉZ-GARCIA, E., LLANO, D.G., MONTILLA, A., RODRIGUEZ, A. - 1996 - Evolution of the Microbiological and Biochemical Characteristics of Afuega'l Pitu Cheeses During Ripening. J. Dairy Sci. 79 : 1693 - 1698.

CZUPRYNSKI, C.J. - 1994 - Host Defense Against *Listeria monocytogenes*: Implications for Food Safety. Food Microbiol. 11 : 131 - 147.

DABA, H., LACROIX, C., HUANG, J., SIMARD, R.E. - 1993 - Influence of Growth Conditions on Production and Activity of Mesentericin 5 by a Strain of *Leuconostoc mesenteroides*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39 : 166 - 173.

DATTA, A.R., BENJAMIN, M.M. - 1997 - Factors Controlling Acid Tolerance of *Listeria monocytogenes*: Effects of Nisin and Other Ionophores. Appl. Environm. Microbiol. 63 : 4123 - 4126

DAVIDSON, P.M., HOOVER, D.G. - 1993 - Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. In "Lactic Acid Bacteria" pp127 - 159. Ed. S.Salminen e A.von Wright. Marcel Dekker, Inc.

De BUYSER, M.L. - 1995 - Coagulase-Positive Staphylococci. In "Microbiological Control for Foods and Agricultural Products". pp 361 - 371. Ed. C.M. Bourgeois e J.-Y. Leveau. Trad. S. Davids. VCH Publishers , Inc. 542 pp.

De VOS, W.M. - 1996 - Metabolic Engineering of Sugar Catabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70 : 223 - 242.

De VUYST, L. - 1995 - Nutritional Factors Affecting Nisin Production by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NIZO 22186 in a Synthetic Medium. *J. Appl. Bact.* 78 : 28 - 33.

De VUYST, L., VANDAMME, E.J. - 1993 - Influence of the Phosphorus and Nitrogen Source on Nisin Production in *Lactococcus lactis* subsp *lactis* Batch Fermentations using a Complex Medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 : 17 - 22.

DÉAK, T. - 1991 - Foodborne Yeasts. *Adv Appl. Microbiol.* 36 : 179 - 270.

DELLAGLIO, F., TORRIANI, S., PATTARINI, F., RICCI, C., di BUCCHIANICO, R. - 1995 - Identificazione e Caratterizzazione Tecnologica della Microflora Lattica Naturale del Fromaggio Pecorino d'Abruzzo. *Sci e Tec. Latt-Cas.* 46 : 82 - 97.

DESMASURES, N., BAZIN, F., GUÉGUEN, M. - 1997 - Microbiological Composition of Raw Milk from Selected Farms in the Camembert Region of Normandy. *J. Appl. Microbiol.* 83 : 53 - 58.

DESMAZEAUD, M. - 1997 - Aptitude du Lait au Développement de la Flore Lactique. In "Le Fromage". pp. 212 - 228. 3^e Ed. Coord. A. Eck J.-C. Gillis. Ed. Lavoisier Tec&Doc. Paris. 891 pp.

DEVRIESE, L.A., COLLINS, M.D., WIRTH, R. - 1991a - The Genus *Enterococcus*. In "The Prokaryotes. A Handbook on The Biology of Bacteria.: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications" 2nd Edition. Ed. A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer. Vol 2. Chapter 66. pp 1465 - 1481.

DEVRIESE, L.A., HOMMEZ, J., WIJFELS, R., HAESEBROUCK, F. - 1991b - Composition of the Enterococcal and Streptococcal Intestinal Flora of Poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 71 : 46 - 50.

DEVRIESE, L.A., COLQUE, J.I.C., De HERT, P., HAESBROUCK, F. - 1992 - Identification and Composition of the Tonsillar and Anal Enterococcal and Streptococcal Flora of Dogs and Cats. *J. Appl. Bacteriol.* 73 : 421 - 425.

DEVRIESE, L.A., POT, B., COLLINS, M.D. - 1993 - Phenotypic Identification of the Genus *Enterococcus* and Differentiation of Phylogenetically Distinct Enterococcal Species and Species Group. *J. Appl. Bact.* 75 : 399 - 408.

DEVRIESE, L.A., POT, B., VandAMME, L., KERSTERS, K., HAESBROUCK, F. - 1995 - Identification of *Enterococcus* Species Isolated from Foods of Animal Origin. *Int. J. Food Microbiol.* 26 : 187 - 197.

DIAS, B., WEIMER, B. - 1998a - Conversion of Methionine by Lactococci, Lactobacilli, and Brevibacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 3320 - 3326.

DIAS, B., WEIMER, B. - 1998b - Purification and Characterization of L-Methionine γ -Lyase from *Brevibacterium linens* BL2. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 3327 - 3331.

DIAS, S.M.P. - 1997 - Caracterização das Leveduras Presentes na Massa do Queijo Artesanal da Região de Évora. Trabalho de Fim de Curso. Universidade de Évora.

DIAS, S.P., POTES, M.E., MARINHO, A., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. - Characterization of Yeasts Isolated from "Évora Cheese", an Artisanal Ewes' Cheese from Southern of Portugal. *Int. J. Food Microbiol.* *In press*

DIFCO - 1985 - Difco Manual. Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. 10th Edition. Difco Laboratories. Detroit. Michigan. 48232 USA.

DONNELLY, C. - 1994 - *Listeria monocytogenes*. In "Foodborne Disease Handbook. Diseases Caused by Bacteria". Vol.I. pp 215 - 252. Ed. Y.H.Hui, J.R.Gorham, K.D.Murrell, D.O.Cliver. Marcel Dekker, Inc. 613 pp.

DONNELLY, C.W. - 1990 - Concerns of Microbial Pathogens in Association with Dairy Foods. *J. Dairy Sci.* 73 : 1656 - 1661.

EDELSTEN, D. - 1988 - Composition of Milk. In " Meat Science, Milk Science and Technology" pp 175 - 199. Ed. H.R.Cross, A.J.Overby. World Animal Science B3. Elsevier Science Publishers. 458 pp

EL SODA, M. - 1997 - Control and Enhancement of Flavour in Cheese. In "Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk". pp219 - 252 Ed. B.A.Law 2nd Edition Blackie Academic & Professional. 363pp.

EL-GAZZAR, F.E., MARTH, E.H. - 1992 - Salmonellae, Salmonellosis, and Dairy Foods: A Review. J. Dairy Sci. 75 : 2327 - 2343.

EL-SHENAWY, M.A., MARTH, E.H. - 1992 - Behavior of *Listeria monocytogenes* in the Presence of Sodium Propionate Together with Food Acids. J. Food Protect. 55 : 241 - 245.

ENNAHAR, S., AOUDE-WERNER, D., ASSOBEI, O., HASSEMANN, C. - 1998 - Antilisterial Activity of Enterocin 81, a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 Isolated from Cheese. J. Appl. Microbiol. 85 : 521 - 526.

EUZÉBY, J.P. - 2000 - Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html>.

FARBER, J.M., DALEY, E., COATES, F., EMMONS, D.B., McKELLAR, R. - 1992 - Factors Influencing Survival of *Listeria monocytogenes* in Milk in a High-Temperature Short-Time Pasteurizer. J. Food Protect. 55 : 946 - 951.

FARBER, J.M., PETERKIN, P.I. - 1991 - *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. Microbiol. Rev. 55 : 476 - 511.

FARIAS, M.E., HOLGADO, A.A.P.R., SESMA, F. - 1994 - Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Regional Cheeses: Inhibition of Foodborne Pathogens. J. Food Protect. 57 : 1013 - 1015.

FENLON, D.R., WILSON, J., DONACHIE, W. - 1996 - The Incidence and Level of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food Sources at Primary Production and Initial Processing. J. Appl. Bact. 81 : 641 - 650.

FERNANDEZ DEL POZO, B., GAYA, P., MEDINA, M., RODRIGUEZ-MARÍN, M.A., NUÑEZ, M. - 1988 - Changes in the Microflora of La Serena Ewes' Milk Cheese During Ripening. J. Dairy Res. 55 : 449 - 455.

FLAHAUT, S., BOUTIBONNES, P., AUFRAY, Y. - 1997 - Les Entérocoques dans L'Environnement Proche de L'Homme. Can. J. Microbiol. 43 : 699 - 708.

- FLAMBARD, B., HELINCK, S., RICHARD, J., JUILLARD, V. - 1998 - The Contribution of Caseins to the Amino-acid Supply for *Lactococcus lactis* Depends on the Type of Cell Envelope Proteinase. Appl. Environ Microbiol. 64 : 1991 - 1996.
- FLEET, G.H. - 1990 - Yeasts in Dairy Products. A Review. J. Appl. Bact. 68 : 199 - 211.
- FLEET, G.H., MIAN, M.A. - 1987 - The Occurrence and Growth of Yeasts in Dairy Products. Int. J. Food Microbiol. 4 : 145 - 155.
- FONTECHA, J., PELAEZ, C., JUAREZ, M., REQUENA, T., GOMEZ, C., RAMOS, M. - 1990 - Biochemical and Microbiological Characteristics of Artisanal Hard Goats' Cheese. J. Dairy Sci. 73 : 1150 - 1157.
- FOX, P.F. - 1993 - Cheese: An Overview. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. I - General Aspects" pp.1 - 36. Ed. P.F. Fox. Chapman & Hall. 601 pp.
- FOX, P.F., LAW, J., McSWEENEY, P.L.H., WALLACE, J. - 1993 - Biochemistry of Cheese Ripening. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. I - General Aspects" pp.389 - 438. Ed. P.F. Fox. Chapman & Hall. 601 pp.
- FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H. - 1997 - Rennets: Their Role in Milk Coagulation and Cheese Ripening. In "Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk" pp. 1 - 49. Ed. B.A.Law. 2nd Edition Blackie Academic & Professional. 363 pp.
- FRANK, J.F., HASSAN, A.N. - 1998 - Starter Cultures and Their Use. In "Applied Dairy Microbiology". pp131 - 172. Ed. E.H.Marsh, J.Steele. Marcel Dekker Inc. 516 pp.
- FRANKINET, J. - 1997 - Utilisation du Lait Cru. In "Le Fromage". pp. 298 - 300. 3^e Ed. Coord. A. Eck J.-C. Gillis. Ed. Lavoisier Tec&Doc. Paris. 891 pp.
- FREITAS, A.C., PAIS, C., MALCATA, F.X., HOGG, T.A. - 1996 - Microbiological Characterization of Picante da Beira Baixa Cheese. J. Food Protect. 59 : 155 -160.
- FREITAS, A.C., SOUSA, M.J., MALCATA, F.X. - 1995 - Effect of Ripening Time and the Combination of Ewe and Goat Milk on the Microflora of Picante Cheese. Ital. J. Food Sci. 4 : 361 - 377.
- FREY, L., HUBERT, J.C. - 1993 - Lactobacilles, Oxygène, Métabolisme et Antagonisme. Lait. 73 : 133 - 144.

