

ELAINE LOPES FIGUEIREDO

**ENTEROCOCCUS ISOLADOS DO QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME:  
CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA, CINÉTICA DE MULTIPLICAÇÃO,  
CAPACIDADE DE ADESÃO E RESISTÊNCIA A SANITIZANTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

F475e  
2014 Figueiredo, Elaine Lopes, 1977-  
Enterococcus isolados do queijo do Marajó, tipo creme :  
caracterização tecnológica, cinética de multiplicação, capacidade  
de adesão e resistência a sanitizantes / Elaine Lopes Figueiredo.  
– Viçosa, MG, 2014.  
xvi, 82f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nélio José de Andrade.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.73-82.

1. Queijo. 2. Queijo - Microbiologia. 3. Queijo -  
Contaminação. 4. Biofilme. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de  
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.


CDD 22. ed. 637.352

ELAINE LOPES FIGUEIREDO

**ENTEROCOCCUS ISOLADOS DO QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME:  
CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA, CINÉTICA DE MULTIPLICAÇÃO,  
CAPACIDADE DE ADESÃO E RESISTÊNCIA A SANITIZANTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 06 de outubro de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Ana Clarissa dos Santos Pires  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Wilmer Edgar Luera Peña  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Maria Aparecida Antunes

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Nélio José de Andrade  
(Orientador)

“Fica permitido que o pão de cada dia  
tenha no homem o sinal de seu suor.  
Mas que, sobretudo, tenha sempre o  
quente sabor da ternura”.

Pablo Neruda

Dedico esta tese à minha mãe,  
minha melhor amiga e companheira de vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora de Nazaré, que iluminam meus pensamentos, deram-me sabedoria, tranquilidade, e ajudaram-me à enfrentar todos os obstáculos encontrados durante a trajetória dessa jornada.

Aos meus pais, Raimundo e Rosa Figueiredo, pela vida e amor, e por contribuírem em minha formação pessoal e profissional.

Aos meus irmãos Sirlene, Mauricio e Márcia, pelo apoio e companheirismo em toda a vida e durante esta jornada. E aos meus “pequenos”: Felipe e Pedro Lucas, que me proporcionaram o sorriso e a alegria que me sempre me acalmavam em momentos difíceis.

Ao meu esposo Adeilson Felipe por estar sempre ao meu lado, por todo o amor, carinho, paciência e apoio incondicional.

Ao meu orientador, Nélio José de Andrade, por seu carinho, orientação e conhecimento preciso, e pelo grande privilégio concedido a mim, de ter sua orientação junto a esta tese.

Aos meus Coorientadores, Ana Clarissa dos Santos e Wilmer Edgar Luera Peña, que com seu conhecimento e disposição em ajudar, contribuíram muito na realização desta pesquisa.

Ao Prof. Hamilton Mendes de Figueiredo, por sua ajuda inicial e por me ceder os isolados de bactérias lácticas, que oportunizou a realização desta pesquisa.

À minha família, tias, tios, primas e primos por todo apoio, motivação e confiança.

À Universidade Federal de Viçosa - UFV, pela oportunidade e pela infraestrutura que permitiu a realização deste doutorado.

À Universidade do Estado do Pará – UEPA, à todos os meus colegas de trabalho, em especial aos Professores João Hamilton e Silvana Neves, por entenderem as dificuldades da realização do doutorado, e conseguirem ajustar minha atuação docente com minha prática discente.

Aos meus amigos e companheiros de doutorado (Sérgio Carvalho, Tonye Waughon, Ana Carla Pelais, Alessandra Eluan, Adriano Calandrini, Vitória Seixas, Rosemeri Coutinho, Marilda Simões e Carissa Bichara), que compartilharam comigo as alegrias e dificuldades trilhadas durante esses anos e por dar mostra de amizade e companheirismo.

Às minhas amigas: Silvia Helena, Andréa Bastos e Aline Ferreira, pela paciência e carinho durante todos esses anos, inclusive quando pensava que não conseguiria concretizar este projeto.

À todos os meus alunos da UEPA, pelo carinho, respeito e confiança. É essa confiança que tem motivado meu esforço pela capacitação deste doutorado, e assim contribuir para o processo ensino/pesquisa desses alunos.

Aos colegas que conheci em Viçosa, pelo carinho recebido, e por suas colaborações na realização deste trabalho, em especial Mayra Karla, Jorge Mario, Patrícia Fernandes, Roberta Tenório, João Sá, Evelin Rossi e Hiasmyne Medeiros.

Aos alunos de graduação da UFV, Bruna Filgueiras e Camila Moreira pela ajuda durante as realizações das análises, e em especial ao Josiano Teixeira, que contribuiu nas análises de Hidrofobicidade.

Ao colega de trabalho, Fabricio Martins, pelo conhecimento a contribuição na realização das análises estatísticas.

A Suezilde Ribeiro, coordenadora do Programa DINTER, pelo auxílio.

As secretarias do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Geralda e Polyana, por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos produtores de Queijo do Marajó, na Ilha do Marajó, por terem permitido minha entrada no interior do locus de estudo, com facilidades para conhecimento das informações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de afastamento.

## **BIOGRAFIA**

Elaine Lopes Figueiredo, filha de Raimundo de Sousa Figueiredo e Rosa Lopes Figueiredo, nasceu em Belém, Estado do Pará, em 21 de novembro de 1977.

Em março de 2002, graduou-se em Tecnologia de Alimentos pela Universidade do Estado do Pará – UEPA, Belém, PA.

Em agosto de 2002, começou a ministrar disciplinas, como professora substituta, para o Curso de Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado do Pará - UEPA, sendo efetivada no quadro docente desta Instituição em janeiro de 2008.

Em fevereiro de 2004 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Produção Animal, da Universidade Federal do Para – UFPA, submetendo-se à defesa de dissertação em março de 2006.

Em agosto de 2010 iniciou o Curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, através do Programa Interinstitucional – DINTER, entre a Universidade do Estado do Pará e a Universidade Federal de Viçosa, defendendo a tese em 06 de outubro de 2014.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
2.1 QUEIJOS ARTESANAIS NO BRASIL.....	3
2.2 QUEIJO DO MARAJÓ .....	4
2.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM QUEIJOS ARTESANAIS .....	8
<b>2.3.1 Enterococcus</b> .....	10
2.4 ADESÃO BACTERIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME .....	12
<b>2.4.1 Aspectos físico-químicos da adesão microbiana</b> .....	14
2.4.1.1 Hidrofobicidade e carga elétrica .....	17
2.4.1.2 Medição do ângulo de contato .....	18
<b>2.4.2 Aspectos microbiológicos da adesão microbiana</b> .....	19
2.5 BIOFILMES NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS .....	21
2.6 SUPERFÍCIES UTILIZADAS NO PROCESSAMENTO DE QUEIJOS .....	22
2.7 EFEITO DE SANITIZANTES SOBRE A REMOÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS.....	24
<b>2.7.1 Cloreto de benzalcônio</b> .....	26
<b>2.7.2 Dicloroisocianurato de sódio</b> .....	26
<b>2.7.3 Ácido peracético</b> .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
3.1 POTENCIAL TECNOLÓGICO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME.....	30
<b>3.1.1 Coloração de Gram</b> .....	30

<b>3.1.2 Teste de Catalase</b> .....	31
<b>3.1.3 Produção de Gás</b> .....	31
<b>3.1.4 Atividade Acidificante</b> .....	31
<b>3.1.5 Atividade Proteolítica</b> .....	31
<b>3.1.6 Produção de Diacetil</b> .....	32
<b>3.1.7 Teste de Lactofermentação</b> .....	32
<b>3.2 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME</b> .....	33
<b>3.2.1 Extração de DNA das amostras</b> .....	33
<b>3.2.2 Amplificação parcial do gene 16S rDNA</b> .....	34
<b>3.2.3 Sequenciamento do produto amplificado na PCR</b> .....	35
<b>3.3 CINÉTICA DE MULTIPLICAÇÃO DE ENTEROCOCCUS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME</b> .....	35
<b>3.4 ADESÃO DE ENTEROCOCCUS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME EM DIFERENTES SUPERFÍCIES</b> .....	36
<b>3.4.1 Superfícies utilizadas</b> .....	37
<b>3.4.2 Preparo dos cupons</b> .....	37
<b>3.4.3 Preparo das suspensões de células de Enterococcus</b> .....	37
<b>3.4.4 Adesão de Enterococcus nas superfícies dos cupons</b> .....	38
<b>3.4.5 Determinação do Número de Células Aderidas</b> .....	38
<b>3.4.6 Determinação da hidrofobicidade e da variação da energia livre de Gibbs</b> .....	39
<b>3.4.7 Determinação da variação de energia livre de Gibbs de adesão (<math>\Delta G_{adesão}</math>)</b> .....	40
<b>3.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de diferentes superfícies e de Enterococcus do queijo do marajó, tipo creme, aderidos nas superfícies</b> .....	41
<b>3.4.9 Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre Enterococcus do Queijo do Marajó, Tipo Creme, aderidas nas superfícies avaliadas</b> .....	42
<b>3.5 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO</b> .....	44

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	45
4.1 POTENCIAL TECNOLÓGICO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME .....	45
<b>4.1.1 Coloração de Gram</b> .....	45
<b>4.1.2 Teste de Catalase</b> .....	45
<b>4.1.3 Produção de Gás</b> .....	45
<b>4.1.4 Atividade Acidificante</b> .....	46
<b>4.1.5 Atividade Proteolítica</b> .....	47
<b>4.1.6 Produção de Diacetil</b> .....	47
<b>4.1.7 Teste de Lactofermentação</b> .....	49
4.2 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME.....	49
<b>4.2.1 Análise das sequências de 16s rDNA</b> .....	49
4.3 CINÉTICA DE MULTIPLICAÇÃO DE ENTEROCOCCUS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME.....	52
4.4 ADESÃO DE ENTEROCOCCUS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME EM DIFERENTES SUPERFÍCIES .....	55
<b>4.4.1 Determinação do Número de Células Aderidas</b> .....	55
<b>4.4.2 Determinação dos ângulos de contato e da variação da energia livre de Gibbs</b> .....	59
<b>4.4.3 Determinação da variação da energia livre de Gibbs de interação (<math>\Delta GSASTOT</math>)</b> .....	62
<b>4.4.4 Determinação da variação da energia livre de Gibbs de adesão (<math>\Delta Gadesão</math>) entre as superfícies de aço inoxidável, polietileno, polipropileno, os isolados de Enterococcus (A, B e C), e o Pool, em meio aquoso</b> .....	63
<b>4.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de diferentes superfícies e de Enterococcus do Queijo do Marajó, Tipo Creme, aderidos nas superfícies</b> .....	64
<b>4.4.6 Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre Enterococcus do Queijo do Marajó, Tipo Creme, aderidas nas superfícies avaliadas</b> .....	68

<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v) do produto de PCR amplificado para identificação genética dos isolados de bactérias lácticas. Linha 1-3 Marcador de DNA lambda. Linha 4 marcador de 100 pb.....	51
Figura 2 - Curva de crescimento das amostras de BAL incubadas a diferentes temperaturas: – Baranyi; ▲ 15 °C; ● 30 °C; + 45 °C.....	53
Figura 3 - Microtopografias de superfícies A) Aço inoxidável, B) Polietileno e C) Polipropileno, observadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	66
Figura 4 - Microtopografias de superfícies aderidas com Enterococcus A) Aço Inoxidável; B) Polietileno, C) Polipropileno, observadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	68
Figura 5 - Logaritmo do número de células aderidas de Enterococcus sem a sanitização e após a sanitização nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes da tensão de interfacial de líquidos, a 25 °C.....	16
Tabela 2 – Identificação das bactérias lácticas isoladas do Queijo do Marajó, Tipo Creme, com base na análise do gene 16S rDNA*.....	51
Tabela 3 – Taxas de multiplicação ( $\mu$ ) e tempo de permanência na fase lag ( $\lambda$ ) dos isolados de BAL (A, B e C) e do Pool, incubados a três temperaturas diferentes.....	54
Tabela 4 – Logaritmo de UFC.cm <sup>-2</sup> do número de células aderidas dos isolados (A, B e C) e do Pool com as superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno.....	57
Tabela 5 – Valores médios dos ângulos de contato ( $\theta$ ) com as superfícies de aço inoxidável, polietileno, polipropileno e de células dos isolados de Enterococcus (A, B e C) e do Pool, com água ( $\theta_A$ ), formamida ( $\theta_F$ ) e $\alpha$ -bromonaftaleno ( $\theta_B$ ).....	61
Tabela 6 - Valores das componentes apolar ( $\gamma^{LW}$ ), polar ( $\gamma^{AB}$ ) e respectivos parâmetros ( $\gamma^+$ e $\gamma^-$ ) da tensão interfacial ( $\gamma^{TOT}$ ) das superfícies de aço inoxidável, polietileno, polipropileno, dos isolados de Enterococcus (A, B e C) e do Pool.....	62
Tabela 7 – Valores das componentes apolar ( $\Delta G_{SAS}^{LW}$ ), polar ( $\Delta G_{SAS}^{AB}$ ) e da energia livre de Gibbs de interação ( $\Delta G_{SAS}^{TOT}$ ) das superfícies de aço inoxidável, polietileno, polipropileno e dos isolados de Enterococcus (A, B e C) e do Pool.....	63
Tabela 8 – Valor da energia livre de Gibbs de adesão ( $\Delta G_{adesão}$ ) entre os isolados A, B e C, e o Pool (b) e as superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno (s) em meio aquoso (l) e suas componentes apolar ( $\Delta G_{bls}^{LW}$ ) e polar ( $\Delta G_{bls}^{AB}$ ) .....	65

## RESUMO

FIGUEIREDO, Elaine Lopes. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014. **Enterococcus isolados do Queijo do Marajó, Tipo Creme: Caracterização tecnológica, cinética de multiplicação, capacidade de adesão e resistência a sanitizantes.** Orientador: Nélio José de Andrade. Coorientadores: Ana Clarissa dos Santos Pires e Wilmer Edgar Luera Peña.