GALLOIS, A., LANGLOIS, D. - 1990 - New Results in the Volatile Odorous Compounds of French Cheeses. *Lait* 70 : 89 - 106.

GÁLVEZ, A., VALDÍVIA, E., ABRIOUEL, H., CAMAFEITA, E., MENDEZ, E., MARTÍNEZ-BUENO, M., MAQUEDA, M. - 1998 - Isolation and Characterization of Enterocin EJ97, a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch. Microbiol.* 171 : 59 - 65.

GANCEL, F., DZIERSZINSKI, F., TAILLIEZ, R. - 1997 - Identification and Characterization of *Lactobacillus* Species Isolated from Fillets of Vacuum-packed Smoked and Salted Herring (*Clupea harengus*). *J. Appl. Bact.* 82 : 722 - 728.

GARCÍA-QUINTÁNS, N., MAGNI, C., de MENDOZA, D., LÓPEZ, P. - 1998 - The Citrate Transport System of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar diacetylactis is Induced by Acid Stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 850 - 857.

GARIN-BASTUJI, B., VERGER, J.M. - 1994 - *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. In "The Significance of Pathogenic Microorganisms in Raw Milk". pp 167 - 185. Publ. International Dairy Federation. Brussels. 215 pp.

GARVIE, E.I. - 1986a - Genus *Pediococcus*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 12 - Gram-Positive Cocci. pp 1075 - 1079. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins.

GARVIE, E.I. - 1986b - Genus *Leuconostoc*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 12 - Gram-Positive Cocci. pp 1071 - 1075. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins.

GAYA, P., BABÍN, M., MEDINA, M., NUÑEZ, M. - 1999 - Diversity Among Lactococci Isolated from Ewes' Raw milk and Cheese. *J. Appl. Microbiol.* 87 : 849 - 855.

GAYA, P., MEDINA, M., NUÑEZ, M. - 1991 - Effect of the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* Behavior in Raw Milk at Refrigeration Temperatures. *Appl. Environm. Microbiol.* 57 : 3355 - 3360.

GENIGEORGIS, C., CARNICIU, M., DUTULESCU, D., FARVER, T.B. - 1991 - Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* in Market Cheeses Stored at 4 to 30°C. *J. Food Protect.* 54 : 662 - 668.

GILMOUR, A., HARVEY, J.- 1990 - Staphylococci in Milk and Milk Products. *J. Appl. Bact. Symp. Suppl.* 69: 147S - 166S.

GIRAFFA, G., NEVIANI, E., TARELLI, G.T. -1994 - Antilisterial Activity by Enterococci in a Model Predicting the Temperature Evolution of Taleggio, an Italian Soft Cheese. J. Dairy Sci. 77 : 1176 - 1182.

GLEBEL, J., CORBION, B. - 1995 - The Genus *Salmonella*. In "Microbiological Control for Foods and Agricultural Products". pp 309 - 324. Ed. C.M. Bourgeois e J.-Y. Leveau. Trad. S. Davids. VCH Publishers , Inc. 542 pp.

GOBBETTI, M., FOX, P.F., STEPANIAK, L. - 1997 - Isolation and Characterization of a Tributyrin Esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. J. Dairy Sci. 80 : 3099 - 3106.

GÓMEZ, M.J., RODRIGUEZ, E., GAYA, P., NUÑEZ, M., MEDINA, M. - 1999 - Characteristics of Manchego Cheese Manufactured from Raw and Pasteurized Ovine Milk and With Defined-Strain or Commercial Mixed-Strain Starter Cultures. J. Dairy Sci. 82 : 2300 - 2307.

GOMEZ-LUCIA, E., GOYACHE, J., ORDEN, J.A., DOMENECH, A., HERNANDEZ, F.J., RUIZ-SANTA QUITERIA, J.A., LOPEZ, B., BLANCO, J.L., SUAREZ, G. - 1992 - Growth of *Staphylococcus aureus* and Synthesis of Enterotoxin during Ripening of Experimental Manchego-Type Cheese. J. Dairy Sc. 75 : 19 - 26.

GONZALEZ, B., GLAASKER, E., KUNJI, E.R.S., DRIESSEN, A.J.M., SUÁREZ, J.E., KONINGS, W.N. - 1996 - Bactericidal Mode of Action of Plantaricin C. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 2701 - 2709.

GONZALEZ, J., MÁS, M., GALLEGO, F.L. - 1991 - Características de la Leche de Oveja Merina y del Queso de La Serena Producidos en Tres Explotaciones Tipo. Invest. Agr; Prod. Sanid anim. 6 : 143 - 155.

GONZALEZ, S.N., APELLA, M.C., ROMERO, N.C., MACÍAS, M.E.N., OLIVER, G. - 1993 - Inhibition of Enteropathogens by Lactobacilli Strains Used in Fermented Milk. J. Food Protect. 56 : 773 - 776.

GRIPON, J.C. - 1993 - Mould-Ripened Cheeses. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. II - Major Cheese Groups" pp. 111 - 136. Ed. P.F. Fox. Chapman & Hall. 577 pp.

GUERRA, M.M., BERNARDO, F.M.A. - 1999a - Relevância Sanitária de *Listeria monocytogenes* nos Produtos Lácticos. Rev. Port. Ciências Vet. 530 : 63 - 74

GUERRA, M.M.M. - 1995 - Pesquisa de Agentes Patogénicos em Leite e Queijo de Ovelha Produzidos na Região de Évora. Trabalho de Fim de Curso da Licenciatura em Engenharia Zootécnica. Universidade de Évora.

GUERRA, M.M.M., BERNARDO, F.M.A. - 1999b - Ocorrência Natural de *Listeria* spp. em Queijos Alentejanos. Rev. Port. Ciências Vet. 531 : 142 - 148.

GUINEE, T.P., FOX, P.F. - 1993 - Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. I - General Aspects" pp. 257 - 302. Ed. P.F. Fox. Chapman & Hall. 601 pp.

GÜRAKAN, G.C., BOZOGLU, T.F., WEISS, N. - 1995 - Identification of *Lactobacillus* Strains from Turkish-style Dry Fermented Sausages. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 28 : 139 - 144.

HADDAD, S., SODINI, I., MONNET, C., LATRILLE, E., CORRIEU, G. - 1997 - Effect of Citrate on Growth of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* in Milk. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48 : 236 - 241.

HALLING, S.M., YOUNG, E.J. - 1994 - *Brucella*. In "Foodborne Disease Handbook. Diseases Caused by Bacteria". Vol.I. pp 63 - 69. Ed. Y.H.Hui, J.R.Gorham, K.D.Murrell, D.O.Cliver. Marcel Dekker, Inc. 613 pp.

HAMBRAEUS, L., LÖNNERDAL, B. - 1994 - The Physiological Role of Lactoferrin. In "Indigenous Antimicrobial Agents of Milk - Recent Developments". pp 97 - 107. Publ. International Dairy Federation. Brussels. 228pp.

HARDIE, J.M. - 1986 - Genus *Streptococcus*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 12 - Gram-Positive Cocci. pp 1043 - 1063. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins.

HÉCHARD, Y., RENAULT, D., CENATIEMPO, Y., LETELLIER, F., MAFTAH, A., JAYAT, C., BRESSOLIER, P., RATINAUD, M.H., JULIEN, R., FLEURY, Y., DELFOUR, A. - 1993 - Les Bactériocines contre *Listeria*: Une Nouvelle Famille de Protéines?. Lait. 73 : 207 - 213.

HEMME, D., BOUILLANNE, C., MÉTRO, F., DESMAZEAUD, M.J. - 1982 - Microbial Catabolism of Amino Acids During Cheese Ripening. Sci. Alim. 2 : 113 - 123.

HICKEY, M.W., HILLIER, A.J., JAGO, G.R. - 1986 - Transport and Metabolism of Lactose, Glucose, and Galactose in Homofermentative *Lactobacilli*. Appl. Environ. Microbiol. 51 : 825 - 831.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. - 1994 - Group 17 - Gram-positive Cocci. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". pp 527 - 558. 9th Edition. Ed. by Hensyl, W.R. Williams and Wilkins. USA.

HUANG, D.Q., PRÉVOST, H., DIVIÈS, C. - 1994 - Interrelationship of Sugar Metabolism (Glucose, Galactose, Lactose) by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Lait 74 : 207 - 215.

HUGENHOLTZ, J. - 1993 - Citrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12 : 165 - 178.

HUGENHOLTZ, J., STARRENBURG, M.J.C. - 1992 - Diacetyl Production by Different Strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. Appl. Microbiol. Biotechnol 38 : 17 - 22.

HUTKINS, R.W., NANNEN, N.L. - 1993 - pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. J. Dairy Sci. 76 : 2354 - 2365.

HUTKINS, R.W., PONNE, C. - 1991 - Lactose Uptake Driven by Galactose Efflux in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for a Galactose-Lactose Antiporter. Appl. Environm. Microbiol. 57 : 941 - 944.

ICMSF - 1993 - Microbial Ecology of Foods. Volume 1 - Factors Affecting Life and Death of Microorganisms. - International Commission on Microbiological Specifications For Foods. Academic Press Limited. London. 332 pp.

JACK, R.W., TAGG, J.R., RAY, B. - 1995 - Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Microbiol. Rev. 59 : 171 - 200.

JAY, J.M. - 1991 - History of Microorganisms in Food. In "Modern Food Microbiology". 4th Ed. pp3-10. Chapman & Hall.

JAY, J.M. - 1992 - Modern Food Microbiology. 4th Ed. Chapman & Hall. 701 pp.

JAY, J.M. - 1994 - Indicator Organisms in Foods. In "Foodborne Disease Handbook. Diseases Caused by Bacteria". Vol.I. pp 537 - 546. Ed. Y.H.Hui, J.R.Gorham, K.D.Murrell, D.O.Cliver. Marcel Dekker, Inc. 613 pp.

JOHNSON, M.E. - 1998 - Cheese Products. In "Applied Dairy Microbiology". pp 213 - 249. Ed. E.H.Marth e J.L.Steele. Marcel Dekker, Inc. 516pp.

KAISER, A.L., MONTVILLE, T.J. - 1996 - Purification of the Bacteriocin Bavaricin MN and Characterization of its Mode of Action Against *Listeria monocytogenes* Scott A Cells and Lipid Vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 4529 - 4535.

KAKINUMA, Y. - 1998 - Inorganic Cation Transport and Energy Transduction in *Enterococcus hirae* and Other Streptococci. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 : 1021 - 1045.

KALCHAYANAND, N., HANLIN, M.B., RAY, B. - 1992 - Sublethal Injury Makes Gram-negative and Resistant Gram-positive Bacteria Sensitive to the Bacteriocins, Pediocin AcH and Nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 15 : 239 - 243.

KAMAU, D.N., DOORES, S., PRUITT, K.M. - 1990 - Enhanced Thermal Destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the Lactoperoxidase System. *Appl. Environm. Microbiol.* 56 : 2711 - 2716.

KANDLER, O. - 1983 - Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49 : 209 - 224.

KANDLER, O., WEISS, N. - 1986 - Genus *Lactobacillus*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 14 - Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. pp 1209 - 1234. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins.

KASHKET, E.R. - 1987 - Bioenergetics of Lactic Acid Bacteria: Cytoplasmic pH and Osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* 46 : 233 - 244.

KERR, K.G., BIRKENHEAD, D., SEALE, K., MAJOR, J., HAWKEY, P.M. - 1993 - Prevalence of *Listeria* spp on the Hands of Food Workers. *J. Food Protect.* 56 : 525 - 527.

KHALID, N., EL SODA, M., MARTH, E.H. - 1991 - Peptide Hydrolases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 74 : 29 - 45.

KHALID, N.M., MARTH, E.H. - 1990a - Lactobacilli - Their Enzymes and Role in Ripening and Spoilage of Cheese: A Review. *J. Dairy Sci.* 73 : 2669 - 2684.

KHALID, N.M., MARTH, E.H. - 1990b - Proteolytic Activity by Strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.* 73 : 308 - 3076.

KLOSS, W.E., SCHLEIFER, K.H. - 1986 - Genus IV *Staphylococcus*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 12 - Gram-Positive Cocci. pp 1013 - 1035. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins. 1599 pp.

KNUDTSON, L.M., HARTMAN, P.A. - 1992 - Routine Procedures for Isolation and Identification of Enterococci and Fecal Streptococci. *Appl. Environm. Microbiol.* 58 : 3027 - 3031.

KOK, J. - 1993 - Genetics of Proteolytic Enzymes of Lactococci and their Role in Cheese Flavour Development. *J. Dairy Sci.* 76 : 2056 - 2064.

KRYSINSKI, E.P., BROWN, L.J., MARCHISELLO, T.J. - 1992 - Effect of Cleaners and Sanitizers on *Listeria monocytogenes* Attached to Product Contact Surfaces. *J. Food Protect.* 55 : 246 - 251.

KUNJI, E.R.S., MIERAU, I., HAGTING, A., POOLMAN, B., KONINGS, W.N. - 1996 - The Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70 : 187 - 221.

LARSEN, A.G., NØRRUNG, B. - 1993 - Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a Bavaricin A, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Lett. Appl. Microbiol.* 17 : 132 - 134.

LAW, B.A., KOLSTAD, J. - 1983 - Proteolytic Systems in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49 : 225 - 245.

LAW, J., FITZGERALD, G.F., UNIACKE-LOWE, T., DALY, C., FOX, P.F. - 1993 - The Contribution of Lactococcal Starter Proteinases to Proteolysis in Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* 76 : 2455 - 2467.

LAWRENCE R.C., GILLES, J., CREAMER, L.K. - 1993 - Cheddar Cheese and Related Dry-salted Cheese Varieties. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. II - Major Cheese Groups" pp. 1 - 38. Ed. P.F. Fox. Chapman & Hall. 577 pp.

LECLERC, H., DEVRIESE, L.A., MOSSEL, D.A.A. - 1996 - Taxonomical Changes in Intestinal (Faecal) Enterococci and Streptococci: Consequences on their Uses as Indicators of Faecal Contamination in Drinking Water. *J. Appl. Bact.* 81 : 459 - 466.

LEDDA, A., SCINTU, M.F., PIRISI, A., SANNA, S., MANNU, L. - 1994 - Caratterizzazione Tecnologica di Ceppi de Lattococchi e di Enterococchi per la Produzione di Formaggio Pecorino Fiore Sardo. *Sci. e Tecn. latt.-cas.*, 45 : 443 - 456.

LEDFORD, R.A. - 1998 - Raw Milk and Milk Products. In "Applied Dairy Microbiology". pp 55 - 64. Ed. E.H.Marsh, J.Steele. Marcel Dekker Inc. 516 pp.

LEMIEUX, L., SIMARD, R.E. - 1991 - Bitter Flavour in Dairy Products: I - A Review of Factors Likely to Influence its Development Mainly in Cheese Manufacture. *Lait* 71 : 599 - 636.

LEMIEUX, L., SIMARD, R.E. - 1992 - Bitter Flavour in Dairy Products. II. A Review of Bitter Peptides from Caseins: Their Formation, Isolation and Identification, Structure Masking and Inhibition. *Lait* 72 : 335 - 382.

LeMINOR, L. - 1984 - Genus III. Salmonella. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 1 - Section 5 - Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods. pp427 - 458. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins. 964 pp.

LETONDEUR-LAFARGE, V., LAHELLEC, C. - 1997 - Aspects Hygiéniques. In "Le Fromage". pp. 741 - 757. 3^e Ed. Coord. A. Eck, J.-C. Gillis. Ed. Lavoisier Tec&Doc. Paris. 891 pp.

LINDEN, G., CHAMBA, J.F. - 1994 - La Typicité des Fromages: Une Réalité, Un Objectif. *Sci. Alim.* 14 : 573 - 580.

LINDGREN, S.E., DOBROGOSZ, W.J. - 1990 - Antagonistic Activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87 : 149 - 164.

LITOPOULOU-TZANETAKI, E., GRAHAM, D.C., BEYATLI, Y. - 1989 - Detection of Pediococci and Other Nonstarter Organisms in American Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* 72 : 854 - 858.

LÓPEZ, S., MAYO, B. - 1997 - Identification and Characterization of Homofermentative Mesophilic *Lactobacillus* Strains Isolated from Artisan Starter-free Cheeses. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25 . 233 - 238.

LÓPEZ-DIAZ, T.M., ALONSO, C., GARCÍA-LÓPEZ, M.L., MORENO, B. - 2000 - Lactic Acid Bacteria Isolated from a Hand-made Blue Cheese. *Food Microbiol.* 17 : 23 - 32.

LOUREIRO, V., FERREIRA, M.M. - 1992 - Yeasts in Food Spoilage. In "Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition" pp 4344 - 4349. Academic Press Ltd. London.

LUCEY, J.A., FOX, P.F. - 1993 - Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: A Review. *J. Dairy Sci.* 76 : 1714 - 1724.

MACEDO, A. - 1996 - Microbiological, Chemical, Biochemical, and Technological Contributions to the Characterization and Improvement of Serra da Estrela Cheese. PhD Thesis. Escola Superior de Biotecnologia. Universidade Católica Portuguesa.

MACEDO, A.C., MALCATA, F.X., HOGG, T.A. - 1995 - Microbiological Profile in Serra Ewes' Cheese During Ripening. J. Appl. Bacteriol. 79 : 1 - 11.

MAFU, A.A., ROY, D., GOULET, J., SAVOIE, L., ROY, R. - 1990 - Efficiency of Sanitizing Agents for Destroying *Listeria monocytogenes* on Contaminated Surfaces. J. Dairy Sci. 73 : 3428 - 3432.

MAIPA, V., PAPADOPOULOU, C., PAPPAS, C., DIMITRIOU, D., VOUTSINAS, L., MALATOU, H. - 1993 - Survival of *Salmonella enteritidis* During the Manufacture of Feta Cheese Made of Pasteurized Ewe's Milk. Zentralbl. Mikrobiol. 148 : 66 - 73.

MALASSIS, L. - 1993 - Alimentar os Homens. Biblioteca Básica de Ciência e Cultura. Instituto Piaget. 143pp.

MANFREDINI, M., MASSARI, M. - 1989 - Small Ruminant Milk. Technological Aspects: Storage and Processing. Options Mediterr. Ser. Sem. 6 : 191 - 198.

MARCOS, A., FERNANDEZ-SALGUERO, J., ESTEBAN, M^ªA., LEÓN, F., ALCALÁ, M., BELTRÁN DE HEREDIA, F.H. - 1985 - Quesos Españoles. Tablas de Composicion Valor Nutritivo y Estabilidad. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cordoba. Monografias 9. 236pp.

MARSHALL, D.L., SCHMIDT, R.H. - 1991 - Physiological Evaluation os Stimulated Growth of *Listeria monocytogenes* by *Pseudomonas* Species in Milk. Can. J. Microbiol. 37 : 594 - 599.