Dentre os micro-organismos indicadores de higiene e com capacidade de aderir e formar biofilmes em superfícies de processamento de alimentos, estão as bactérias do gênero *Enterococcus*, frequentemente presente em queijos artesanais, como o Queijo do Marajó. Este trabalho objetivou: i) avaliar as características tecnológicas de 40 isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) do Queijo do Marajó, Tipo Creme, ii) identificar a genética de 6 isolados, iii) determinar os parâmetros cinéticos de multiplicação microbiana (taxa de multiplicação e tempo de lag) de 3 isolados e o seu Pool, incubados sob temperaturas de 15 °C, 30 °C e 45 °C, iv) avaliar a adesão de 3 isolados e seu Pool em superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno, em 5 tempos de contato (0 h, 6 h, 12 h, 18 h e 24 h), v) estudar a interação entre as superfícies e os isolados e o seu Pool, por meio das características de interação interfacial, vi) avaliar a microtopografia das superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno, e das superfícies com adesão de isolados de *Enterococcus* e seu Pool, e vii) avaliar a remoção de três isolados e seu Pool, aderidos às superfícies, submetidos à três tipos de sanitizantes (cloreto de benzalcônio, dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético). Os isolados eram gram-positivos, catalase negativa, produtores de gás, com atividade proteolítica e baixa atividade acidificante. A maioria dos isolados apresentou alta capacidade de produção de diacetil (33 isolados) e formação de coágulo gelatinoso (35 isolados). Os isolados submetidos à caracterização genética foram identificados como *E. faecium* e *E. durans*. Os resultados da cinética de multiplicação mostraram que à temperatura de 30 °C, as amostras de BAL apresentaram os maiores valores das taxas de multiplicação ( $\mu$ ) e menor tempo de fase lag, comparados às temperaturas de 15 °C e 45 °C. O número de células aderidas de *Enterococcus* aumentou com o tempo de contato para todas as superfícies avaliadas. No intervalo de 0 h a 24 h de contato, constatou-se aumento do número de células aderidas em mais de 8 ciclos log para as superfícies de aço inoxidável, mais de 7 ciclos log para a superfície de polietileno, e média de 6 ciclos log para o polipropileno. Com base nos valores do ângulo de contato, as superfícies do aço inoxidável, do polietileno e do polipropileno foram classificadas como hidrofóbicas, e as superfícies das BAL hidrofílicas. Com base nos valores da variação da energia livre

global de interação ( $\Delta G_{SAS}^{TOT}$ ), as superfícies de polipropileno e das BAL foram classificadas como hidrofílicas, enquanto as superfícies de aço inoxidável e polietileno foram classificadas como hidrofóbicas. A microscopia eletrônica de varredura permitiu a visualização das superfícies e das bactérias aderidas nas três superfícies. Os sanitizantes cloreto de benzalcônio, dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético, nas concentrações de 200 mg.L<sup>-1</sup>, com 10 min de ação, reduziram as células de Enterococcus, com média > 7,72 RD para o aço inoxidável, média de > 7,17 RD para o polietileno, e média de > 5,62 RD para o polipropileno. Assim, pode-se dizer que, embora Enterococcus apresente potencial tecnológico, este micro-organismo quando encontrado em concentrações elevadas, é indicador de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

## ABSTRACT

FIGUEIREDO, Elaine Lopes. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October de 2014. **Enterococcus isolates from Cheese Marajó, Cream Type: Technological characterization, kinetics of proliferation, adhesion ability and resistance to sanitizers.** Adviser: Nélio José de Andrade. Co-advisors: Ana Clarissa dos Santos Pires and Wilmer Edgar Luera Peña.

Among the micro-organisms of health indicators and the ability to adhere to and form biofilms on surfaces of food processing, are of the genus *Enterococcus* bacteria often present in artisanal cheeses, as cheese Marajó. This study aimed to: i) assess the technological characteristics of 40 isolates of lactic acid bacteria (LAB) of the Marajó Cheese, Cream type, ii) identifying genetic isolates 6, iii) determine the kinetic parameters of microbial multiplication (multiplication rate and time lag) of 3 isolates and your Pool, incubated at temperatures of 15 °C, 30 °C and 45 °C, iv) the adherence of 3 isolates and your Pool surfaces of stainless steel, polyethylene and polypropylene in 5 days contact (0 h, 6 h, 12 h, 18 h and 24 h), v) study the interaction between the surfaces and isolated and their Pool, through the characteristics of interfacial interaction, vi) evaluate the microtopography of surfaces stainless steel, polyethylene and polypropylene, and surfaces with adhesion of *Enterococcus* isolates and your Pool, and vii) evaluate the removal of three isolated and his Pool, attached to surfaces, subjected to three types of sanitizers (benzalkonium chloride, dichloroisocyanurate sodium and peracetic acid). The isolates were gram-positive, catalase negative, gas producers, with proteolytic activity and low acidifying activity. Most isolates showed high capacity of diacetyl (33 isolates) and gelatinous clot formation (35 isolates). The isolates underwent genetic characterization were identified as *E. faecium* and *E. durans*. The results of multiplication kinetics showed that the temperature of 30 °C, the BAL samples showed higher rates of multiplication ( $\mu$ ) and shorter lag phase, compared to temperatures of 15 °C and 45 °C. The number of adhered cells of *Enterococcus* increased with contact time for all tested surfaces. In the interval of 0 h to 24 h of contact, there was an increase in the number of adhered cells by more than 8 log cycles for stainless steel surfaces, more than 7 log cycles to the polyethylene surface, and an average of 6 log cycles polypropylene. Based on the values of the contact angle, the surfaces of stainless steel, polyethylene and polypropylene were classified as hydrophobic and hydrophilic surfaces of BAL. Based on the values of the variation of the overall free energy of interaction ( $\Delta G_{SAS}^{TOT}$ ), the surfaces of polypropylene and BAL were classified as hydrophilic, while the surfaces of stainless steel and polyethylene were classified as

hydrophobic. The scanning electron microscopy allowed the visualization of surfaces and adhered bacteria on the three surfaces. Sanitizers benzalkonium chloride, sodium dichloroisocyanurate and peracetic acid at concentrations of 200 mg.L<sup>-1</sup>, 10 min action, reduced Enterococcus cells with an average > 7.72 RD for stainless steel, average > 7.17 RD for polyethylene and average > 5.62 RD for polypropylene. Thus, it can be said that, although Enterococcus present technological potential, this micro-organism when found in high concentrations is indicative of poor sanitary conditions.

# 1 INTRODUÇÃO

Na Ilha do Marajó, localizada no Estado do Pará, a produção do queijo artesanal do Marajó é de grande importância histórica, cultural, social e econômica. O derivado é elaborado a partir de leite cru de búfala, em pequenas propriedades rurais, com mão-de-obra familiar, com tecnologias simples como a coagulação natural, prensagem manual, entre outras. Essa prática de elaboração artesanal insere aos produtos uma microbiota diversificada, representativa de cada região na qual o produto é elaborado, e confere ao queijo características diferenciadas.

Mesmo diante dos avanços tecnológicos e das pesquisas dos últimos anos, a elaboração de queijos artesanais ainda enfrentam vários problemas. Entre esses problemas, destacam-se as condições de higiene das superfícies de que entram em contato com o processamento de alimento, por serem fontes potenciais de micro-organismos deterioradores e patogênicos.

Uma grande parte dos micro-organismos presentes em leite e derivados é capaz de organizar-se em biofilmes, e as consequências da formação destes são alimentos com uma população microbiana acima do permitido pela legislação e com grandes perdas econômicas. A presença de biofilmes é uma grande preocupação uma vez que bactérias quando em biofilmes são mais difíceis de serem removidas do que as células que se encontram livres. Muitas dessas bactérias aderem às superfícies e permanecem viáveis mesmo após a higienização, e pode desprender-se das superfícies e contaminar os alimentos, o que influencia na qualidade e segurança dos alimentos processados, e pode colocar em risco a saúde dos consumidores (FIGUEIREDO et al., 2007; ANDRADE et al., 2008).

As bactérias do gênero *Enterococcus* são frequentemente encontradas em leite e derivados, principalmente em queijos, devido a características como resistência à pasteurização, por serem termorresistentes, e à refrigeração, por serem psicotróficas. Além disso, sua presença em queijos artesanais, elaborados sem cuidados higiênico-sanitários também são frequentes. Várias características tecnológicas, como a produção de compostos aromáticos, têm sido relacionadas a estes micro-organismos, sendo possivelmente os responsáveis pela produção de compostos associados ao sabor e aroma característicos em alguns queijos (ROSADO e KUAYE, 2009; NÓBREGA, 2012).

O gênero *Enterococcus* está dentre os micro-organismos capazes de aderir com possível formação de biofilme em superfícies de equipamentos e utensílios, constituindo assim uma fonte potencial de contaminação dos alimentos (ANDRADE et al., 1998a;

MARQUES et al., 2005). Por essa razão, torna-se importante conhecer suas principais características, que podem influenciar na qualidade do produto. Assim, os objetivos desta pesquisa foram:

- Estudar o potencial tecnológico de quarenta isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) de Queijo do Marajó, Tipo Creme.
- Identificar geneticamente isolados de BAL do Queijo do Marajó, Tipo Creme;
- Determinar os parâmetros cinéticos de multiplicação microbiana (taxa de multiplicação e tempo de lag) de isolados de Enterococcus e seu Pool, em três temperaturas diferentes (15 °C, 30 °C e 45 °C);
- Avaliar a adesão de isolados de Enterococcus e o seu Pool em superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno, em cinco (5) diferentes tempos de contato (0 h, 6 h, 12 h, 18 h e 24 h);
- Estudar a interação entre as superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno e os isolados de Enterococcus e o seu Pool, por meio da medida do ângulo de contato, energia livre de hidrofobicidade e a energia livre de adesão;
- Avaliar a microtopografia das superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno, e das superfícies com adesão de isolados de Enterococcus e seu Pool;
- Avaliar a remoção de isolados de Enterococcus e seu Pool, aderidos às superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno, à três tipos de sanitizantes (cloreto de benzalcônio, dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético);
- Fornecer subsídios às queijarias localizadas na Ilha do Marajó, para aumentar a segurança e a qualidade microbiológica dos derivados.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1 QUEIJOS ARTESANAIS NO BRASIL

Segundo o artigo 508 do Regulamento de Inspeção Industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA), entende-se por queijo “o produto fresco ou maturado, que é obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soro lácteos, coagulado pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para seu uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e corantes” (BRASIL, 1997a).

O queijo artesanal é definido como o queijo produzido na própria fazenda, a partir de leite cru e integral (MINAS GERAIS, 2002). São produtos processados segundo métodos tradicionais em pequena escala, muitas vezes por família ou por um determinado grupo. Sua denominação algumas vezes, é ligada ao nome do município de sua origem ou ao local de maior produção (SEBRAE, 2008).

A produção de queijo artesanal constitui uma das importantes atividades que promovem a geração de valor à pequena propriedade rural, com grande importância econômica, social e cultural. A econômica, como sendo principal fonte de renda ou na complementação da renda das famílias que comercializam o produto. A social, como instrumento capaz de conter o êxodo rural, mantendo o produtor rural no campo e contribuindo desta forma para a geração de novos postos de trabalho. E a cultural por representar referências culinárias regionais.

Estudos recentes têm mostrado que queijos artesanais apresentam uma microbiota particular para diferentes tecnologias de fabricação e área geográfica de origem, e essa microbiota é bastante heterogênea e modifica-se durante o período de estocagem ou maturação dos queijos (KONGO et al., 2007; SILVA et al., 2010; NÓBREGA, 2012). A ampliação do conhecimento sobre as populações microbianas, naturalmente presentes em queijos artesanais, ajuda a prevenir a extinção da sua biodiversidade e, conseqüentemente, a perda de uma grande variedade destes produtos (BERESFORD et al, 2001).

A fabricação de queijos artesanais necessita seguir normas rigorosas de higiene. Além disso, a matéria-prima deve originar-se de animais em condições sanitárias adequadas e fiscalizadas. Falhas no controle de qualidade tanto da matéria-prima, quanto no seu beneficiamento e estocagem, podem resultar em um produto de má qualidade e em risco de toxinfecções nos consumidores.

Devido às inúmeras reivindicações para fins de legalização dos queijos artesanais, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA criou regras através da Instrução Normativa 57, publicada no Diário Oficial da União, em 16/12/2011. A regulamentação prevê a possibilidade de maturação de queijos por período menor que 60 dias e define requisitos para sua produção, para garantir a qualidade e atender aos aspectos de saúde pública. As normas, no entanto, são restritas apenas para queijarias localizadas em regiões certificadas, ou tradicionalmente reconhecidas, e instaladas em propriedades produtoras de leite cru com status livre de tuberculose, brucelose e controle de mastite.

A partir das adequações necessárias, a produção de queijos artesanais passa a ser incluída no Sisbi-POA (Sistema Brasileiro de Inspeção de Produto de Origem Animal) do Suasa (Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária). A inclusão, que se iniciou pelas propriedades fixadas em Minas Gerais, Estado onde se concentra a maioria das queijarias artesanais no país, permite que os produtos com o selo do SIM (Serviço de Inspeção Municipal) ou do SIE (Serviço de Inspeção Estadual) sejam comercializados em todo o território nacional com equivalência ao selo do SIF (Serviço de Inspeção Federal).