MARSHALL, V.M. - 1992 - Inoculated Ecosystems in a Milk Environment. J. Appl. Bact. Symp. Suppl. 73 : 127S - 135S.

MARSHALL, V.M.E., TAMINE, A.Y. - 1997 - Physiology and Biochemistry of Fermented Milks. In "Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk". Pp 153 -192. Ed. B.A.Law. 2nd Ed. Blackie Academic & Professional. 363 pp.

MARTIN, S.E., MYERS, E.R. - 1994 - *Staphylococcus aureus*. In "Foodborne Disease Handbook. Diseases Caused by Bacteria". Vol.I. pp 345 - 394. Ed. Y.H.Hui, J.R.Gorham, K.D.Murrell, D.O.Cliver. Marcel Dekker, Inc. 613 pp.

MÁS, M., GONZALEZ CRESPO, J. - 1992 - Bactérias Lácticas en el Queso de los Ibores. Alimentaria Marzo92 : 41 - 43.

- MÁS, M., GONZALEZ CRESPO, J. - 1993 - Control de Microorganismos patógenos en Queso de los Ibores. Alimentaria. Marzo93 : 41 - 44.
- MÁS, M., GONZALEZ, J., NIETO, M.J. - 1991 - Queso del Casar: Caracterización Productiva Físico-Química y Microbiológica. Arch. Zootec. 40 : 359 - 369.
- MATHIEU, F., SUWANDHI, I.S., REKHIF, N., MILLIÈRE, J.B., LEFEBVRE, G. - 1993 - Mesenterocin 52, a Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR52. J. Appl. Bact. 74 : 372 - 379.
- MÄYRÄ-MÄKINEN, A., BIGRET, M. - 1993 - Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. In "Lactic Acid Bacteria" pp 65-95. Ed. S. Salminen, A. von Wright. Marcel Dekker Inc. 442 pp.
- Mc KELLAR, R.C. - 1994 - Identification of the *Listeria monocytogenes* Virulence Factors Involved in the CAMP Reaction. Lett. Appl. Microbiol. 18 : 79 - 81.
- Mc SWEENEY, P.L.H., FOX, P.F., LUCEY, J.A., JORDAN, K.N., COGAN, T.M. - 1993 - Contribution of the Indigenous Microflora to the Maturation of Cheddar Cheese. Int. Dairy J. 3 : 613 - 634.
- MEDEIROS, C.L. - 1994 - Preâmbulo. In "Os Queijos Tradicionais do Alentejo" Ed. Programa de Artes e Ofícios Tradicionais. Instituto de Financiamento e Apoio ao Desenvolvimento da Agricultura e Pescas. Lisboa. 219 pp.
- MEHTA, A., TATINI, S.R. - 1994 - An Evaluation of the Microbiological Safety of Reduced-Fat Cheddar-like Cheese. J. Food Protect. 57 : 776 - 779, 782.
- MEYER, D.H., DONNELLY, C.W. - 1992 - Effect of Incubation Temperature on Repair of Heat-Injured *Listeria* in Milk. J. Food Protect. 55 : 579 - 582.
- MEYRAND, A., BOUTRAND-LOEI, S., RAY-GUENIOT, S., MAZUY, C., GASPARD, C.E., JAUBERT, G., PERRIN, G., LAPEYRE, C., VERNZOY-ROZAND, C. - 1998 - Growth and Enterotoxin Production of *Staphylococcus aureus* During the Manufacture and Ripening of Camembert-Type Cheeses from Raw Goats' Milk. J. Appl. Microbiol. 85 : 537 - 544.
- MIKELSAAR, M., MÄNDAR, R. - 1993 - Development of Individual Lactic Acid Microflora in the Human Microbial Ecosystem. In "Lactic Acid Bacteria" pp 237 - 293. Ed. S. Salminen, A. von Wright. Marcel Dekker Inc. 442 pp.

MOLIMARD, P., SPINLER, H.E. - 1996 - Review: Compounds Involved in the Flavour of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *J. Dairy Sci.* 79 : 169 - 184.

MONNET, C., SCHMITT, P., DIVIES, C. - 1994 - Diacetyl Production in the Milk by an α -Acetolactic Acid Accumulating Strain of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*. *J. Dairy Sci.* 77 : 2916 - 2924.

MONSALLIER, G. - 1994 - Maîtrise de la Teneur en Germes Mésophiles Totaux du Lait à la Production. *Rec. Med. Vet.* 170 : 411 - 418.

MOR-MUR, M., CARRETERO, C., PLA, R., GUAMIS, B. - 1994 - Microbial Changes During Ripening of Cendrat del Montsec, a Goats' Milk Cheese. *Food Microbiol.* 11 : 177 - 185.

MOSSEL, D.A.A., P. van NETTEN - 1990 - *Staphylococcus aureus* and Related Staphylococci in Foods: Ecology, Proliferation, Toxinogenesis, Control and Monitoring. *J. Appl. Bact. Symp. Suppl.* 69: 123S - 145S

MOTLAGH, A.M., JOHNSON, M.C., RAY, B. - 1991 - Viability Loss of Foodborne Pathogens by Starter Culture Metabolites. *J. Food Protect.* 54 : 873 - 878, 884.

MULHOLLAND, F. - 1997 - Proteolytic Systems of Dairy Lactic Acid Bacteria. In "Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk". pp299 - 318. Ed. B.A.Law. 2nd Edition. Blackie Academic & Professional. 363pp.

MUNDT, J.O. - 1986 - Enterococci. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 12 - Gram-Positive Cocci. pp1063 - 1065. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins. 964 pp.

NANNEN, N.L., HUTKINS, R.W. - 1991a - Intracellular pH Effects in Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 74 : 741 - 746.

NANTET, B. - 1994 - Le Goût du Fromage. Flammarion.

NETTLES, C.G., BAREFOOT, S.F. - 1993 - Biochemical and Genetic Characteristics of Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria. *J. Food Protect.* 56 : 338 - 356.

NEVIANI, E., GIRAFFA, G., BRIZZI, A., CARMINATI, D. - 1995 - Amino Acid Requirements and Peptidase Activities of *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*. *J. Appl. Bact.* 79 : 302 - 307.

NOUSIAINEN, J., SETÄLÄ, J. - 1993 - Lactic Acid Bacteria as Animal Probiotics. In "Lactic Acid Bacteria" pp 315 - 356. Ed. by Salminen, S. and von Wright, A. Marcel Dekker, Inc.

NP 4196 - 1992 - Microbiologia Alimentar. Regras Gerais para a Contagem de *Staphylococcus aureus* a 37°C.

NUÑEZ, M., FERNANDEZ DEL POZO, B., RODRÍGUEZ-MARIN, M.A., GAYA, P., MEDINA, M. - 1991 - Effect of Vegetable and Animal Rennet on Chemical, Microbiological, Rheological and Sensory Characteristics of La Serena Cheese. J. Dairy Res. 58 : 511 - 519.

NUÑEZ, M., GAYA, P., MEDINA, M. - 1985 - Influence of Manufacturing and Ripening Conditions on the Survival of *Enterobacteriaceae* in Manchego Cheese. J. Dairy Sci. 68 : 794 - 800.

NUÑEZ, M., RODRÍGUEZ, J.L., GARCÍA, E., GAYA, P., MEDINA, M., - 1997 - Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Enterocin 4 During the Manufacture and Ripening of Manchego Cheese. J. Appl. Microbiol. 83 : 671 - 677.

NURAIIDA, L., GRIGOLAVA, I., OWENS, J.D., CAMPBELL-PLATT, G. - 1992 - Oxygen and Pyruvate as External Electron Acceptors for *Leuconostoc* spp. J. Appl. Bact. 72 : 517 - 522.

OLIVEIRA, C.P. - 1994 - Os Queijos Tradicionais do Alentejo. Ed. Programa de Artes e Ofícios Tradicionais. Instituto de Financiamento e Apoio ao Desenvolvimento de Agricultura e Pescas. Lisboa. 219 pp.

OLSON, N.F. - 1990 - The Impact of Lactic Acid Bacteria on Cheese Flavour. FEMS Microbiol. Rev. 87 : 131 - 148.

ÖSTLING, C.E., LINDGREN, S.E. - 1993 - Inhibition of Enterobacteria and *Listeria* Growth by Lactic, Acetic and Formic Acids. J. Appl. Microbiol. 75 : 18 - 24.

PALEARI, M.A., SONCINI, G., BERETA, G., DRAGONI, I., PIANTONI, L. - 1991 - A Study on a Typical Mountain Raw Milk Cheese. Sci. des Alim. 13 : 723 - 735.

PAPADOPOULOU, C., MAIPA, V., DIMITRIOU, D., PAPPAS, C., VOUTSINAS, L., MALATOU, H. - 1993 - Behavior of *Salmonella enteritidis* During the Manufacture, Ripening, and Storage of Feta Cheese Made from Unpasteurized Ewes' Milk. J. Food Protect. 56 : 25 - 28, 41.