## 2.2 QUEIJO DO MARAJÓ

Define-se o Queijo do Marajó como sendo “o produto elaborado artesanalmente na área geográfica do arquipélago do Marajó, conforme a tradição histórica e cultural da região, obtido pela fusão da massa coalhada, dessorada de leite de búfala e/ou leite de búfala misturado com leite bovino na proporção máxima de 40 %, lavada com água ou leite de búfala ou bovino, obtido por coagulação espontânea e adicionado de creme de leite ou manteiga” (PARÁ, 2013). Apresenta textura macia, compacta e fechada, com pequenos poros, aroma agradável, de cor branca, sabor ligeiramente ácido e salgado (FIGUEIREDO, 2006; SIMÕES et al, 2014).

A fabricação desse produto é uma tradição no Marajó, mesmo antes da introdução dos bubalinos, no final do século XIX, por fazendeiros portugueses e franceses residentes no local (FIGUEIRAS e QUADROS, 2002). No Marajó, os búfalos encontraram condições propícias para seu desenvolvimento, devido às pastagens naturais e campos inundáveis, o que beneficia a reprodução da espécie. O leite de búfala, que era consumido apenas na dieta alimentar dos nativos da região, foi testado e

passou a ser empregado na fabricação do Queijo do Marajó, misturado ao leite bovino. O Sr. João Batista Lima foi o primeiro criador a explorar a búfala como produtora de leite, elaborando em suas fazendas dos municípios de Cachoeira do Arari e Soure, o queijo Tipo Manteiga. Na mesma época, o produtor Francisco de Castro Ribeiro começou a inovar tecnologicamente a produção de queijo, importando da Holanda a primeira desnatadeira, originando o Tipo Creme (SILVA e OLIVEIRA, 2003).

O produto foi rapidamente aceito pelos habitantes do Pará. Nos anos atuais, esse queijo faz parte do hábito alimentar do paraense, e quase 70 % desse derivado é elaborado, exclusivamente, com leite de búfala (FIGUEIREDO et al, 2011).

De acordo com IBGE, em 2010, o rebanho nacional de bubalinos era de 1.207,461 milhões de animais. A região Norte, com 820.295 animais, é a que possui o maior quantitativo. Das 820.295 cabeças da região Norte, o Pará é o Estado em que se encontra o maior efetivo de bubalinos, com 492.495 mil animais, que responde por 60 % do rebanho dessa região. A Ilha do Marajó representa 62,5 % do efetivo bubalino do Estado. Os municípios de Soure, Salvaterra e Cachoeira do Arari são os maiores centros produtores do Pará de queijo de leite de búfala, constituindo-se como um investimento atrativo para a economia local (FIGUEIREDO et al., 2011). No período de safra, quando ocorre o período das chuvas (outubro a janeiro), com um volume de 12 toneladas/dia, a produção de Queijo do Marajó é estimada em 1.500 kg/dia, provenientes de cerca de 60 queijarias pertencentes à Ilha (SEBRAE, 2013). A comercialização é caracterizada pela venda direta ao consumidor, feita “*in loco*” pela própria população, e ao intermediário, o que é mais comum, o qual se desloca até o centro produtor, e adquire o derivado por um preço abaixo do ofertado, para entregá-lo, posteriormente, aos consumidores.

Existem duas variedades de Queijo do Marajó, o Tipo Creme, quando o cozimento da massa é feito adicionando-se o creme obtido do desnate, com cerca de 50 % de umidade e 22 % de lipídeos, e o Tipo Manteiga, quando em seu cozimento é adicionada a manteiga propriamente dita, com 35 % de umidade e teor de 42 % de lipídeos (LOURENÇO e SOUSA, 2005). A maioria do queijo Tipo Manteiga é produzida em Cachoeira do Arari, haja vista que não há queijarias com desnatadeira neste local. Em Soure e Salvaterra, produz-se predominantemente o Tipo Creme (FIGUEIREDO, 2006; BITTENCOURT et al., 2013).

Para a elaboração desse produto, o leite bubalino é inicialmente filtrado, com crivo de malha fina, com a finalidade de remover as sujidades grosseiras. Em seguida, é submetido à centrifugação ou desnate, separando-se o leite e o creme. O leite é

transferido para um tanque, por um período de 24 h, sob temperatura média de 26 °C, para a fermentação natural.

A massa resultante é colocada em sacos de nylon para dessora. É feita uma primeira lavagem com água, em tachos de aço inoxidável, e posteriormente a massa é levada ao aquecimento de  $\pm 55$  °C. Ocorre a prensagem da massa, e posteriormente uma segunda lavagem com água. As lavagens têm como objetivo diminuir a acidez da mesma, para 12° Dornic ou pH 5,2. A massa é submetida ao 1° cozimento, sob temperatura de  $\pm 80$  °C. Em seguida ocorre nova dessora (2ª prensagem). Adicionam-se, sobre a massa, 10 % de leite desnatado, fresco, proporcional ao volume da massa inicial.

Procede-se um segundo cozimento, a  $\pm 80$  °C por 15 min, e em seguida uma nova dessora (3ª prensagem). Faz-se o resfriamento da massa, e posteriormente o corte e a moagem. Faz-se a moagem da massa, homogeneamente, com auxílio de moedor, até atingir aspecto de “esfarelamento”. Sobre a massa esfarelada, são adicionados sorbato de potássio ( $\pm 0,1$  %) e cloreto de sódio (de 1 a 2 %), proporcional ao volume da massa inicial, ambos autorizados pela Portaria nº 418 (PARÁ, 2013).

O creme e a manteiga, obtidos no desnate, são adicionados lentamente, em pequenas proporções, nos queijos Tipo Creme e Manteiga, respectivamente, até que a massa absorva todo o creme e a manteiga adicionados. Procede-se a mexedura, sob temperatura de 55 °C, por aproximadamente 30 min (3° cozimento), até que o queijo atinja o “ponto”, percebido quando se desprende do fundo do tacho. Ocorre o pré-resfriamento, em local arejado, e segue-se a enformagem dos produtos.

De acordo com o reportado por Bendelak (2005), e Figueiredo et al. (2011), e seguindo os parâmetros da Portaria nº 418 (PARÁ, 2013), o Queijo do Marajó é classificado como gordo ou extra gordo (máximo de 65 % de matéria gorda no extrato seco; e máximo de 40 % de gordura total) e de média a alta umidade (mínimo de 35 % e máximo de 50 %).

Figueiredo et al. (2011) realizaram uma análise descritiva do Queijo do Marajó, Tipo Creme, com 20 provadores treinados, e verificaram que o mesmo foi caracterizado como um produto de elevada maciez, sendo comparado com o requeijão cremoso. A textura “borrachamento” foi muito pouco perceptível entre os provadores. A coloração encontrava-se de acordo com sua definição, sendo caracterizado como um derivado de cor branca. O aroma “lácteo” apresentou-se mais perceptível para os provadores que o aroma “ácido”. O gosto “ácido” e “salgado” não foram considerados de grande intensidade, apesar de o referido queijo ter em sua fabricação elevada proporção de cloreto de sódio. No Teste de Aceitação, verificou-se a destacada aceitabilidade, em

todos os atributos avaliados (cor, aroma, sabor e textura), com as médias oscilando entre “gostei regularmente” a “gostei muito”.

O Queijo do Marajó é um produto que não recebe adição de cultura láctica, sendo sua fermentação espontânea, e não possui nenhum tipo de tratamento térmico no leite de búfala. A fermentação ocorre em temperatura média de 28 °C e em recipientes abertos, propiciando a multiplicação de micro-organismos patogênicos e/ou lácticos presentes no leite ou provenientes da ausência de Boas Práticas durante a ordenha e/ou fabricação (FIGUEIREDO et al., 2011). Guimarães (2011) isolou bactérias lácticas de amostras de Queijo do Marajó, de leite de búfala, em Caldo Man, Rugosa e Sharpe - MRS, e observou que as amostras de queijo apresentaram contagens que variaram de < 1,00 log UFC/g a 6,39 log UFC/g.

Fazendo-se uma comparação às duas estações do ano, período seco e chuvoso, Guimarães (2011) verificou que no período seco foram isoladas menos BAL (83) no Queijo do Marajó que no período chuvoso (200). Dos 83 isolados obtidos no período seco, somente 10 foram confirmados gram-positivos e catalase negativos, enquanto que dos 200 isolados obtidos no outro período, 148 foram confirmados gram-positivos e catalase negativos. As BAL isoladas no queijo Tipo Creme foram identificadas como: *L. lactis* spp *lactis*, *S. thermophilus* e *Enterococcus* spp.

Um dos problemas de maior relevância nas queijarias da Ilha do Marajó é a falta de higiene e de cuidados básicos durante as etapas de elaboração do produto (BENDELAK, 2005; FIGUEIREDO, 2006; BITTENCOURT et al., 2013). No que se refere às características microbiológicas, ao analisar o Queijo do Marajó, Tipo Creme, elaborado sem cuidados higiênico-sanitários, Toro e Sousa (2002), e Figueiredo (2006) verificaram a presença de bactérias aeróbias mesófilas, com média de  $2,0 \times 10^2$  UFC/g, e fungos filamentosos e leveduras, com média de  $5 \times 10^5$  UFC/g. Somente Bendelak, em 2004, observou a presença de coliformes totais e termotolerantes, com contagens de 110 NMP/g. A contaminação por *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* não são frequentemente observadas.

Na avaliação da vida de prateleira do derivado durante 15 dias de armazenamento, sob temperatura de 10 °C, Lourenço e Sousa (2005) verificaram que os resultados para coliformes totais aumentaram de 3 NMP/g para 240 NMP/g, e coliformes termotolerantes aumentaram de < 3 NMP/g para 240 NMP/g, tornando-se inadequado ao consumo humano a partir do 15º dia. Figueiredo (2006), ao elaborar o mesmo produto com Boas Práticas de Higiene observou que o mesmo só se tornou inadequado ao consumo humano, a partir do 21º dia, com a multiplicação de fungos

filamentosos e leveduras, com níveis de  $6,4 \times 10^3$  UFC/g, pois segundo a Portaria nº. 001, de 28/01/1987, o limite máximo permitido para fungos filamentosos e leveduras em queijo fundido e/ou pasteurizado é de  $10^3$  UFC/g (BRASIL, 1987).

A infraestrutura de 70 % das queijarias da Ilha do Marajó é inadequada, possuem instalações zootécnicas incipientes, com construções de madeira inadequadas às exigências das instituições de fiscalização sanitária animal. Bendelak (2004), Figueiredo (2006), e Simões et al. (2014) constataram que os locais de ordenha não apresentam condições adequadas de higiene, além da ordenha ser realizada sem o uso de Boas Práticas. Pesquisas realizadas por Figueiredo (2006) e Simões et al. (2014) comprovaram que durante as etapas de elaboração do derivado ocorrem diversas falhas higiênicas. Simões et al. (2014) encontraram a presença de fragmentos de tecido de algodão, provenientes dos sacos utilizados para filtração do leite e do soro, em 100 % das amostras de queijo analisadas. Pêlos e fragmentos de insetos também foram encontrados em todas as amostras.

Entretanto, desde 2010, alguns laticínios do Marajó têm tentado melhorar o padrão de qualidade da produção do queijo, implantando as Boas Práticas de Fabricação e aplicando o processo de pasteurização na matéria-prima (GUIMARÃES, 2011). E em 2013, considerando a importância socioeconômica do Queijo do Marajó para o Pará, a importância de se estabelecer normas higiênico-sanitárias e Boas Práticas de Produção e de Fabricação, suas características históricas e culturais do Marajó, bem como a necessidade de caracterizar seu processo de produção, a Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARÁ, através da Portaria nº 418, de 04/03/2013, aprovou o Regulamento Técnico de Produção do Queijo do Marajó (PARÁ, 2013).

Esta portaria descreve as Boas Práticas Agrícolas – BPA, Boas Práticas de Fabricação – BPF, Controle da Produção Aplicada às Queijarias, e Padrões e Identidade e Qualidade do Queijo do Marajó, a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias, de segurança e controles de fabricação, para obtenção de um produto de qualidade e seguro (PARÁ, 2013).

### 2.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM QUEIJOS ARTESANAIS

A produção de queijos artesanais envolve a participação de diversos micro-organismos. Essa microbiota pode ser dividida em dois grupos: bactérias ácido

láticas denominadas de Starters - SLAB e micro-organismos secundários, denominados de Non Starter Lactic Acid Bacteria - NSLAB. As bactérias SLAB estão envolvidas na produção de ácido durante a fabricação do queijo e contribuem no processo de maturação. As bactérias NSLAB não contribuem para a produção de ácido, mas em geral, desempenham um papel significativo durante a maturação, multiplicando-se internamente em uma grande variedade de queijos (BERESFORD et al., 2001).

Em diferentes tipos de queijos elaborados com leite in natura ou pasteurizado, a classe dominante de NSLAB são lactobacilos facultativos homofermentativos, especialmente *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus curvatus*, e estrictos heterofermentativos, particularmente *Lactobacillus brevis*, sendo encontrado em menor quantidade (BERESFORD et al., 2001).

As SLAB são as principais responsáveis pela inibição de micro-organismos patogênicos. De acordo com sua espécie, são utilizadas como culturas iniciadoras em alimentos fermentados, e produzem várias substâncias antimicrobianas utilizadas para a bioconservação de alimentos (ARAÚJO et al., 2008). Outro aspecto importante é a sua contribuição no desenvolvimento das propriedades sensoriais dos alimentos fermentados, pela capacidade de produzir um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas, com modificação gradativa da estrutura e do aroma dos alimentos fermentados. A degradação da caseína, por exemplo, por proteinases e peptidases contribui para a formação da textura e características sensoriais dos queijos, redução do pH e retenção de água na massa pelos aminoácidos e peptídeos livres. Os aminoácidos formados podem ainda ser degradados em aminas, ésteres, e ácidos, os quais contribuem para a produção de aromas (SILVA et al., 2010).

Bactérias ácido láticas (BAL) pertencem ao grupo de micro-organismos gram-positivos, catalase negativos, embora algumas espécies possam produzir uma pseudo-catalase quando multiplicadas em meio com baixa concentração de açúcar, não formadores de esporos e que geralmente se multiplicam sob condições microaerófilas ou estrictamente anaeróbicas. Os mais importantes gêneros de BAL são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* e *Tetragenococcus* (FOX et al., 2000; BERESFORD et al., 2001).

Podem ser agrupadas em homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com os produtos de fermentação. As homofermentativas produzem ácido láctico a partir da glucose enquanto as heterofermentativas produzem dióxido de carbono, ácido acético, etanol, dentre outras, além de ácido láctico (FOX et al., 2000). Ressalta-se que,

no caso específico das BAL heterofermentativas, sua utilização em alimentos é, sobretudo, pela sua capacidade de produzir compostos flavorizantes, muito mais do que pela sua habilidade acidificante. Isto ocorre porque esses micro-organismos utilizam na fermentação de hexoses a via pentose monofosfato, com produção durante o processo de conversão de hexose em pentose, substâncias aromáticas, como aldeído e diacetil (MACEDO et al., 2004).

Estes micro-organismos podem ser divididos, ainda, de acordo com a temperatura de multiplicação, em mesofílicos e termofílicos. Os mesofílicos multiplicam-se a uma temperatura ótima de 30 °C e os termofílicos multiplicam-se a uma temperatura ótima de 42 °C (FOX et al., 2000). Entre as culturas mesofílicas encontram-se *Lactococcus lactis* sp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, sendo utilizados para os queijos processados em temperaturas moderadas, ou seja, inferiores a 40 °C, como queijo tipo Gouda e Edam. Para queijos que requerem altas temperaturas durante o processamento, são utilizadas culturas termofílicas como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. (HELLER et al., 2008).

### **2.3.1 Enterococcus**

Anteriormente, *Enterococcus* eram classificados como um grupo pertencente ao gênero *Streptococcus*, mais precisamente aos estreptococos do grupo D de Lancefield, também conhecido como grupo dos “estreptococos fecais”. Entretanto, técnicas modernas de classificação como o sequenciamento do 16s rDNA resultaram na transferência de alguns membros do gênero *Streptococcus* do grupo D de Lancefield ao novo gênero *Enterococcus*, que pertencem à família *Enterococcaceae*, composto pelos gêneros *Atopobacter*, *Catelicoccus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (GIRAFFA, 2003).

Esse gênero inclui mais de 20 espécies, sendo *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans* as espécies mais frequentes em produtos lácteos. São encontrados em grandes proporções no trato gastrointestinal de mamíferos, no solo, superfície das águas e plantas. Entre outras características, podem ocorrer sob a forma de cocos isolados, em pares, ou em cadeias curtas, são homofermentativos, não esporulados, gram-positivos, catalase negativo, e anaeróbios facultativos (FORTINA et al., 2003).

É o gênero de BAL mais controverso não sendo considerado GRAS (Geralmente Reconhecido Como Seguro), pois alguns estudos o apontam como patógeno emergente para humanos. Segundo Carvalho (2007), a preocupação para a saúde pública com a presença de *Enterococcus* em alimentos está relacionada ao seu habitat entérico, seu uso como indicadores de segurança alimentar e seu possível envolvimento em doenças de origem alimentar. No entanto, por muito tempo estes micro-organismos foram considerados de baixa capacidade patogênica, devido a falta de fatores potenciais de virulência quando comparados com patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (FORTINA et al., 2003).

Ocorrem em uma grande variedade de queijos, especialmente em queijos artesanais, os quais são produzidos a partir de leite cru. Nesses produtos, *Enterococcus* advêm da matéria-prima ou do ambiente, de acordo com as condições de higiene do processo (FONTÁN et al., 2001; MEDINA et al., 2001). Sua presença nos alimentos é associada a contaminações intestinais ou ambientais e multiplicam-se durante a fermentação (GIRAFFA, 2003), frequentemente presentes em grande número em produtos lácteos (SARANTINOPOULOS et al., 2001). Sobrevivem a condições adversas, como pH, temperaturas e salinidade extremos (CARIDI et al., 2003).

A presença destes micro-organismos em queijos produzidos com leite pasteurizado é associada à sua capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura, de 10 a 45 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento 35 °C. Apresenta grande resistência a altas temperaturas, tendo espécies que podem sobreviver a 60 °C por 30 min, sendo consideradas termorresistentes. Também podem aumentar durante a refrigeração do leite. No entanto, a alta contaminação de *Enterococcus* em alguns queijos industrializados a partir de leite pasteurizado, geralmente resulta de práticas inadequadas de higiene durante a elaboração dos mesmos (CARIDI et al., 2003).

De acordo com Folquié-Moreno et al. (2006), existem algumas exceções para este gênero. Há espécies que não crescem a 45 °C, como *E. dispar*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis* e *E. sulfureos*, e outras que não crescem a 10 °C, como *E. cecorum* e *E. columbae*. Há aquelas que se desenvolvem pouco ou não se desenvolvem na presença de 6,5 % de NaCl, como por exemplo *E. avium*, *E. columbae*, *E. cecorum* e *E. saccharominimus*.

Enquanto alguns estudos mostram a relação entre a presença desta bactéria e a deterioração de alguns produtos alimentares, outros defendem o seu papel de promover características sensoriais desejáveis em queijos e produtos fermentados (FOLQUIÉ-MORENO et al., 2006; MORENO et al., 2006). Sua influência positiva em queijos é

devida ao desenvolvimento de características sensoriais, por reações bioquímicas como a proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos aromáticos voláteis. Produzem substâncias que atuam no flavor como diacetil e acetoína, além de enzimas, que durante a maturação, podem contribuir para a textura dos produtos (ARAÚJO et al., 2008).

Além disto, algumas espécies podem produzir bacteriocinas, motivo pelo qual são aplicadas como fermento láctico primário (GIRAFFA, 2003). Bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* possuem atividade antimicrobiana sobre bactérias gram-positivas, incluindo bactérias formadoras de esporos e bactérias patogênicas como *Listeria* spp. Estas bacteriocinas têm sido motivo de investigação pela possibilidade de serem empregadas na biopreservação dos alimentos devido principalmente às características de resistência ao calor e à atividade em ampla faixa de pH (SARANTINOPOULOS et al., 2002; MORENO et al., 2006).

Em trabalho realizado por Carvalho (2007) sobre a avaliação da atividade antagonista e produção de bacteriocinas por BAL contra *Listeria* spp., foi verificado que as culturas de *Enterococcus* foram as que apresentaram maior poder de inibição. Dentre os 37 *Enterococcus* considerados não patogênicos, 21 culturas da espécie *E. faecium*, impediram o crescimento de cepas de *Listeria* spp. Essa ação inibitória foi desencadeada por bacteriocinas, porque os mesmos isolados que apresentaram atividade antagonista, também foram produtores de bacteriocinas.

Ressalta-se o papel que podem desempenhar como probióticos, tendo algumas estirpes, propriedades que permitem a inibição de micro-organismos patogênicos, que reforçam as barreiras mucosas, que estimulam o sistema imunológico e que diminuem as concentrações de colesterol no sangue. No entanto, a utilização de *Enterococcus* como probióticos tem sido posta em causa devido ao aumento de estirpes que apresentam resistências a antibióticos e à crescente associação desse gênero com doenças em humanos (CARVALHO, 2007). Fonseca (2010) afirmou que *E. faecalis* e *E. faecium* são as principais espécies que atuam como bactérias probióticas, por promover o desenvolvimento da microbiota intestinal, fortalecer o sistema imunológico e reduzir a inflamação, mas sendo as mesmas, as principais causadoras de infecção e as mais frequentemente isoladas em amostras clínicas.

## 2.4 ADESÃO BACTERIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME

Em seu habitat, as bactérias podem existir em duas formas diferentes: no estado planctônico, em que se apresentam de forma livre, e no estado sésil, em que estão aderidas a uma superfície. O principal conceito do estudo de biofilmes é a diferença no estado fisiológico destas bactérias (AZEREDO et al., 2011).

A adesão e a formação de biofilmes microbianos podem ser indesejáveis sob diversos aspectos na indústria de alimentos, uma vez que podem reduzir a eficiência de transferência de calor em trocadores de calor, reduzir o escoamento em tubulações, desencadear processos corrosivos e, principalmente, tornarem-se fontes de contaminação microbiana (ANDRADE et al., 2008). Sob o aspecto microbiológico, a adesão pode constituir-se de micro-organismos alteradores e/ou patogênicos, que resultam em graves problemas de higiene, de saúde pública e de ordem econômica (AZEREDO et al., 2011).

Por outro lado, a formação de biofilmes pode ser desejável para as indústrias, com em estações de tratamento de água ou de efluentes e redução da quantidade de matéria orgânica na água ou efluentes, através da interação com biofilmes (XAVIER et al., 2005). Para a indústria de alimentos, alguns exemplos podem ser citados, como a produção de vinagre, ácido cítrico e vinho, no qual as bactérias produtoras de ácido acético crescem em biofilmes sobre camadas finas dos tonéis de madeira ou de concreto apresentando como função a conversão do substrato em produto final (GARRETT et al., 2008).

Para o início da formação de um biofilme, é necessário que ocorra primeiro a adsorção de resíduos orgânicos à superfície, levando a formação de um filme condicionante sobre o qual as bactérias iniciam a adesão. O filme condicionante é estabelecido nos primeiros 5 a 10 s, pela ação da força gravitacional ou pelo movimento do fluido que conduzirá partículas orgânicas e inorgânicas, como lipídeos, sais minerais e proteínas, à superfície do substrato em meio aquoso (ANDRADE et al., 2008).

Na primeira etapa de adesão da bactéria à superfície, ocorre inicialmente a adsorção reversível, regulada pela atração eletrostática e por forças físicas, como forças de van der Waals e interações hidrofóbicas, o que propicia fácil remoção da célula bacteriana. Estas forças são dependentes das propriedades físico-químicas da superfície e da superfície da bactéria, que são a hidrofobicidade e a carga elétrica. Nesta etapa, as bactérias exibem movimento aleatório randômico, podendo ser facilmente desagregadas da superfície com a higienização (HOOD e ZOTTOLA, 1995).

Já a segunda etapa é irreversível, uma vez que o tempo de aderência inclui adesão físico-química da célula à superfície por material extracelular de natureza

polissacarídica ou proteica, produzido pelo micro-organismo, denominado matriz de glicocálix. O glicocálix auxilia a formação do biofilme e é produzido apenas após a adesão superficial fornecendo condições para adesão do peptidoglicano presente na parede celular de bactérias gram-positivas e na parte externa da membrana externa das bactérias gram-negativas de natureza lipoprotéica (HOOD e ZOTTOLA, 1995; HORI e MATSUMOTO, 2010).

No controle e na prevenção de biofilmes microbianos, a etapa de remoção de resíduos é fundamental. Um biofilme presente em uma superfície com resíduos oriundos de alimentos impede uma efetiva penetração do sanitizantes para inativar os micro-organismos. O sanitizante interage com resíduos de proteínas, gorduras, carboidratos e minerais, fazendo com que sua atividade seja ainda mais prejudicada. As bactérias aderidas são cobertas com material orgânico, que pode inibir a penetração do sanitizantes devido a perda de propriedades umectantes. Portanto, a atividade de detergência é necessária para remover essa camada externa, antes da utilização do sanitizantes. Quando o biofilme é tratado corretamente com detergentes, antes do uso de sanitizantes, a população de micro-organismos será reduzida. No entanto, procedimentos de higienização incorretos não removem e nem inativam os micro-organismos aderidos. Ressalta-se que micro-organismos mortos devem ser removidos, pois, do contrário, pode agir como um filme condicionante e como fonte de nutrientes para uma posterior formação de biofilmes (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

As células em biofilmes também são resistentes à exposição à luz ultravioleta, toxicidade de metais, exposição a ácidos, desidratação e fagocitose (GARRETT et al., 2008).

A colonização microbiana e conseqüentemente, a formação de biofilme, é acompanhada por processos físico-químicos e microbiológicos (GARRETT et al., 2008; HORI e MATSUMOTO, 2010).

#### **2.4.1 Aspectos físico-químicos da adesão microbiana**

O estudo da adesão da bactéria à superfície requer o conhecimento das características físico-químicas da superfície da bactéria, da superfície de adesão e da interação entre elas. A possibilidade de formar ligações específicas entre a bactéria e a superfície depende de suas composições físico-químicas e da composição da camada mais externa da célula. Além disso, deve-se considerar as características do meio onde a

célula se encontra como a presença de substâncias que podem condicionar as superfícies, pH, temperatura, tempo de exposição, concentração de células microbianas, tensão superficial e força iônica do meio (CHAVES, 2004).

Diferentes abordagens foram utilizadas para descrever e prever a adesão bacteriana em superfícies. Em geral, a adesão pode ser descrita pela Teoria Termodinâmica, a qual utiliza a equação modificada de Dupré (Equação 1), a Teoria DLVO e a Teoria DLVO Estendida, que complementa a primeira.

Na Teoria Termodinâmica, a adesão ocorre quando durante o processo, houver redução da variação da energia livre de Gibbs total (variação da energia livre de adesão,  $\Delta G^{TOT}$ ). Nesse modelo, não são consideradas as interações eletrostáticas e as interações específicas mediadas por exopolímeros ou apêndices extracelulares (AZEREDO et al., 2011).

$$\Delta G^{TOT} = \gamma_{sb} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl} \quad (1)$$

Em que  $\gamma_{sb}$  é a tensão interfacial entre superfície e bactéria,  $\gamma_{sl}$  a tensão interfacial entre superfície e líquido, e  $\gamma_{bl}$  a tensão interfacial entre bactéria e líquido, sendo as unidades expressas em  $\text{mJ.m}^{-2}$  (VAN OSS, 1991).