- PAPAGEORGIU, D.K., BORI, M., MANTIS, A. - 1996 - Growth of *Listeria monocytogenes* in the Whey Cheeses Myzithra, Anthotyros, and Manouri during Storage at 5, 12 and 22°C. J. Food Protect. 59 : 1193 - 1199.
- PARENTE, E., HILL, C. - 1992a - A Comparison of Factors Affecting the Production of Two Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. J. Appl. Bact. 73 : 290 - 298.
- PARENTE, E., HILL, C. - 1992b - Characterization of Enterocin 1146, a Bacteriocin from *Enterococcus faecium* Inhibitory to *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 55 : 497 - 502.
- PARENTE, E., HILL, C. - 1992c - Inhibition of *Listeria* in Buffer, Broth, and Milk by Enterocin 1146, a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium*. J. Food Protect. 55 : 503 - 508.
- PARENTE, E., RICCIARDI, A., ADDARIO, G. - 1994 - Influence of pH on Growth and Bacteriocin Production by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 140NWC During Batch Fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 : 388 - 394.
- PEARSON, L.J., MARTH, E.H. - 1990 - *Listeria monocytogenes* - Threat to a Safe Food Supply: A Review. J. Dairy Sci. 73 : 912 - 928.
- PETERSON, S.D., MARSHALL, R.T. - 1990 - Nonstarter Lactobacilli in Cheddar Cheese: A Review. J. Dairy Sci. 73 : 1395 - 1410.
- PETRONE, G., CONTE, M.P., LONGHI, C., di SANTO, S., SUPERTI, AMMENDOLIA, VALENTI, P., SEGANTI, L. - 1998 - Natural Milk Fatty Acids Affect Survival and Invasiveness of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 27 : 362 - 368.
- PIARD, J.C., DESMAZEAUD, M. - 1991 - Inhibiting Factors Produced by Lactic Acid Bacteria. 1- Oxygen Metabolites and Catabolism End-Products. Lait 71 : 525 - 541.
- PIARD, J.C., DESMAZEAUD, M. - 1992 - Inhibiting Factors Produced by Lactic Acid Bacteria. 2 - Bacteriocins and Other Antibacterial Substances. Lait 72 : 113 - 142.
- PICÃO, J.S. - 1947 - Através dos Campos. Usos e Costumes Agrícola-Alentejanos. (Concelho de Elvas). Neogravura, Lda. Lisboa. 2ª Ed. 370 pp
- PICCININ, D.M., SHELEF, L.A. - 1995 - Survival of *Listeria monocytogenes* in Cottage Cheese. J. Food Protect. 58 : 128 - 131.

PINHEIRO, C., BANKS, J., BRECHANY, E. - 1998a - Amino Acid Profile in Évora Cheese Manufactured with Calf Rennet or an Extract from *Cynara*. "Qualité et Microbiologie des Fromages Traditionnels et au Lait Cru". Dijon, 30Nov-1Dec.

PINHEIRO, C., BANKS, J., BRECHANY, E. - 1998b - Volatile Componens in Évora Cheeses Manufactured with Calf Rennet or an Extract from *Cynara*. "Qualité et Microbiologie des Fromages Traditionnels et au Lait Cru". Dijon, 30 Nov-1Dec.

PINHEIRO, C.S.C., MARINHO, A.A.M., POTES, E.S., BENTO, O.P., ABREU, M.C. - 1993 - The Artisanal Cheese and its Variability. In "Proceedings of the International Symposium on Animal Production and Rural Tourism in Mediterranean Regions". EAAP Publication 74 : 111 - 116.

PLATTEEUW, C., HUGENHOLTZ, J., STARRENBURG, M., vanALLEN-BOERRIGTER, I., deVOS, W.M. - 1995 - Metabolic Engineering of *Lactococcus lactis*: Influence of the Overproduction of α -Acetolactate Synthase in Strains Deficient in Lactate Dehydrogenase as a Function of Culture Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 3967 - 3971.

PLOMMET, M., FENSTERBANK, R., VASSAL, L., AUCLAIR, J., MOCQUOT, G., VACHOT, J.C., COURAULT, M., MUSSET, D. - 1988 - Survival of *Brucella abortus* in Ripened Soft Cheese Made from Naturally Infected Cow's Milk. Lait 68 : 115 - 120.

PLUSQUELLEC, A. - 1995 - Milk and Dairy Products. In "Microbiological Control for Foods and Agricultural Products". pp 395 - 414.

POOLMAN, B. - 1993 - Energy Transduction in Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12 : 125 - 148.

POOLMAN, B., KUNJI, E.R.S., HOGTING, A., JUILLARD, V., KONINGS, W.N. - 1995 - The Proteolytic Pathway of *Lactococcus lactis*. J. Appl. Bact. 55 : 655 - 755.

POULLET, B., HUERTAS, M., SÁNCHEZ, A., CÁCERES, P., LARRIBA, G. - 1993 - Main Lactic Acid Bacteria Isolated During Ripening of Cásra de Cáceres Cheese. J. Dairy Res. 60 : 123 - 127.

POULLET, B., HUERTAS, M., SÁNCHEZ, A., CÁCERES, P., LARRIBA, G. - 1991 - Microbial Study of Casar de Cáceres Cheese Throughout Ripening. J. Dairy Res. 58 : 231 - 238.

- PRENTICE, G.A. - 1994 - *Listeria monocytogenes*. In "The Significance of Pathogenic Microorganisms in Raw Milk". pp 101 - 115. Publ. International Dairy Federation. Brussels. 215 pp.
- PRITCHARD, G.G., COOLBEAR, T. - 1993 - The Physiology and Biochemistry of the Proteolytic System in Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12 : 179 - 206.
- PRUITT, K.M., KAMAU, D.N. - 1994 - Quantitative Analysis of Bovine Lactoperoxidase System Components and of the Effects of the Activated System on Bacterial Growth and Survival. In "Indigenous Antimicrobial Agents of Milk - Recent Developments" pp 73 - 87 Publ. International Dairy Federation. Brussels. 228 pp
- QUEIROGA, M.C., MARCELINO, P.P., ESPADANEIRA, E.M., VILELA, C.L. - 1997 - Rastreo de Mamites em Ovinos: Estudo Preliminar. Vet Técnica Abril 97 : 52 - 55.
- RACCACH, M., GESCHELL, D.J. - 1993 - The Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Milk by *Pediococci*. Food Microbiol. 10 : 181 - 186.
- RADFORD, S.A., BOARD, R.G. - 1995 - The Influence of Sodium Chloride and pH on the Growth of *Salmonella enteritidis* PT4. Lett. Appl. Microbiol. 20 : 11 - 13.
- RAMET, J.-P. - 1997 - Généralités - Technologie Comparée de L'Affinage des Différents Types de Fromages. In "Le Fromage". pp. 447 - 467. 3^e Ed. Coord. A.Eck J.-C. Gillis. Ed Lavoisier Tec&Doc. Paris. 891 pp.
- REID, J.R., COOLBEAR, T., PILLIDGE, C.J., PRITCHARD, G.G. - 1994 - Specificity of Hydrolysis of Bovine κ -Casein by Cell-Envelope-Associated Proteinase from *Lactococcus lactis* Strains. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 801 -806.
- REMEUF, F. - 1994 - Relations entre Caractéristiques Physico-chimiques et Aptitudes Fromagères des Laits. Rec. Méd. Vét. 170 : 359 - 365.
- REMEUF, F., COSSIN, V., DERVIN, C., LENOIR, J., TOMASSONE, R. - 1991 - Relations entre les Caractères Physico-Chimiques des Laits et Leur Aptitude Fromagère. Lait 71 : 397 - 421.
- RENNER, E. - 1988 - Milk in Human Nutrition. In "Meat Science, Milk Science and Technology" pp 393 - 420. Ed. H.R.Cross, A.J.Overby. World Animal Science B3 Elsevier Science Publishers. 458 pp.

- RIBEIRO, O. - 1986 - Portugal o Mediterrâneo e o Atlântico. Esboço de Relações Geográficas. Coleção "Nova Universidade". Livraria Sá da Costa Editora. 4ª Ed. 189 pp
- RICHARD, J., DESMAZEAUD, M. - 1997 - Le Lait de Fromagerie. In "Le Fromage". pp. 202 - 211. 3º Ed. Coord. A.Eck J.-C. Gillis. Ed Lavoisier Tec&Doc. Paris. 891 pp.
- RODRIGUES, H.S., SOUSA, J.G.C. - 1942 - Estudo sobre o queijo tipo "Serra da Estrela". Relatório dos trabalhos realizados em 1941 no Posto de Lacticínios de Canas de Senhorim. Série "Estudo e Informação Técnica. Nº16 Repartição de Estudos Informação e Propaganda. Ministério da Economia. Direcção Geral dos Serviços Agrícolas.
- RODRÍGUEZ, E., TOMILLO, J., NUÑEZ, M., MEDINA, M. - 1997 - Combined Effect of Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria and Lactoperoxidase System Activation on *Listeria monocytogenes* in Refrigerated Raw Milk. J. Appl. Microbiol. 83 : 389 - 395.
- ROHM, H., ELISKASES-LECHNER, F., BRÄUER, M. - 1992 - Diversity of Yeasts in Selected Dairy Products. J. Appl. Bact. 72 : 370 - 376.
- ROSA-LIMPO, B., CANTO, J.B., CAETANO, M.M.L. - 1997 - O Livro de Pantagruel. Ed. Círculo de Leitores. 1191 pp
- ROSSI, J., DURANI, C., GOBBETTI, M. - 1994b - Indagine Preliminare Sull'Impiego di Enterococchi nella Produzione di Fromaggio Pecorino Umbro. Ind. Latte 2-3 : 41 - 53.
- ROSSI, J., GOBBETTI, M., DURANI, C. - 1994a - Identificazione della Microflora del Fromaggio Pecorino Prodotto nella Regione Umbria. Ind. Latte 2-3 : 19 - 39.
- RYSER, E.T. - 1998 - Public Health Concerns. In "Applied Dairy Microbiology" pp263 - 404. Ed. E.H.Marsh, J.Steele. Marcel Dekker Inc. 516 pp.
- RYSER, E.T., MARTH, E.H. - 1989 - Behavior of *Listeria monocytogenes* During Manufacture and Ripening of Brick Cheese. J. Dairy Sci. 72 : 838 - 853.
- RYSER, E.T., MARTH, E.M. - 1987 - Behavior of *Listeria monocytogenes* During the manufacture and Ripening of Cheddar Cheese. J. Food Protect. 50 : 7 - 13.
- SÁ, F.V., BARBOSA, M. - 1984 - Queijos Portugueses. DTIA, Nº 49, Comunicações e Conferências nº 38. 23 pp. Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial. Instituto de Tecnologia Industrial. Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares. Lisboa.

SALLAN, S.S., DONNELLY, C.W. - 1992 - Detection, Injury, and Repair of *Listeria* Species Exposed to Sanitizing Compounds. *J. Food Protect.* 55 : 771 - 776.

SALMINEN, S., DEIGHTON, M., GORBACH, S. - 1993 - Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. In "Lactic Acid Bacteria" pp 199 - 225 Ed. by Salminen, S. and von Wright, A. Marcel Dekker, Inc.

SALMINEN, S., von WRIGHT, A. - 1993 - Preface. In "Lactic Acid Bacteria" pp iii - iv. Ed. by Salminen, S. and von Wright, A. Marcel Dekker, Inc.

SANAA, M., MÉNARD, J.L. - 1994 - Contamination du Lait Cru par *Listeria monocytogenes*: Origines, Facteurs de Risque, Prévention. *Rec. Med. Vet.* 170 : 437 - 442.

SANAA, M., POUTREL, B., MENARD, J.L., SERIEYS, F. - 1993 - Risk Factors Associated with Contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes* in Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* 76 : 2891 - 2898.

SANCHÉZ, D., CARMONA, M.A., GÓMEZ, R., FERNANDEZ-SALGUERO, J. - 1995 - Evolución de Algunos Grupos Microbianos Durante la Maduración del Queso de los Pedroches. *Alimentaria.* Jun95 : 87 - 90.

SANCHÉZ, D., MATA, C., VIOQUE, M., GÓMEZ, R., FERNANDEZ-SALGUERO, J. - 1998 - Câmbios Microbiológicos en Quesos de Oveja Artesanos Durante el Almacenamiento en Congelación. I - Flora Indicadora y Patógena. *Alimentaria.* Abril98 : 77 - 82.

SANTOS, M.I.S., CORREIA, C.B., NOVAIS, M.R., NOGUEIRA, P.J. - 1994/95 - Determinação de *Listeria* sp. em Queijos de Pasta Mole de Produção Nacional: Comparação de Métodos. *Arq. Inst. Nac. Saúde* 20-21 : 43 : 53.

SCHAFFER, S., TATINI, S.R., BAER, R.J. - 1995 - Microbiological Safety of Blue and Cheddar Cheeses Containing Naturally Modified Milk Fat. *J. Food Protect.* 58 : 132 - 138.

SCHLEIFER, K.H. - 1986 - Family I - Micrococcaceae. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 12 - Gram-positive Cocci. pp 1003. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins. 1599 pp.

SCHLEIFER, K.H. - 1987 - Recent Changes in the Taxonomy of Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 46 : 201 - 203.

- SCHMITT, P., DIVIÈS, C., CARDONA, R. - 1992 - Origin of End-Products from the Co-Metabolism of Glucose and Citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 679 - 683.
- SCHOFIELD, G.M. - 1992 - Emerging Food-Borne Pathogens and Their Significance in Chilled Foods. J. Appl. Bacteriol. 72 : 267 - 273.
- SEELIGER, H.P.R., JONES, D. - 1986 - Genus *Listeria*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 14 - Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. pp 1235 - 1245. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins. 1599 pp.
- SERVER-BUSSON, C., FOUCAUD, C., LEVEAU, J.-Y. - 1999 - Selection of Dairy *Leuconostoc* Isolates for Important Technological Properties. J. Dairy Res. 66 : 245 - 256.
- SILVA, A.D. - 1994 - Queijo de Évora. Contributo para o seu Estudo. Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Zootécnica. Universidade de Évora. 218 pp e anexos.
- SPAHR, U., URL, B. - 1994 - Behaviour of Pathogenic Bacteria in Cheese - A Synopsis of Experimental Data. Bull IDF 298 : 1 - 16.
- STADHOUDERS, J., BEUMEN, R.R. - 1994 - Actual and Potential Applications of the Natural Antimicrobial Agents of Milk in the Dairy Industry. In "Indigenous Antimicrobial Agents of Milk - Recent Developments" pp 175 - 197 Publ. International Dairy Federation. Brussels. 228 pp
- STARRENBURG, M.J.C., HUGENHOLTZ, J. - 1991 - Citrate Fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* ssp. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 3535 - 3540.
- STEELE, J.L. - 1998 - Genetics and Metabolism of Starter Cultures. In "Applied Dairy Microbiology" pp173 - 193. Ed. E.H.Marsh, J.Steele. Marcel Dekker Inc. 516 pp.
- STEVENS, K.A., SHELDON, B.W., KLAPES, N.A., KLAENHAMMER, T.R. - 1991 - Nisin Treatment for Inactivation of *Salmonella* Species and Other Gram-negative Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 3613 - 3615.
- STILES, M.E. - 1996 - Biopreservation by Lactic Acid Bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70 : 331 - 345.
- TAGG, J.R., DAJANI, A.S., WANNAMAKER, L.W. - 1976 - Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. Bacteriol. Rev. 40 : 722 - 756.

- TAHARA, T., KANATANI, K. - 1996 - Isolation, Partial Characterization and Mode of Action of Acidocin J1229, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. J. Appl. Bact. 81 : 669 - 677.
- TANASUPAWAT, S., EZAKI, T., SUZUKI, K-I., OKADA, S., KOMAGATA, K., KOZAKI, M. - 1992 - Characterization and Identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* Strains from Fermented Foods in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 38 : 121 - 134.
- TARELLI, G.T., CARMINATI, D., GIRAFFA, G. - 1994 - Production of Bacteriocins Active Against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from Dairy Enterococci. Food Microbiol. 11 : 243 - 252.
- TATINI, S.R., JEZESKI, J.J., MORRIS, H.A., OLSON, J.C., CASMAN, E.P. - 1971 - Production of Staphylococcal Enterotoxin A in Cheddar and Colby Cheeses. J. Dairy Sci. 54 : 815 - 825.
- TEIXEIRA, J.A. - 1994 - A Industrialização e o seu Desenvolvimento. In " Portugal - Perfil Geográfico". Dir. R.S.Brito. Ed. Estampa. 415 pp.
- THARRINGTON, G., SORRELLS, K.M. - 1992 - Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Milk Culture Filtrates from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. J. Food Protect. 55 : 542 - 544.
- THOMAS, T.D., PRITCHARD, G.G. - 1987 - Proteolytic Enzymes of dairy Starter Cultures. FEMS Microbiol. Rev. 46 : 245 - 268.
- THUNELL, R.K. - 1995 - Taxonomy of Leuconostoc. J. Dairy Sci. 78 : 2514 - 2522.
- TOKUOKA, K. - 1993 - Sugar- and Salt-Tolerant Yeasts. J. Appl. Bacteriol. 74 : 101 - 110.
- TOMITA, M. - 1994 - Active Peptides of Lactoferrin. In "Indigenous Antimicrobial Agents of Milk - Recent Developments" pp 7 - 13 Publ. International Dairy Federation. Brussels. 228 pp
- TORNADIJO, E., FRESNO, J.M., CARBALLO, J., MARTIN-SARMIENTO, R. - 1993 - Study of *Enterobacteriaceae* Throughout the Manufacture and Ripening of Hard Goats' Cheese. J. Appl. Bacteriol. 75 : 240 - 246.
- TORNADIJO, M.E., FRESNO, J.M., BERNARDO, A., MARTÍN SARMIENTO, R., CARBALLO, J. - 1995 - Microbiological Changes Throughout the Manufacturing and Ripening of a Spanish Goat's Raw Milk Cheese (Armada Variety. Lait 75 : 551 - 570.

TSAKALIDOU, E., KALANTZOPOULOS, G. - 1992 - Purification and Partial Characterization of an Esterase from *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* Strain ACA-DC 127. Lait 72 : 533 - 543.

TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. - 1989 - Biochemical Activities of *Pediococcus pentosaceus* Isolates of Dairy Origin. J. Dairy Sci. 72 : 859 - 863.

TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. - 1992 - Changes in Numbers and Kinds of Lactic Acid Bacteria in Feta and Teleme, Two Greek Cheeses from Ewes' Milk. J. Dairy Sci. 75 : 1389 - 1393

TZANETAKIS, N., VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI, A., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. - 1995 - The Quality of White-Brined Cheese from Goat's Milk Made With Different Starters. Food Microbiol. 12 : 55 - 63.

VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI, A., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., TZANETAKIS, N. - 1996 - Esterases Activities of Cell-Free Extracts from 'Wild' Strains of *Leuconostoc* and Heterofermentative *Lactobacilli* Isolated from Traditional Greek Cheese. Lett. Appl. Microbiol. 23 : 367 - 370.

VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., de VOS, P., KERSTERS, K., SWINGS, J. - 1996 - Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. Microbiol. Rev. 60 : 407 - 438.

VANDENBERGH, P.A. - 1993 - Lactic Acid Bacteria, Their Metabolic Products and Interference with Microbial Growth. FEMS Microbiol. Rev. 12 : 221 - 238.

VEDAMUTHU, E.R. - 1994 - The Dairy *Leuconostoc*: Use in Dairy Products. J. Dairy Sci. 77 : 2725 - 2737.

VELOSO, C. - 1992 - A Alimentação em Portugal no Século XVIII no Relato dos Viajantes Estrangeiros. Ed. Minerva História. 210 pp.

VIGNOLO, G., KAIRUZ, M.N., HOLGADO, A.A.P.R., OLIVER, G. - 1995 - Influence of Growth Conditions on the Production of Lactocin 705, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. J. Appl. Bact. 78 : 5 - 10.

VILLANI, F., SALZANO, G., SORRENTINO, E., PEPE, O., MARINO, P., COPPOLA, S. - 1993 - Enterocin 226NWC, a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* 226, Active Against *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol. 74 : 380 - 387.