A adesão de um micro-organismo a uma superfície sólida em solução aquosa só se estabelece se o filme de água que reveste as duas superfícies for removido. Portanto, a interface bactéria/líquido ( $bl$ ) e a interface superfície de adesão/líquido ( $sl$ ) terão que ser substituídas pela interface bactéria/superfície de adesão ( $bs$ ) (CHAVES, 2004).

Como todo sistema na natureza, a interação micro-organismo e superfície irá proceder em direção à diminuição de energia livre. Isso significa que a adesão do micro-organismo ocorrerá se  $\Delta G^{TOT}$  for negativa, mas será termodinamicamente desfavorável, se for positiva. O cálculo das tensões interfaciais  $\gamma_{sl}$  e  $\gamma_{bl}$  é possível pela obtenção da medida do ângulo de contato ( $\theta$ ) entre substrato, ou bactéria, com líquidos – padrão cuja componente da tensão interfacial é conhecida (VAN OSS, 1991). Na Tabela 1, são mostrados os componentes da tensão interfacial de alguns líquidos, a 25 °C.

Tabela 1 – Componentes da tensão de interfacial de líquidos, a 25 °C.

Líquido	Tensão Interfacial ( $\text{mJ.m}^{-2}$ )			
	$\gamma_l^{TOT}$	$\gamma_l^{LW}$	$\gamma_l^+$	$\gamma_l^-$

$\alpha$ -Bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
Formamida	58,0	39,0	2,28	39,6

Fonte: VAN DER MEI et al. (1998).

Quando é utilizada a Teoria DLVO, os micro-organismos são considerados partículas quimicamente inertes, ou seja, seriam como colóides liofóbicos. Isso ocorre uma vez que a maioria das bactérias não excede 2,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e a sua densidade é superior a da água, podendo ser considerada, nesse caso, como partículas coloidais vivas. Porém, não há consideração dos aspectos microbiológicos da adesão. Essa teoria afirma que a energia potencial total de interação entre dois corpos é resultante da ação combinada entre as forças atrativas de Lifshitz – van der Waals e as forças de dupla camada elétrica (Equação 2), que geralmente são repulsivas.

$$\Delta G^{TOT} = \Delta G^{EL} + \Delta G^{LW} \quad (2)$$

Em que  $\Delta G^{EL}$  é a variação da energia livre das forças da dupla camada elétrica, e  $\Delta G^{LW}$  é a variação da energia livre das forças da Lifshitz – van der Waals (VAN OSS et al., 1990).

A Teoria DLVO considera apenas a atração das forças de longo alcance. No entanto, quando uma partícula ou micro-organismo está muito próximo (2 a 5 nm) de uma superfície, forças de curto alcance passam a regular o processo, sendo denominadas não-DLVO. Van Oss et al. (1990) integraram os aspectos termodinâmicos da adesão à Teoria DLVO. Essa teoria ficou conhecida como XDLVO ou DLVO Estendida, e considerou as forças de curto alcance, principalmente as interações hidrofóbicas. A variação da energia livre das interações totais em uma superfície ( $\Delta G^{TOT}$ ) é resultante do somatório das energias livres das interações de Lifshitz – van der Waals ( $\Delta G^{LW}$ ), interações ácido-base de Lewis ( $\Delta G^{AB}$ ), forças eletrostáticas de dupla camada elétrica ( $\Delta G^{EL}$ ) e interações resultantes dos movimentos Brownianos ( $\Delta G^{BR}$ ) (Equação 3) (VAN OSS, 1991).

$$\Delta G^{TOT} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB} + \Delta G^{EL} + \Delta G^{BR} \quad (3)$$

A intensidade das forças de Lifshitz-Van der Waals é diretamente proporcional ao tamanho das partículas que se interagem e na razão inversa da distância à superfície. As forças de dupla-camada elétrica estão relacionadas à carga elétrica superficial. A

superfície de um sólido eletricamente carregado em contato com uma solução aquosa atrai íons de sinal contrário do meio e simultaneamente repele os de sinais iguais. Uma vez que a maioria das superfícies adquire carga negativa em solução, as forças da dupla camada elétrica apresentam, geralmente, um caráter repulsivo. Dessa maneira, a adesão somente será irreversível quando a variação da energia livre de Gibbs total for negativa ( $\Delta G^{TOT} < 0$ ) e a distância entre a superfície e o micro-organismo for mínima possível (ANDRADE et al., 2008).

#### 2.4.1.1 Hidrofobicidade e carga elétrica

As interações hidrofóbicas possuem um papel importante na adesão de micro-organismos. São induzidas por moléculas de água situadas no meio de solutos apolares. As bactérias apresentam carga elétrica negativa em pH neutro, e podem apresentar variações na hidrofobicidade, em função do crescimento bacteriano, condições de cultivo e quantidade de água do meio. Assim, a hidrofobicidade de bactérias gram-negativas é aumentada quando a quantidade de água no meio é reduzida porque a membrana externa tem grande concentração de lipídeos e pouco peptidoglicano. Já as bactérias gram-positivas são menos influenciadas pela modificação da umidade do meio, em função de grande concentração de peptidoglicano em sua membrana e menor quantidade de lipídeos (STREVETT e CHEN, 2003).

A hidrofobicidade é expressa como energia hidrofóbica de atração e estabelece o grau de interação entre as moléculas de um material imerso em água. É definida em termos de energia livre de interação entre as moléculas das superfícies imersas em água ( $\Delta G_{SAS}^{TOT}$ ). Quando a variação da energia livre global de interação entre as moléculas imersas em água é atrativa, ou seja, o valor de  $\Delta G_{SAS}^{TOT}$  é negativo ( $\Delta G_{SAS}^{TOT} < 0$ ), significa que as moléculas do sólido têm maior afinidade entre si do que pela água, sendo considerada uma superfície hidrofóbica. E quando a variação da energia livre global de interação entre as moléculas de um sólido imerso em água é suficientemente repulsiva, ou seja, o valor de  $\Delta G_{SAS}^{TOT}$  é positivo ( $\Delta G_{SAS}^{TOT} > 0$ ), a superfície é considerada hidrofílica (VAN OSS e GIESE, 1995).

Dentre os vários métodos usados para determinar a hidrofobicidade incluem-se a adesão microbiana a hidrocarbonetos, a cromatografia de interação hidrofóbica, a adesão a superfícies hidrofóbica, agregação por adição de sais, partição hidrofóbica em um sistema aquoso bifásico e a medida do ângulo de contato. No entanto, o único

método que permite determinar um valor quantitativo da hidrofobicidade é a medida do ângulo de contato, pois os demais fornecem apenas um valor relativo para comparação entre micro-organismos ou superfícies (CHAVES, 2004).

A carga elétrica superficial do micro-organismo, adquirida quando imersos em solução aquosa é importante para a adesão. Isso pode ocorrer por adsorção de íons ou ionização de grupos químicos, uma vez que na superfície celular existem compostos ácidos, como os carboxílicos e fosfatos, e básicos, como o grupo amina, que reagem com os íons  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$  presentes na solução. Além disso, este fenômeno é dependente do pH do meio, sendo que em soluções próximas da neutralidade, as bactérias possuem uma carga global negativa em consequência de haver um maior número de grupos fosfatos e carboxílicos. Porém, quando o pH é muito baixo, as bactérias podem apresentar uma carga global positiva, por causa da predominância de grupos amina (DENYER et al., 1993).

Se a bactéria e a superfície apresentarem o mesmo sinal e o meio apresentar elevada força iônica, haverá um máximo de energia potencial, ou energia de barreira e, um mínimo de energia, designado mínimo primário, que se localiza a distância inferior a 2 nm da superfície. A redução de energia de barreira ocorre quando se aumenta a força iônica do meio, em consequência da diminuição da energia potencial da dupla camada elétrica. Quando o meio apresenta valores intermediários de força elétrica, o máximo de energia diminui, mas aparece um mínimo secundário. Nessas condições, o máximo de energia é em geral baixo e o seu valor é tanto menor quanto menor for a partícula. Se o máximo de energia for ultrapassado e o mínimo primário for alcançado, a ligação entre a bactéria e o substrato torna-se irreversível. Para valores elevados da força iônica do meio, a energia potencial de interação é negativa, e nesse caso, todas as partículas podem atingir o mínimo primário. A existência de dois mínimos de energia permite distinguir, a adesão reversível, quando ocorre o mínimo secundário, da adesão irreversível, quando ocorre o mínimo primário (GARRETT et al., 2008).

#### 2.4.1.2 Medição do ângulo de contato

As energias livres das superfícies podem ser determinadas pela medição do ângulo de contato, o qual permite medir a interação entre uma superfície e um líquido.

O ângulo de contato ( $\theta$ ) formado por uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida é o ângulo entre um plano tangente a uma gota e a superfície onde o

líquido está depositado. Este ângulo permite avaliar a molhabilidade dessa superfície. Se o líquido for a água, o ângulo formado será relacionado à hidrofobicidade da superfície. De acordo com Van Oss e Giese (1995), ângulos inferiores a 50° indicam uma superfície hidrofílica, e ângulos superiores a 50°, indicam superfície hidrofóbica. Segundo Vogler (1998), uma superfície hidrofóbica deve apresentar ângulo de contato com a água superior a 65°.

A equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes relaciona o ângulo de contato formado por um líquido sobre uma superfície sólida com os componentes da tensão interfacial do líquido ( $\gamma_l^{LW}, \gamma_l^+, \gamma_l^-$ ) e da superfície ( $\gamma_s^{LW}, \gamma_s^+, \gamma_s^-$ ). Para realizar essas medidas, deve-se utilizar um líquido apolar e dois polares, os quais devem cumprir o requisito de ter tensão interfacial superior à tensão interfacial do sólido, para que o mesmo não se espalhe rapidamente, impossibilitando a medida (Equação 4).

$$(1 + \cos\theta)\gamma_l^{TOT} = 2 \left( \sqrt{\gamma_s^{LW}\gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+\gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^-\gamma_l^+} \right) \quad (4)$$

De acordo com a equação,  $\gamma_l^{TOT}$  é a tensão interfacial total do líquido,  $\gamma_l^{LW}$  e  $\gamma_s^{LW}$  são as tensões interfaciais das forças de interações de Lifshitz-van der Waals,  $\gamma_l^+$  e  $\gamma_s^+$  são as tensões interfaciais dos componentes aceptores de elétrons do componente ácido-base e  $\gamma_l^-$  e  $\gamma_s^-$  são as tensões interfaciais dos componentes doadores de elétrons do componente ácido-base, e os subscritos s e l indicam superfície e líquido, respectivamente. Para líquidos apolares, a componente polar da tensão superficial é nula e, portanto, a Equação 4 reduz-se à Equação 5:

$$\gamma_s^{LW} = \frac{\gamma_l^{TOT}}{4} (1 + \cos \Theta)^2 \quad (5)$$

As equações permitem determinar as componentes da tensão interfacial de líquidos a 25 °C (Tabela 1) (VAN DER MEI et al., 1998).

#### 2.4.2 Aspectos microbiológicos da adesão microbiana

Sabe-se que o conteúdo da matriz extracelular em substâncias poliméricas varia de 50 a 90 %. A maioria dessas substâncias é polissacarídea. Os açúcares, como glicose,

manose, frutose, N-acetilglicosamina, ácido glucurônico e ácido galacturônico são típicos constituintes do polissacarídeo bacteriano (DENYER et al., 1993).

Algumas estruturas extracelulares, conhecidas como apêndices celulares, podem facilitar a adesão das bactérias à superfície. Quando a bactéria não faz contato direto com a superfície, a adesão é mediada por estes apêndices que são capazes de sobrepor os efeitos da repulsão eletrostática. Eles podem variar em tamanho e rigidez e chegam a ter várias vezes o tamanho da célula. Dentre estas estruturas extracelulares destacam-se: os flagelos, que são estruturas responsáveis pela motilidade das bactérias e medeiam a adesão irreversível que é estabelecida por pontes poliméricas; polímeros extracelulares, que correspondem às substâncias excretadas pelas bactérias para o ambiente, sendo sua produção associada à adesão irreversível de bactérias a superfícies de adesão por pontes poliméricas; as fímbrias, que são apêndices que não estão associados à motilidade das bactérias, mas são responsáveis pela capacidade de adesão das bactérias a outras bactérias, a células animais ou vegetais ou a partículas sólidas; e a pili, estruturas similares às fímbrias, que são, em geral, mais longas, e também estão envolvidas no processo de adesão microbiana (CHAVES, 2004; ANDRADE et al., 2008).

Os apêndices contribuem para a característica de superfície, assim como para a hidrofobicidade, a carga superficial e a energia livre de superfície, além do fato de que muitas substâncias podem estar transientemente associadas com a superfície da célula e afetar suas propriedades. Um exemplo é o composto anfifílico conhecido como ácido lipoteicóico, que é essencialmente um constituinte da membrana citoplasmática de muitas bactérias gram-positivas. Porém, migra através da parede celular para o líquido do meio ambiente. Na superfície da célula, o ácido lipoteicóico pode atuar como uma molécula específica ligando, por exemplo, o *Streptococcus pyogenes* às células epiteliais e, ao mesmo tempo, mediando a ligação na interface água/hidrocarbono (CHAVES, 2004).

As substâncias poliméricas extracelulares influenciam as propriedades físico-químicas dos biofilmes, incluindo difusividade, condutividade térmica e propriedades reológicas. Por causa da densidade de cargas e do estado iônico encontrado no exopolissacarídeo, pode ocorrer a formação de uma barreira elétrica contra a difusão de diversas substâncias, havendo uma filtração de moléculas, o que impede a entrada de certas substâncias no biofilme. A natureza altamente hidratada e predominantemente polianiônica dos exopolissacarídeos também evidencia que eles podem atuar como uma matriz trocadora de íons, servindo para aumentar a concentração local de formas

iônicas, como metais pesados, amônia e potássio, dentre outros, que têm um efeito oposto aos grupos aniônicos. Tal comportamento pode não ter efeito sob nutrientes carregados, incluindo açúcares, contudo pode servir como armadilha para nutrientes catiônicos, como aminas, especialmente sob condições oligotróficas (DENYER et al., 1993).