- VISSER, S. - 1993 - Proteolytic Enzymes and Their Relation to Cheese Ripening and Flavor: An Overview. *J. Dairy Sci.* 76 : 329 - 350.
- VLAEMYNCK, G. - 1994 - Salmonella. In "The Significance of Pathogenic Microorganisms in Raw Milk". pp 78 - 90. Publ. International Dairy Federation. Brussels. 215 pp.
- WALKER, S.J. - 1988 - Major Spoilage Micro-Organisms in Milk and Dairy Products. *J. Soc. Dairy Technol.* 41 : 91 - 92.
- WALSTRA, P. - 1993 - The Syneresis of Curd. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. I - General Aspects" pp.141 - 191. Ed. P.F. Fox. Chapman & Hall. 601 pp.
- WALSTRA, P., NOOMEN, GEURT, T.J. - 1993 - Dutch-type Varieties. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. II - Major Cheese Groups" pp. 39 - 82. Ed. P.F. Fox. Chapman & Hall. 577 pp.
- WAN, J., HARMARK, K., DAVIDSON, B.E., HILLIER, A.J., GORDON, J.B., WILCOCK, A., HICKEY, M.W., COVENTRY, M.J. - 1997 - Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Piscicolin 126 in Milk and Camembert Cheese Manufactured with a Thermophilic Starter. *J. Appl. Microbiol.* 82 : 273 - 280.
- WENZEL, J.M., MARTH, E.H. - 1990 - Changes in Populations of *Listeria monocytogenes* in a Medium with Internal pH Control Containing *Streptococcus cremoris*. *J. Dairy Sci.* 73 : 3357 - 3365.
- WHITE, C.H. - 1998 - Testing Milk and Milk Products. In "Applied Dairy Microbiology" pp 431 - 460. Ed. E.H. Marth, J. Steele. Marcel Dekker Inc. 516 pp.
- WOLFSON, L.M., SUMNER, S.S. - 1993 - Antibacterial Activity of the Lactoperoxidase System: A Review. *J. Food Protect.* 56 : 887 - 892.
- YAMAMOTO, N., AKINO, A., TAKANO, T. - 1994 - Antihypertensive Effect of the Peptides Derived from Casein by Extracellular Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77 : 917 - 922.
- YANG, R., RAY, B. - 1994 - Factors Influencing Production of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiol.* 11 : 281 - 291.
- YOUSEF, A.E., MARTH, E.H. - 1990 - Fate of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture and Ripening of Parmesan Cheese. *J. Dairy Sci.* 73 : 3351 - 3356.

YVON, M., THIROIUN, S., RIJNEN, L., FROMENTIER, D., GRIPON, J.C. - 1997 - An Aminotransferase from *Lactococcus lactis* Initiates Conversion of Amino Acids to Cheese Flavor Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 414 - 419.

ZAPICO, P., GAYA, P., NUÑEZ, M., MEDINA, M. - 1993 - Goats' Milk Lactoperoxidase System Against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 56 : 988 - 990.

ZIPRIN, R.L. - 1994 - *Salmonella*. In "Foodborne Disease Handbook. Diseases Caused by Bacteria". Vol.I. pp 253 - 318. Ed. Y.H.Hui, J.R.Gorham, K.D.Murrell, D.O.Cliver. Marcel Dekker, Inc. 613 pp.

ZOTTOLA, E.A., SMITH, L.B. - 1991 - Pathogens in Cheese. *Food Microbiol.* 8 : 171 - 182.

ZOTTOLA, E.A., SMITH, L.B. - 1993 - Growth and Survival of Undesirable Bacteria in Cheese. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. I - General Aspects" pp. 471 - 492. Ed. P.F. Fox. Chapman & Hall. 601 pp.

ANEXOS

ANEXO I

MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Água Peptonada (Oxoid)

| | g/l |
|------------------|------|
| Peptona | 10,0 |
| Cloreto de Sódio | 5,0 |

pH 7,2 ± 0,2

APT Agar (Difco)

| | g/l |
|------------------------------|-------|
| Bacto Yeast Extract | 7,5 |
| Bacto Tryptone | 12,5 |
| Bacto Dextrose | 10 |
| Citrato de Sódio | 5,0 |
| Hidrocloreto de Tiamina | 0,001 |
| Cloreto de Sódio | 5,0 |
| Fosfato di-Potássio | 5,0 |
| Cloreto de Manganês | 0,14 |
| Sulfato de Magnésio | 0,8 |
| Sulfato Ferroso | 0,04 |
| Complexo Sorbitan Monooleato | 0,2 |
| Bacto Agar | 15 |

pH 6,7 ± 0,2

Baird-Parker Agar (Difco)

| | g/l |
|---------------------|-----|
| Bacto Tryptone | 10 |
| Bacto Beef Extract | 5 |
| Bacto Yeast Extract | 1 |
| Glicina | 12 |
| Piruvato de Sódio | 10 |
| Cloreto de Lítio | 5 |
| Bacto Agar | 20 |

pH 7.0 ± 0,2

Adicionar 50 ml de Egg Yolk Tellurite Enrichment a 950 ml de meio reconstituído.

Caldo de Enriquecimento Selectivo de Listeria (Oxoid)

| | g/l |
|---------------------------|------|
| Caldo de Triptona de Soja | 30.0 |
| Extracto de Levedura | 6.0 |

pH 7,3 ± 0,2

A 500 ml adicionar uma embalagem de **Listeria Selective Enrichment Supplement (Oxoid)** que contém

| | |
|-----------------------------|---------|
| Ácido nalidixico | 20,0 mg |
| Cicloheximida | 25,0 mg |
| Hidrocloreto de acriflavina | 7,5 mg |

Caldo de Selenite Cistina (Difco)

| | g/l |
|-------------------|------|
| Bacto Tryptone | 5 |
| Bacto Lactose | 4 |
| Fosfato di-Sódio | 10 |
| Selenite de Sódio | 4 |
| L-Cistina | 0,01 |

pH 7,0 ± 0,2

de Man, Rogosa e Sharpe Agar (Oxoid)

| | g/l |
|---------------------------------------|------|
| Peptona | 10 |
| Pó "Lab-Lemco" | 8,0 |
| Extracto de Levedura | 4,0 |
| Glucose | 20,0 |
| Monooleato de Sorbitan | 1 ml |
| Di-potássio Hidrogeno-fosfato | 2,0 |
| Acetato de Sódio 3H ₂ O | 5,0 |
| Citrato Tri-Amónio | 2,0 |
| Sulfato de Magnésio 7H ₂ O | 0,2 |
| Sulfato de Manganês 4H ₂ O | 0,05 |
| Agar | 10 |

pH 6,2 ± 0,2

de Man, Rogosa e Sharpe Basal

| | g/l |
|---------------------------------------|------|
| Triptona | 10 |
| Extracto de Levedura | 5,0 |
| Monooleato de Sorbitan (Tween 80) | 1 ml |
| Di-potássio Hidrogeno-fosfato | 2,0 |
| Acetato de Sódio 3H ₂ O | 5,0 |
| Citrato de Sódio | 2,0 |
| Sulfato de Magnésio 7H ₂ O | 0,2 |
| Sulfato de Manganês 4H ₂ O | 0,05 |
| Púrpura de Bromocresol | 0,03 |

pH 6,2 ± 0,2

de Man, Rogosa e Sharpe Broth (Oxoid)

| | g/l |
|---------------------------------------|------|
| Peptona | 10 |
| Pó "Lab-Lemco" | 8,0 |
| Extracto de Levedura | 4,0 |
| Glucose | 20,0 |
| Monooleato de Sorbitan | 1 ml |
| Di-potássio Hidrogeno-fosfato | 2,0 |
| Acetato de Sódio 3H ₂ O | 5,0 |
| Citrato Tri-Amónio | 2,0 |
| Sulfato de Magnésio 7H ₂ O | 0,2 |
| Sulfato de Manganês 4H ₂ O | 0,05 |

pH 6,2 ± 0,2

de Man, Rogosa e Sharpe sem acetato e com 1% de Glucose

| | g/l |
|---------------------------------------|------|
| Peptona | 10 |
| Pó "Lab-Lemco" | 8,0 |
| Extracto de Levedura | 4,0 |
| Glucose | 10,0 |
| Monooleato de Sorbitan (Tween 80) | 1 ml |
| Di-potássio Hidrogeno-fosfato | 2,0 |
| Citrato Tri-Amónio | 2,0 |
| Sulfato de Magnésio 7H ₂ O | 0,2 |
| Sulfato de Manganês 4H ₂ O | 0,05 |

pH 6,5 ± 0,2

de Man, Rogosa e Sharpe sem glucose, extracto de carne e citrato de amónio

| | g/l |
|---------------------------------------|------|
| Peptona | 10 |
| Extracto de Levedura | 4,0 |
| Monooleato de Sorbitan (Tween 80) | 1 ml |
| Di-potássio Hidrogeno-fosfato | 2,0 |
| Acetato de Sódio 3H ₂ O | 5,0 |
| Sulfato de Magnésio 7H ₂ O | 0,2 |
| Sulfato de Manganês 4H ₂ O | 0,05 |
| Citrato de Sódio | 2 |

pH 6,2 ± 0,2

Distribuir 3ml por tubo e adicionar 0,3 ml de uma solução de arginina estéril (30 mg/ml).

Dextrose Triptona Agar (Oxoid)

| | g/l |
|------------------------|------|
| Triptona | 10 |
| Glucose | 5,0 |
| Púrpura de Bromocresol | 0,04 |
| Agar | 12,0 |
| pH 6,9 ± 0,2 | |

Hektoen Enteric Agar (Oxoid)

| | g/l |
|---------------------------|-------|
| Proteose Peptona | 12,0 |
| Extracto de Levedura | 3,0 |
| Lactose | 12,0 |
| Sacarose | 12,0 |
| Salicina | 2,0 |
| Sais Biliares N°3 | 9,0 |
| Cloreto de Sódio | 5,0 |
| Tiosulfato de Sódio | 5,0 |
| Citrato Férrico de Amónio | 1,5 |
| Fucsina Ácida | 0,1 |
| Azul de Bromotimol | 0,065 |
| Agar | 14 |
| pH 7,5 ± 0,2 | |

Kanamicina Azida de Sódio Esculina Agar (Oxoid)

| | g/l |
|---------------------------|------|
| Triptona | 20,0 |
| Extracto de Levedura | 5,0 |
| Cloreto de Sódio | 5,0 |
| Citrato de Sódio | 1,0 |
| Esculina | 1,0 |
| Citrato Férrico de Amónio | 0,5 |
| Azida de Sódio | 0,15 |
| Agar | 10 |
| pH 7,0 ± 0,2 | |

Adicionar 20 mg de Sulfato de Kanamicina dissolvidos em 4 ml de água destilada esterilizada.

Kligler Iron Agar (Difco)

| | g/l |
|------------------------|-------|
| Bacto Beef Extract | 3 |
| Bacto Yeast Extract | 3 |
| Bacto Peptone | 15 |
| Proteose Peptone Difco | 5 |
| Bacto Lactose | 10 |
| Bacto Dextrose | 1 |
| Sulfato Ferroso | 0,2 |
| Cloreto de Sódio | 5 |
| Tiosulfato de Sódio | 0,3 |
| Bacto Agar | 12 |
| Bacto Phenol Red | 0,024 |

pH 7,4 ± 0,2

Listeria Selective Agar (Oxoid)

| | g/l |
|---------------------------|------|
| Columbia Blood Agar Base | 39,0 |
| Esculina | 1,0 |
| Citrato Férrico de Amônio | 0,5 |
| Cloreto de Lítio | 15,0 |

pH 7,0 ± 0,2

Adicionar a 500 ml de Listeria Selective Agar uma embalagem de **Listeria Selective****Supplement (Oxoid):**

| | |
|----------------------|--------|
| Cicloheximida | 200 mg |
| Sulfato de Colistina | 10 mg |
| Acriflavina | 2,5 mg |
| Cefotetan | 1,0 mg |
| Fosfomicina | 5,0 mg |

Lysine Iron Agar (Difco)

| | g/l |
|---------------------------|------|
| Bacto Peptona | 5 |
| Bacto Yeast Extract | 3 |
| Bacto Dextrose | 1 |
| Hidrocloro de L-Lisina | 10 |
| Citrato Férrico de Amónio | 0,5 |
| Tiosulfato de Sódio | 0,04 |
| Bacto Brom Cresol Purple | 0,02 |
| Bacto Agar | 15 |

pH 6,7 ± 0,2

M17 Agar (Oxoid)

| | g/l |
|-------------------------|------|
| Triptona | 5,0 |
| Peptona de Soja | 5,0 |
| Digesto de carne | 5,0 |
| Extracto de levedura | 2,5 |
| Ácido Ascórbico | 0,5 |
| Sulfato de Magnésio | 0,25 |
| Glicerofosfato di-sódio | 19,0 |
| Agar | 11,0 |

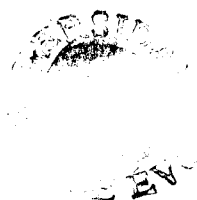
pH 6,9 ± 0,2

Após esterilização e arrefecimento até 50°C, adicionar 50 ml de solução de lactose a 10% (p/v) esterilizada por filtração a 950 ml de meio reconstituído.

m-Enterococcus Agar (Difco)

| | g/l |
|--------------------------------------|------|
| Bacto Tryptose | 20,0 |
| Bacto Yeast Extract | 5,0 |
| Bacto Dextrose | 2,0 |
| Fosfato di-Potássio | 4,0 |
| Azida de Sódio | 0,4 |
| Bacto Agar | 10 |
| Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio | 0,1 |

pH 7,2 ± 0,2



Mueller-Hinton Agar (Oxoid)

| | g/l |
|------------------------------|------|
| Infusão Desidratada de Carne | 300 |
| Hidrolisado de Caseína | 17,5 |
| Amido | 1,5 |
| Agar | 17,0 |
| pH 7,4 ± 0,2 | |

Plate Count Agar (Difco)

| | g/l |
|--------------------------|------|
| Bacto Tryptone | 5,0 |
| Bacto Yeast Extract | 2,5 |
| Bacto Dextrose (Glucose) | 1,0 |
| Bacto Agar | 15,0 |
| pH 7,0 ± 0,2 | |

Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Oxoid)

| | g/l |
|---------------------|------|
| Peptona Micológica | 5,0 |
| Glucose | 10,0 |
| Fosfato di-potássio | 1,0 |
| Sulfato de Magnésio | 0,5 |
| Rosa de Bengala | 0,05 |
| Agar | 15,5 |
| pH 7,2 ± 0,2 | |

Adicionar uma embalagem de Chloramphenicol Selective Supplement (Oxoid) a 500 ml de meio reconstituído.

Solução de Ringer a ¼ (Oxoid)

| | g/l |
|-------------------------------------|-------|
| Cloreto de Sódio | 2,25 |
| Cloreto de Potássio | 0,105 |
| Cloreto de Cálcio 6H ₂ O | 0,12 |
| Bicarbonato de Sódio | 0,05 |
| pH 7,0 | |

Triptona de Soja Agar (Oxoid)

| | g/l |
|------------------|------|
| Triptona | 15,0 |
| Peptona de Soja | 5,0 |
| Cloreto de Sódio | 5,0 |
| Agar | 15,0 |
| pH 7,3 ± 0,2 | |

Verde Brillhante Agar (Difco)

| | g/l |
|----------------------------|--------|
| Proteose Peptone N°3 Difco | 10 |
| Bacto Yeast Extract | 3 |
| Bacto Lactose | 10 |
| Bacto Saccharose | 10 |
| Cloreto de Sódio | 5 |
| Bacto Agar | 20 |
| Bacto Brilliant Green | 0,0125 |
| Bacto Phenol Red | 0,08 |
| pH 6,9 ± 0,2 | |

Violet Red Bile Agar (Oxoid)

| | g/l |
|----------------------|-------|
| Extracto de Levedura | 3,0 |
| Peptona | 7,0 |
| Cloreto de Sódio | 5,0 |
| Sais biliares N° 3 | 1,5 |
| Lactose | 10 |
| Vermelho Neutro | 0,03 |
| Cristal Violeta | 0,002 |
| Agar | 12,0 |
| pH 7,4 ± 0,2 | |

Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid)

| | g/l |
|----------------------|-------|
| Extracto de Levedura | 3,0 |
| Peptona | 7,0 |
| Cloreto de Sódio | 5,0 |
| Sais biliares N° 3 | 1,5 |
| Glucose | 10 |
| Vermelho Neutro | 0,03 |
| Cristal Violeta | 0,002 |
| Agar | 12,0 |

pH 7,4 ± 0,2

Xylose Lysine Desoxycholate (Oxoid)

| | g/l |
|---------------------------|------|
| Extracto de Levedura | 3,0 |
| L-Lisina HCl | 5,0 |
| Xylose | 3,75 |
| Lactose | 7,5 |
| Sacarose | 7,5 |
| Desoxicolato de Sódio | 1,0 |
| Cloreto de Sódio | 5,0 |
| Tiosulfato de Sódio | 6,8 |
| Citrato Férrico de Amónio | 0,8 |
| Vermelho Fenol | 0,08 |
| Agar | 12,5 |

pH 7,4 ± 0,2

ANEXO II

PERFIL DE UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO DAS ESTIRPES PADRÃO

| | DSM 2146 | DSM 4838 | DSM 6630 | DSM 20160 | DSM 20376 | DSM 20477 ^T | DSM 20478 ^T | DSM 20633 | DSM 20679 | DSM 20680 | DSM 20681 | DSM 20682 |
|----------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| RIBOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ARABIN. | + | + | + | - | - | + | - | - | + | + | - | + |
| XILOSE | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| RAMNOSE | - | + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | + |
| MANITOL | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + |
| SORBITOL | - | + | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + |
| ADONIT. | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + |
| GLICOG. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GLICEROL | - | - | + | - | + | - | + | - | - | + | - | - |
| FRUTOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| MANOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| GALACT. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| GLUCOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| LACTOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| MALTOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| SACAR. | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| TREAL. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| CELOBIO. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| RAFIN. | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| MELIBIO. | - | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + |
| MELEZIT. | - | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + |
| SALICINA | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| GLUCON. | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | + | + |
| AMIGDAL. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ESCULINA | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| FUCOSE | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TURAN. | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| INULINA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| ARBUTINA | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| DEXTRINA | - | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | + |

ARABIN. - Arabinose; ADONIT. - Adonitol; GLICOG. - Glicogénio; GALACT. - Galactose; SACAR. - Sacarose; TREAL. - Trealose; CELOBIO. - Celobiose; RAFIN. - Rafinose; MELIBIO. - Melibiose; MELEZIT. - Melezitose; GLUCON. - Gluconato; AMIGDAL. - Amigdalina; TURAN. - Turanose.

PERFIL DE UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO DE ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE CADA "CLUSTER"

| CLUSTER | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| RIBOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ARABIN. | + | + | + | + | - | + | - | - | + |
| XILOSE | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| RAMNOSE | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MANITOL | + | + | + | + | - | + | - | + | + |
| SORBITOL | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| ADONIT. | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GLICOG. | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GLICEROL | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| FRUTOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| MANOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| GALACT. | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| GLUCOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| LACTOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| MALTOSE | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| SACAR. | + | + | - | - | - | - | + | + | + |
| TREAL. | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| CELOBIO. | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| RAFIN. | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MELIBIO. | + | + | + | + | - | + | + | - | + |
| MELEZIT. | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| SALICINA | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| GLUCON. | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| AMIGDAL. | + | - | + | - | - | - | - | + | + |
| ESCULINA | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| FUCOSE | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TURAN. | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| INULINA | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ARBUTINA | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| DEXTRINA | - | - | + | + | + | - | + | + | + |

ARABIN. - Arabinose; ADONIT. - Adonitol; GLICOG. - Glicogénio; GALACT. - Galactose; SACAR. - Sacarose; TREAL. - Trealose; CELOBIO. - Celobiose; RAFIN. - Rafinose; MELIBIO. - Melibiose; MELEZIT. - Melezitose; GLUCON. - Gluconato; AMIGDAL. - Amigdalina; TURAN. - Turanose.