## 2.5 BIOFILMES NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS

As superfícies que estão em contato com os queijos favorecem o desenvolvimento de micro-organismos por fornecer nutrientes em quantidade excessiva. Os diversos micro-organismos presentes competem pelos nutrientes, por meio de mecanismos diretos, pela liberação de metabólitos antagonistas como bacteriocinas e ácidos orgânicos, e indiretos, relacionado à competição não específica na qual determinada espécie suprime o crescimento de outra, pelo melhor aproveitamento dos recursos, mecanismo conhecido como “efeito Jameson”, que é um tipo de competição entre as espécies que utilizam recursos do ambiente maximizando a multiplicação e a densidade populacional de determinadas espécies e inibindo o crescimento de outras. Esse efeito é frequentemente observado em alimentos com predominância de bactérias lácticas (KIM et al., 2009).

Biofilmes formados nas indústrias de produtos lácteos, em geral, uma única espécie microbiana predomina, consequência do tratamento térmico do leite por ocasião da pasteurização, o que reduz a competição das espécies gram-negativas sensíveis ao aquecimento, e permite que espécies termorresistentes sejam frequentemente encontradas no leite (FIGUEIREDO et al., 2007).

O desenvolvimento de biofilmes constituídos por bactérias lácticas termorresistentes como *Streptococcus* e *Enterococcus* tem causado contaminação em queijos e nos equipamentos e utensílios, que resultam em problemas de qualidade nos produtos lácteos. Em linha de processamento de leite, o número de *Streptococcus* pode atingir mais de  $10^6$  UFC/mL, após 7 a 8 h de operação (FIGUEIREDO et al., 2007).

Por outro lado, em queijos artesanais, a microbiota benéfica do biofilme em mesas de fabricação, utensílios e prateleiras, podem atuar nas diferentes fases, o que contribui para a fabricação, maturação e nas características típicas desses queijos. De acordo com Kim et al. (2009), a presença de BAL nos biofilmes das superfícies pode exercer um papel benéfico, uma vez que ocorrendo o antagonismo, a taxa de adesão de

patógenos será controlada. Licitra et al. (2007) por meio de técnicas de Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE) e Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) verificaram que os biofilmes existentes em tinas de madeira, utilizadas na produção artesanal do queijo Ragusano, continham essencialmente espécies lácticas de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, que são liberados do biofilme para o leite, o que acelera o processo de acidificação, importante para a segurança do produto.

## 2.6 SUPERFÍCIES UTILIZADAS NO PROCESSAMENTO DE QUEIJOS

As superfícies utilizadas em indústrias e que entram em contato com os alimentos apresentam diferentes microtopografias, podendo apresentar fissuras ou fendas com tamanho suficiente para alojar micro-organismos. A ocorrência destas imperfeições origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência da higienização e iniciar o processo de adesão microbiana. A rugosidade dos materiais também influencia na formação de biofilmes (MIDELET e CARPENTIER, 2004).

A Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997, do SVS/MS (BRASIL, 1997b) aprovou o “Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos”, definindo as condições técnicas para a utilização de materiais que compõem equipamentos e utensílios. De acordo com esta Portaria, todo equipamento e utensílio utilizado nos locais de manipulação de alimentos que possam entrar em contato com o alimento devem ser confeccionados de material que: não libere substâncias tóxicas, odores e sabores, seja não absorvente e resistente à corrosão, e seja capaz de resistir a repetidas operações de limpeza e sanitização.

De acordo com a Portaria, as superfícies devem ser lisas e isentas de rugosidade, frestas e outras imperfeições que possam comprometer a higiene. Não é recomendável o uso de madeira e outros materiais que não possam ser limpos e sanitizados adequadamente, a menos que se tenha a certeza de que seu uso não será uma fonte de contaminação. Deve ser evitado o uso de diferentes materiais na mesma superfície, a fim de inibir o aparecimento de corrosão por contato (BRASIL, 1997b).

Em geral, quanto maior a superfície de contato, maior a probabilidade de formação de biofilmes, uma vez que maior é a área de contato da bactéria com a superfície. Porém, nem sempre quanto maior a rugosidade, maior será a adesão inicial, uma vez que a influência da rugosidade da superfície no processo de formação de

biofilme está relacionada às dificuldades durante a higienização de superfícies rugosas (MIDELET e CARPENTIER, 2004).

O aço inoxidável é um material muito utilizado na construção de equipamentos e utensílios de processamento de alimentos em geral, como tanques de fabricação e estocagem, trocadores de calor, silos, tachos, tubulações, bancadas para manuseio, entre outros (JULLIEN et al., 2002). É um material estável a uma variedade de temperaturas de processamento e apresenta alta resistência à corrosão em função da camada protetora de óxido de cromo que se forma na presença de oxigênio. É resistente ao ataque de agentes oxidantes e outros agentes sanitizantes utilizados na indústria de alimentos, como o hipoclorito de sódio e o ácido peracético. Entretanto, a microtopografia do aço inoxidável é composta de ranhuras e fendas, que permitem a proteção das células bacterianas contra as forças exercidas pelo fluxo do alimento, detergentes e sanitizantes (PENG et al., 2001).

O aço inoxidável pode ser produzido em diferentes graus, de acordo com a finalidade, o que influencia a adesão bacteriana em função das suas várias microtopografias e propriedades físico-químicas. A principal diferença entre os graus disponíveis comercialmente é a sua composição relativa de ferro, cromo e níquel. Dentre os vários tipos disponíveis, os mais utilizados são os do chamado grupo 18-8, que possuem em sua composição, cerca de 18 % de cromo e 8 % de níquel (JULLIEN et al., 2002).

Os polímeros, por sua vez, são muito utilizados na indústria de alimentos, devido suas excelentes propriedades. São capazes de retardar, prevenir mudanças e deterioração no material de embalagem devido a influências externas, como presença de oxigênio, luz e micro-organismos. Uma grande vantagem é o seu menor custo em relação a outros materiais como o vidro (VERGNAUD, 1998).

As propriedades dos polímeros variam de acordo com a matéria-prima utilizada, dos aditivos incorporados e do método de fabricação. Aqueles usados na indústria de alimentos são agrupados em duas categorias: termoplásticos e termoestáveis. Os termoplásticos amolecem quando são aquecidos e endurecem quando resfriados, processo que pode ser repetido várias vezes sem mudanças químicas apreciáveis, como o polietileno, polipropileno e cloreto de vinila ou PVC. Os termoestáveis são capazes de endurecer na primeira vez que em são aquecidos, mas se forem reaquecidos pode ocorrer degradação química, como o poliéster, resina epóxi e poliuretanos (RODOLFO JR et al., 2002).

O polietileno é um polímero parcialmente cristalino, flexível, e inerte face à maioria dos produtos químicos comuns, devido à sua natureza parafínica, seu alto peso molecular e sua estrutura parcialmente cristalina. Em condições normais não são tóxicos, podendo assim ser usados em contato com produtos farmacêuticos e alimentícios (COUTINHO et al., 2003).

O polipropileno está entre os materiais mais populares em indústrias alimentícias, uma vez que tem sido usado em fabricação de tanques, tubulações, acessórios e superfícies envolvidas no corte de alimentos (ANDRADE et al., 2008).

## 2.7 EFEITO DE SANITIZANTES SOBRE A REMOÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS

A sanitização de superfícies de equipamentos e utensílios envolvidos com o processamento de alimentos é importante para o controle da contaminação cruzada. Limpeza e sanitização são procedimentos que devem ser realizados regularmente, uma vez que eliminam grande parte dos micro-organismos contaminantes. Todas as superfícies de processamento de alimentos são lugares potenciais para a adesão bacteriana, que podem ocorrer até mesmo quando programas de limpeza e sanitização são corretamente aplicados (SALUSTIANO et al., 2009).

A escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície. Entre os agentes antimicrobianos, têm-se os sanitizantes químicos. A maioria são aqueles que possuem os princípios ativos dos grupos: quaternário de amônio, compostos inorgânicos e orgânicos liberadores de cloro ativo, compostos à base de ácido peracético, iodo e derivados (SALUSTIANO et al., 2009).

Como a maioria dos sanitizantes químicos são agentes oxidantes, eles podem ter suas atividades reduzidas por compostos orgânicos e inorgânicos presentes no meio a ser tratado. Em inativação química de micro-organismos, o mais importante não é apenas a percentagem de substâncias químicas aplicadas, mas também o residual desta no meio depois que a demanda tiver sido suprida (WICKRAMANAYARE e SPROUL, 1991).

A ação dos sanitizantes é afetada pelo tipo e concentração de micro-organismos contaminantes, características da superfície, tempo e temperatura de

contato, concentração de uso, tipos de resíduos presentes na superfície, pH, propriedades físico-químicas da água e, por substâncias inativadoras (ANDRADE et al., 2008).

Entre os principais sanitizantes, têm-se os surfactantes ou tensoativos, que formam coloides ou micelas em meio aquoso. Em solução aquosa diluídas (menores que  $10^{-4}$  mol.dm<sup>-3</sup>) apresentam comportamento similar a eletrólitos fortes. As micelas são esferas de agregados de moléculas caracterizadas por um núcleo hidrofóbico e uma superfície externa hidrofílica, caso o solvente seja água. A parte polar (grupo hidrofílico) encontra-se em contato com a água enquanto a parte apolar (grupo hidrofóbico) no interior da micela. Assim, quando um surfactante em solução aquosa é adsorvido, a superfície hidrofóbica normalmente orienta o grupo hidrofóbico para a superfície e expõe o grupo polar à água. A superfície torna-se assim hidrofílica e como resultado, a tensão interfacial entre a superfície e a água é reduzida (WICKRAMANAYARE e SPROUL, 1991).

Há uma classificação dos agentes tensoativos baseada na sua ionização em solução aquosa. Os tensoativos aniônicos, que liberam uma carga elétrica negativa em água e são representados pelos sabões obtidos pela saponificação de ácidos graxos com cadeia de 12 a 18 átomos de carbono ou por compostos sintéticos geralmente de origem petroquímica, como é o caso do dodecilbenzeno sulfonato de sódio, e os agentes tensoativos catiônicos, que liberam carga elétrica positiva em solução aquosa, e são representados pelos compostos quaternários de amônia (ANDRADE et al., 2008).

Os tensoativos aniônicos reduzem a permeabilidade da parede celular e podem solubilizar a membrana celular. Os catiônicos se adsorvem à superfície da membrana celular e reagem com os fosfolípidios que compõem a membrana citoplasmática, e, reagem quimicamente com a carga negativa dos íons associados à parede celular. Consequentemente, as forças eletrostáticas estabelecidas entre a substância química e a célula geram estresses, levando à perda de constituintes citoplasmáticos e posteriormente à morte da célula (MANGALAPPALLI-ILLAHTU e KORBER, 2006).

Existe grande variedade de sanitizantes disponíveis no mercado. No entanto, a maioria apresenta pequeno efeito sobre a viabilidade dos esporos bacterianos, sendo poucos com atividade esporicida. Entre os sanitizantes que apresentam esta atividade, destacam-se os compostos clorados, o ácido peróxido, peróxido de hidrogênio, entre outros (ANDRADE et al., 2008).

### **2.7.1 Cloreto de benzalcônio**

O Cloreto de Benzalcônio (BAC) tem como nome químico alquil dimetil benzil cloreto de amônio, sendo conhecido como composto quaternário de amônia. São tensoativos catiônicos que contêm em sua estrutura em átomo de nitrogênio ligado covalentemente a quatro grupos alquil ou aril. Possui peso molecular de 354 g/mol, solúvel em água, e temperatura de 20 °C. É um agente antimicrobiano sintético usado como sanitizantes nos processos de higiene de superfícies em indústrias de alimentos e como antimicrobianos em produtos fármacos (MANGALAPPALLI-ILLAHTU e KORBER, 2006; ANDRADE et al., 2008).

São eficientes sobre bactérias gram-positivas e micro-organismos termorresistentes. No entanto, apresentam baixa ação sobre bactérias gram-negativas (ANDRADE et al., 2008). Seu principal modo de ação é pela interferência nas propriedades de permeabilidade da membrana celular, o que leva ao extravasamento de metabólitos e, pela interferência no metabolismo das proteínas, causando a desnaturação proteica e inibição de enzimas (HOUARI e DI MARTINO, 2007).

Como composto ativo nas superfícies, reduz a tensão superficial da água, causa uma boa umidificação e penetração em locais de difícil acesso à higienização, como fissuras, ranhuras e fendas, mostrando assim condições de ser utilizados como agente de pré-tratamento de superfícies. Não são corrosivos e nem tóxicos. Em baixas concentrações é bacteriostático, e bactericida em concentrações mais altas (HOUARI e DI MARTINO, 2007).

### **2.7.2 Dicloroisocianurato de sódio**

Observa-se uma grande preocupação no que se refere aos problemas ambientais e de saúde causados pelo uso de compostos clorados inorgânicos, pois os mesmos reagem com facilidade formando os trihalometanos (THM), que se originam das reações entre o cloro e as substâncias orgânicas, os ácidos húmicos e fúlvicos presentes na água. Os trihalometanos são considerados carcinogênicos e indicadores da possível presença de outros compostos organoclorados (ácido acético clorado, haloacetoneitrilos, cloropicen, clorofenóis cloropropanonas), também resultantes do processo de cloração das águas e mais perigosos que os próprios trihalometanos. Devido

esse problema, a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer classifica esse subproduto do processo de cloração como cancerígenos (PAVÓN et al., 2008).

Os compostos clorados orgânicos, conhecidos como cloraminas orgânicas, são produzidos pela reação do ácido hipocloroso com aminas, iminas, amidas e imidas. As mais utilizadas são a cloramina T, a dicloramina T, o diclorodimetilhidantoína, as formas sódicas do ácido dicloroisocianúrico e o ácido tricloroisocianúrico. Em comparação com os clorados inorgânicos, liberam mais lentamente o ácido hipocloroso, permanecendo efetivos por períodos de tempos maiores e são menos reativos com a matéria orgânica, formando, portanto, menos trihalometanos e são mais estáveis ao armazenamento (ANDRADE et al., 2008).

O mecanismo de ação dos compostos clorados orgânicos e inorgânicos, com exceção do dióxido de cloro, é semelhante: quando em solução aquosa, liberam ácido hipocloroso (HClO), em sua forma não-dissociada, a qual tem cerca de 80 vezes mais capacidade bactericida que a forma dissociada. O ácido hipocloroso, que não tem carga elétrica, é capaz de atravessar a membrana celular dos micro-organismos e, no citoplasma, inativar enzimas da via glicolítica, pela redução de grupos SH de aminoácidos constituintes dessas enzimas (ANDRADE et al., 2008).

O dicloroisocianurato de sódio possui fórmula molecular  $C_3Cl_2N_3NaO_3$ , com solubilidade de 25 g / 100 g de água, a 25 °C. Sua atividade bactericida não é afetada na faixa de pH 6 a 10.

### **2.7.3 Ácido peracético**

O ácido peracético comercial é um sanitizante constituído por uma mistura de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante, sendo que a reação ocorre em presença de um ácido mineral como catalisador, geralmente o mais utilizado é o ácido sulfúrico. Algumas formulações contêm ainda um ácido orgânico como o octanóico (ANDRADE et al., 2008).

Seu mecanismo de ação foi descrito por Jolivet-Gougeonet et al. (1996) como um rompimento nas ligações sulfídricas e sulfúricas das enzimas que compõem a membrana celular, prejudicando atividades como o transporte ativo através da membrana e os níveis de soluto dentro das células. Seu mecanismo de ação está relacionado à sua forte capacidade oxidante, promovendo a oxidação dos componentes celulares, e, embora o peróxido de hidrogênio seja um forte agente oxidante,

contribuindo para a ação do sanitizante, o principal agente antimicrobiano é o ácido peracético, apresentando atividade mesmo em baixas concentrações é capaz de inativar amplo espectro de micro-organismos (ANDRADE et al., 2008).

Suas principais vantagens são: ação em baixas temperaturas, permanece ativo em presença de matéria orgânica, não é corrosivo ao aço inoxidável e alumínio em concentrações recomendadas de uso, e não requer enxágue da superfície, sendo inodoro na forma diluída, não produz compostos tóxicos ou carcinogênicos, além de não ser afetado pela dureza da água. Entre as desvantagens destacam-se: baixa estabilidade durante a estocagem, irritante à pele, incompatível com ácidos, alcalinos concentrados, borrachas naturais e sintéticas, ferro, cobre e alumínio (SANTORO et al., 2007).

Comercialmente, o ácido peracético é encontrado nas concentrações de 5 %, 15 % e 45 % (m/v). Porém, acima de 15 % apresenta risco de explosão, devido a sua instabilidade e reatividade, tornando-se mais conveniente sua comercialização em concentrações mais baixas e com quantidades maiores de estabilizantes como o agente quelante 8-hidroxiquinolina e o agente sequestrante pirofosfato de sódio, que removem traços de metais que aceleram a decomposição de peróxidos (SANTORO et al., 2007).



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado com bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de Queijo do Marajó, Tipo Creme, elaborados em Soure, na Ilha do Marajó-Pará, pertencente ao Banco de Culturas Lácticas da Universidade Federal do Pará – UFPA.

Os micro-organismos isolados foram colocados em Eppendorf contendo Caldo M17, com 5 % da lactose, adicionados de 20 % de glicerol, armazenados a temperatura de -10 °C, e enviados para a Universidade Federal de Viçosa – UFV, até o momento das análises.

#### **3.1 POTENCIAL TECNOLÓGICO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME**

Foram estudadas as características fenotípicas e bioquímicas de quarenta isolados de bactérias ácido lácticas do Queijo do Marajó, Tipo Creme. Foram realizadas análises de Coloração de Gram, Teste de Catalase, Produção de Gás, Atividade Acidificante, Atividade Proteolítica, Produção de Diacetil e Teste de Lactofermentação. As análises foram realizadas no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Tecnologia de Alimentos – DTA, da Universidade Federal de Viçosa – UFV. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

##### **3.1.1 Coloração de Gram**

Foi utilizado o Teste de Coloração de Gram na diferenciação de bactérias, por observação microscópica.

Para este teste, utilizou-se cristal-violeta, solução de lugol, álcool e safranina em lâminas contendo esfregaço das BAL estudadas. A cor azul púrpura indica bactéria gram-positiva, e a cor vermelha indica bactéria gram-negativa. Este teste permite ainda a visualização da morfologia bacteriana, diferenciando a forma de cocos da forma de bastão (bacilos) (TORTORA et al., 2005).

### **3.1.2 Teste de Catalase**

Os isolados gram-positivos foram submetidos ao Teste de Catalase, que consiste na inoculação do isolado em Ágar M17, com 5 % da lactose, seguido de incubação a 30 °C por 24 h. Após esse período, adicionaram-se três gotas de peróxido de hidrogênio (Vetec) (3,0 %) sobre as colônias, e observou-se a formação de bolhas (TORTORA et al., 2005). Bactérias ácido lácticas não são produtoras de catalase, sendo conhecidas como catalase negativa.

### **3.1.3 Produção de Gás**

O teste diferencia isolados homofermentativos e heterofermentativos a partir da produção de gás carbônico (CO<sub>2</sub>). Para isso, as amostras foram incubadas em Caldo M17 com tubos de Durham invertidos, por 5 d, a 30 °C. A presença de gás nos tubos de Durham evidencia a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose (BULUT, 2003).

### **3.1.4 Atividade Acidificante**

A capacidade de acidificação foi verificada com a inoculação de 1 % de cada cultura ativa em 100 mL de leite em pó desnatado reconstituído (LDR) a 10 %. O pH foi mensurado utilizando-se o pHmetro (PG1400, GEHAKA, USA), nos tempos: 0 h, 6 h e 16 h de incubação, a 30 °C (ESTEPAR et al., 1999). A atividade acidificante foi verificada pela redução do pH durante estes períodos. Foram realizadas três repetições, com duplicata, sendo considerada a média dos resultados.

### **3.1.5 Atividade Proteolítica**

Para a avaliação da atividade proteolítica, as culturas isoladas foram reativadas em meio líquido e cultivadas em ágar M17, com 5 % de lactose, nas mesmas condições em que foram isoladas. Para a verificação do halo indicativo de proteólise, uma alíquota de 2,0 µL da cultura foi plaqueada em ágar leite no centro da placa. O ágar leite foi

elaborado com 5 % de peptona de caseína, 3 % de extrato de levedura, 1,2 % de ágar bacteriológico e 50 % de leite desnatado UHT, seguindo a metodologia usada por Nornberg et al (2009). Após plaqueadas em ágar leite, as culturas foram incubadas a 30 °C, por 4 d. Após esse período, foi feita a verificação do aparecimento do halo proteolítico.

### **3.1.6 Produção de Diacetil**

Adicionou-se 1 mL da cultura ativa em tubos de ensaio com 10 mL de leite UHT. Os tubos foram incubados sob temperatura de 30 °C, por 24 h. Prepararam-se tubos de ensaio com 0,5 mL de hidróxido de potássio (KOH) e 0,5 mL de  $\alpha$  – naftol 1 %. Em seguida, retirou-se 1 mL de cada tubo com leite UHT + cultura ativa e adicionou-se nos tubos com a mistura. Incubou-se a 30 °C, por 30 min, e verificou-se o aparecimento de coloração rósea na superfície do tubo, indicando a presença de diacetil (FURTADO, 1990).

### **3.1.7 Teste de Lactofermentação**

Os isolados foram testados quanto ao perfil de lactofermentação, seguindo metodologia adaptada de Behmer (1985). Tubos rosqueados com um volume de 10 mL de leite em pó desnatado reconstituído a 10 % (m/v), esterilizados em autoclave a 121 °C, por 15 min, foram inoculados com 20  $\mu$ L das culturas de BAL, e então incubados sob 30 °C, por 24 h. Os resultados foram interpretados observando-se o tipo de coágulo formado:

- Coágulo gelatinoso e uniforme: proveniente da fermentação láctica;
- Coágulo esfacelado e esponjoso: com produção de ácido e gás, com soro claro e abundante, proveniente da fermentação pseudoláctica;
- Coágulo caseoso, que se contrai de um lado ou em todo o contorno, com soro claro ou leitoso: proveniente da ação proteolítica;
- Coágulo mole, mas não líquido: proveniente da fermentação de origem inespecífica;
- Sem coágulo: indica impossibilidade de multiplicação de micro-organismos.

## 3.2 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME

Com base nos resultados de caracterização fenotípica e bioquímica dos isolados, foram escolhidos seis isolados (I<sub>1</sub>, I<sub>10</sub>, I<sub>12</sub>, I<sub>19</sub>, I<sub>24</sub> e I<sub>38</sub>) para a identificação genética. Os isolados escolhidos estavam entre os que apresentaram elevada produção de diacetil e melhores propriedades de coagulação no Teste de Lactofermentação, com coagulação gelatinosa, nos testes do potencial tecnológico.

Para melhor compreensão, os isolados I<sub>1</sub>, I<sub>10</sub>, I<sub>12</sub>, I<sub>19</sub>, I<sub>24</sub> e I<sub>38</sub> foram codificados como: isolado A, B, C, D, E e F, respectivamente.

Os testes de biologia molecular desses isolados de BAL foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica – LAMPOAH, no Departamento de Tecnologia de Alimentos – DTA, da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

### 3.2.1 Extração de DNA das amostras

A extração de DNA dos isolados foi feita com o kit “*Wizard*<sup>®</sup> Genomic DNA Purification” (Promega, Estados Unidos). Para a extração do DNA, os isolados de BAL foram reativados em caldo M17 e incubados a 30 °C, por 24 h. Foi retirado 1 mL das suspensões, que foi transferido a microtubos de 1,5 mL. Inicialmente, os tubos foram centrifugados a 12000 g, por 2 min para obtenção de um pellet de cada amostra de isolado.

Os isolados foram ressuspensos com 480 µL da solução de EDTA 50 mMol·L<sup>-1</sup> e adicionados 120 µL de solução de lisozima (10 mg·mL<sup>-1</sup>) para permitir a degradação da parede celular e liberar o DNA. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 60 min e, depois centrifugadas a 12000 g, por 2 min, e o sobrenadante, removido (PROMEGA, 2010). Os pellets das bactérias foram resuspensos com 600 µL da solução de lise e novamente submetidos ao vórtex e incubados a 80 °C, por 5 min, para a lise das células. Após, foram adicionados 3 µL da solução RNase<sup>®</sup> ao lisado de células. A solução foi submetida ao vórtex e incubada a 37 °C, por 60 min. Após a incubação, foram adicionados 200 µL da solução de

precipitação de proteína para o lisado celular tratado com RNase<sup>®</sup> e homogeneizado ao vórtex.

As amostras foram imersas em gelo durante 5 min e, em seguida, centrifugadas a 12000 g por 3 min. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido a microtubos de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol. Os tubos foram homogeneizados delicadamente por inversão, até a formação de fios filiformes de DNA com uma massa visível. Os tubos foram centrifugados novamente a 12000 g durante 2 min. O sobrenadante foi descartado e o tubo invertido sobre um papel absorvente. O pellet foi deixado secar ao ar por um período de 10 a 15 min.

Para a ressuspensão do DNA, foram adicionados 30 µL da solução de reidratação, incubados a 65 °C, por 60 min. O microtubo contendo o DNA foi armazenado a -18 °C até o momento de sua quantificação.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop-100 (Thermo Scientific), que permite a análise e quantificação de amostras de ácidos nucleicos utilizando 1 µL, e estima a quantidade de DNA na amostra em ng.µL<sup>-1</sup>.

### **3.2.2 Amplificação parcial do gene 16S rDNA**

A determinação dos gêneros e espécies de bactérias presentes, foi realizada através de análises de PCR convencional, utilizando um par de primers universal sintetizados pela empresa Sigma<sup>®</sup> (Sigma, Estados Unidos) (iniciador 27F 5-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3 e reverso 1378R 5-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3). Estes primers amplificam parcialmente o gene ribossomal bacteriano 16S em fragmentos com cerca de 1400 pb.

As reações de amplificação foram realizadas em microtubos apropriados de 0,2 mL, aos quais foram adicionados 25 µL contendo 1 µL de DNA, 2,5 µL do reagente 10X Buffer (Sigma<sup>®</sup>, Estados Unidos), 0,5 µL de dNTP a 10 mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Promega<sup>®</sup>, Estados Unidos), 0,25 µL de Taq Polymerase na concentração de 5 unidades.µL (Sigma<sup>®</sup>, Estados Unidos), 1,0 µL do primer iniciador e 1,0 µL do primer reverso e 18,75 µL de água ultrapurificada, esterilizada a 121 °C.

A reação de PCR foi realizada em termociclador, marca Axygen Maxygene (Estados Unidos). As condições de amplificação seguiram o seguinte protocolo: 3 min

de desnaturação a 94 °C; 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 1 min; anelamento a 55 °C por 1 min, e extensão a 72 °C por 2 min, e 72 °C por 10 min.

Para verificação da amplificação do rDNA, os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v) (Sigma<sup>®</sup>, Estados Unidos), em tampão TBE 0,5X contendo brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografado por meio do sistema Canon<sup>®</sup>.

### **3.2.3 Sequenciamento do produto amplificado na PCR**

Os produtos da PCR foram sequenciados bidirecionalmente com os primers de oligonucleotídeos universais 27 F e 1378 R genes, pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) com o sequenciador modelo 3730XL, Applied BioSystems, USA.

As sequências bidirecionais obtidas foram comparadas à sua fita complementar, gerando uma fita consenso elaborada pelo programa DNA Baser software 3.5.4 (<http://www.dnabaser.com/index.html>). As sequências obtidas de cada isolado foram submetidas à análise comparativa ao banco de dados depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

A tradução da sequência de DNA para aminoácidos dos diferentes isolados foi realizada utilizando o algoritmo BLASTN, o qual traduz uma sequência de nucleotídeos para aminoácidos e os compara com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI.

## **3.3 CINÉTICA DE MULTIPLICAÇÃO DE ENTEROCOCCUS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME**

A partir dos resultados genéticos, foram escolhidos três isolados de BAL (isolados A, B e C) e o Pool desses isolados para a avaliação da cinética de multiplicação microbiana, a qual foi realizada no Laboratório de Biologia, no Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

Os parâmetros: taxa máxima de multiplicação ( $\mu$ ) e tempo de lag ( $\lambda$ ), foram determinados objetivando determinar o efeito de três diferentes temperaturas, 15 °C, 30 °C e 45 °C, sobre a multiplicação dos isolados de Enterococcus (A, B e C) e do Pool.

A ativação das culturas puras para o preparo dos inóculos foi realizada em 10 mL de Caldo M17 acrescido de um volume de suspensão de células de forma a obter uma contagem aproximada de  $1 \times 10^3$  UFC/mL. Em seguida, volume de 5  $\mu$ L de cada isolado de BAL e o Pool foram pipetados para microplacas de 96 poços, acrescidos de 95  $\mu$ L de Caldo M17, utilizando como branco o próprio Caldo.

A avaliação e o acompanhamento do crescimento microbiano foram realizados por meio de medidas de absorvância (abs) em espectrofotômetro. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 600 nm. As medidas de absorvância foram realizadas em intervalos de 15 min, por 7 h, tempo médio em que a bactéria está saindo da fase estacionária. As curvas foram construídas plotando  $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$  versus tempo (horas). O termo abs representa medida de absorvância no tempo t e  $\text{abs}_0$  a absorvância inicial. Para cada BAL e temperaturas testadas, foram geradas três curvas de crescimentos, em dias diferentes (três repetições), e em duplicata para cada repetição.

O software DMFit ([www.ifr.ac.uk/safety/DMfit](http://www.ifr.ac.uk/safety/DMfit)) foi utilizado para ajustar os dados das curvas de multiplicação ao modelo de Baranyi e Roberts (1995) (Equação 6 e 7).

$$y(t) = y_0 + gA_n(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{mg A_n(t)-1}}{e^{m(y_{max}-y_0)}} \right) \quad (6)$$

$$A_n(t) = \int_0^t \frac{s^n}{\lambda^n + s^n} ds \quad (7)$$

Sendo:

y(t): valores de absorvância,

s: variável da integrante,

m: parâmetro da curvatura após a fase exponencial,

n: parâmetro da fase de latência,

$y_0$ : absorvância dos isolados no momento t = 0,

g: taxa de multiplicação microbiana,

$y_{max}$ : máxima densidade populacional,

$\lambda$ : duração da fase lag.

### 3.4 ADESÃO DE ENTEROCOCCUS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME EM DIFERENTES SUPERFÍCIES

Para o estudo da adesão, foram utilizados três isolados de bactérias lácticas (A, B e C), do gênero *Enterococcus* e o Pool desses isolados. As análises foram realizadas no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Tecnologia de Alimentos – DTA, da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

### **3.4.1 Superfícies utilizadas**

Cupons testes de aço inoxidável, polietileno e polipropileno, com dimensões de 1,0 cm x 1,0 cm x 0,1 cm, foram utilizados para avaliar a adesão de isolados de *Enterococcus* e o seu Pool. As três superfícies foram escolhidas por estarem presentes no processo de elaboração do Queijo do Marajó. O aço inoxidável está presente em bancadas e utensílios como facas, panelas e tachos, o polietileno em recipientes onde ocorre a coagulação natural do leite, e o polipropileno é utilizado por muitas queijarias, nas embalagens do Queijo do Marajó, Tipo Creme.

### **3.4.2 Preparo dos cupons**

Antes de cada análise, os cupons foram higienizados por meio de imersão em solução aquosa de detergente neutro líquido comercial a 0,2 % (v/v), por 5 min, enxaguados com água ultrapura (Milli-Q, Biocel) por duas vezes e imersos em etanol (P.A.), por 15 min para remoção da gordura. Após esse procedimento, foram enxaguados com água ultrapura, secos em estufa, com temperatura média de 45 °C. Em seguida, os cupons de aço inoxidável foram autoclavados, sob temperatura de 121 °C, por 15 min, enquanto que os cupons de polipropileno e polietileno, foram submetidos à radiação ultravioleta, a 254 nm, por 20 min, de ambos os lados dos cupons (PARIZZI et al., 2004).

### **3.4.3 Preparo das suspensões de células de *Enterococcus***

Os isolados mantidos à temperatura de – 10 °C em tubo Eppendorf, contendo Caldo M17 e 20 % de glicerol, foram ativados no mesmo Caldo, e incubados sob 30 °C,

por 18 h, por duas vezes consecutivas. O número de células nas suspensões foi determinado por plaqueamento em Ágar M17, e incubados a 30 °C, por 18 h.

#### 3.4.4 Adesão de *Enterococcus* nas superfícies dos cupons

Após higienização, cada cupom foi imerso em frascos contendo 10 mL de Caldo M17, acrescido de um volume de suspensão de células de forma a obter uma contagem de  $10^3$  UFC/mL, para manter a concentração do meio. As amostras (isolados A, B e C, e o Pool) foram incubadas à temperatura de 30 °C, em cinco diferentes tempos: 0 h, 6 h, 12 h, 18 h e 24 h. A escolha da temperatura de 30 °C, foi para simular as condições das queijarias da Ilha do Marajó no laboratório, oferecendo informações de adesão mais próximas da realidade, além da mesma ser considerada a temperatura ótima de crescimento para esta bactéria. Os testes foram realizados em triplicata e três repetições.

#### 3.4.5 Determinação do número de células aderidas

Os cupons foram retirados do Caldo M17, com o auxílio de uma pinça esterilizada, e imersos em tubos com 10 mL de solução salina peptonada a 0,1 %, por 1 min, a fim de remover as células planctônicas. Em seguida, foram imersos em tubos com 10 mL da mesma solução diluente, por 1 min, e submetidos ao vórtex, para remoção das células sésseis (PARIZZI et al., 2004). Diluições apropriadas foram transferidas para placas de Petri com Ágar M17, e incubadas à 30 °C, por 24 h. O número de UFC/cm<sup>2</sup> foi determinado utilizando-se a equação:

$$UFC/cm^2 = \frac{(V_D \times V_A) \times M \times D}{A} \quad (8)$$

Onde:  $V_D$  = volume do diluente utilizado na rinsagem (mL)

$V_A$  = volume da alíquota utilizada no plaquamento (mL)

M = média das contagens obtidas nas placas (UFC)

D = diluição realizada

A = área do cupom (cm<sup>2</sup>)

### 3.4.6 Determinação da hidrofobicidade e da variação da energia livre de Gibbs

Foram determinados os ângulos de contato com a água, formamida e  $\alpha$ -bromonaftaleno para as superfícies estudadas utilizando-se o equipamento goniômetro. Foi feita a medição de uma gota de 2,0  $\mu$ L, durante trinta segundos consecutivos, a cada segundo, para todos os líquidos.

As medidas dos ângulos de contatos das superfícies dos três isolados (A, B e C) e do Pool foram realizadas sobre uma camada de célula, de acordo com o método descrito por Busscher et al. (1984). Inicialmente, os isolados foram ativados duas vezes em Caldo M17. Posteriormente, 30 mL da suspensão ativa foi centrifugada a 12.000 g, por 10 min, sendo em seguida lavada por três vezes com tampão fosfato salino (PBS) 0,1M. A massa celular foi ressuspensa em esse mesmo tampão e depositada sobre um filtro de membrana de acetato de celulose de 0,45  $\mu$ m de poro e 47 mm de diâmetro, por filtração a vácuo. Foram adicionadas 30 mL de água ultra-pura (Milli-Q) no momento da filtração.

A fim de padronizar o conteúdo de umidade, os filtros foram transferidos para placas de Petri contendo 1 % de água (m/v) e 10 % de glicerol (v/v). As membranas foram cortadas em três partes sendo cada parte usada para a medição do ângulo de contato, com cada líquido diferente (água, formamida e  $\alpha$ -bromonaftaleno). As medidas de ângulos de contato foram realizadas em temperatura média de 25 °C, com três repetições para cada líquido, em cada superfície bacteriana.

Os componentes da tensão interfacial das superfícies nas condições avaliadas foram determinados pela Equação 4 apresentada anteriormente.

Para se determinar as três componentes da tensão interfacial das superfícies, foi determinado o ângulo de contato formado por três líquidos de polaridades diferentes sobre a superfície. Com os valores contidos na Tabela 1, obteve-se o seguinte sistema de equação:

$$\gamma_s^{LW} = 11,1 (1 + \cos \theta_B)^2 \quad (9)$$

$$5,049 \sqrt{\gamma_s^+} + 5,049 \sqrt{\gamma_s^-} = 36,4 (1 + \cos \theta_A) - 15,51 (1 + \cos \theta_B) \quad (10)$$

$$6,293 \sqrt{\gamma_s^+} + 1,510 \sqrt{\gamma_s^-} = 29 (1 + \cos\theta_F) - 20,806 (1 + \cos\theta_B) \quad (11)$$

Pela resolução destas três últimas equações, obtêm-se as três componentes da tensão interfacial da superfície,  $\gamma_s^{LW}$ ,  $\gamma_s^+$  e  $\gamma_s^-$ , que permitem calcular a tensão interfacial global de uma superfície (s),  $\gamma_s^{TOT}$ :

$$\gamma_s^{TOT} = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad (12)$$

$$\gamma_s^{AB} = 2 (\sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_s^-}) \quad (13)$$

A variação da energia livre global de interação  $\Delta G_{SAS}^{TOT}$  entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (a) foi calculada pelo somatório das componentes apolar ( $\Delta G_{SAS}^{LW}$  – interações de Lifshitz-van der Waals) e polar ( $\Delta G_{SAS}^{AB}$  – interações ácido-base de Lewis) da energia livre global de interação.

$$\Delta G_{SAS}^{TOT} = \Delta G_{SAS}^{LW} + \Delta G_{SAS}^{AB} \quad (14)$$

A componente apolar foi determinada por:

$$\Delta G_{SAS}^{LW} = -2 (\sqrt{\gamma_s^{LW} - \gamma_A^{LW}}) \quad (15)$$

A componente polar foi determinada por:

$$\Delta G_{SAS}^{AB} = -4(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_A^+ \gamma_A^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_A^-} - \sqrt{\gamma_A^+ \gamma_s^-}) \quad (16)$$

### 3.4.7 Determinação da variação de energia livre de Gibbs de adesão ( $\Delta G_{adesão}$ )

A variação da energia livre de hidrofobicidade ( $\Delta G_{SAS}$ ) foi determinada usando-se os valores dos componentes da tensão interfacial. A partir desses valores, é possível determinar a variação da energia livre de Gibbs de adesão entre duas superfícies ( $\Delta G_{adesão}$ ). Os valores das componentes das tensões interfaciais são determinados a partir de valores calculados ou tabelados, das tensões interfaciais das bactérias, das superfícies de adesão e do líquido em que estas duas superfícies se encontram imersas, que neste caso considera-se a água, através das seguintes equações,

definidas para um sistema bifásico de interação (bactéria/superfície) pela teoria da termodinâmica:

$$\gamma_{bs} = \gamma_{bs}^{LW} + \gamma_{bs}^{AB} \quad (17)$$

$$\gamma_{bs}^{LW} = \gamma_b^{LW} + \gamma_s^{LW} - 2\sqrt{\gamma_b^{LW}\gamma_s^{LW}} \quad (18)$$

$$\gamma_{bs}^{AB} = 2(\sqrt{\gamma_b^+\gamma_b^-} + \sqrt{\gamma_s^+\gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^+\gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^-\gamma_s^+}) \quad (19)$$

Como a variação da energia livre de Gibbs de adesão está diretamente relacionada à tensão interfacial,  $\Delta G_{adesão}$  pode ser representado da seguinte forma (CHAVES, 2004):

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{b|s}^{LW} + \Delta G_{b|s}^{AB} \quad (20)$$

$$\Delta G_{b|s}^{LW} = \gamma_{bs}^{LW} - \gamma_{bl}^{LW} - \gamma_{sl}^{LW} \quad (21)$$

$$\Delta G_{b|s}^{AB} = \gamma_{bs}^{AB} - \gamma_{bl}^{AB} - \gamma_{sl}^{AB} \quad (22)$$

Em que  $\gamma_{bs}$  é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/superfície de adesão,  $\gamma_{bl}$  é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/líquido e  $\gamma_{sl}$  é a tensão interfacial entre as superfícies superfície de adesão/líquido.

O valor de  $\Delta G_{adesão}$  permite fazer uma avaliação termodinâmica do processo de adesão, sendo esta termodinamicamente favorável quando  $\Delta G_{adesão} < 0$  e, desfavorável quando  $\Delta G_{adesão} > 0$ .

### 3.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de diferentes superfícies e de Enterococcus do Queijo do Marajó, Tipo Creme, aderidos nas superfícies

Foram realizadas fotomicrografias por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno, e das mesmas superfícies submetidas ao processo de adesão por Enterococcus do Queijo do Marajó, a

fim de verificar as diferenças entre as microtopografias e visualizar a adesão bacteriana. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

No preparo das amostras, os cupons previamente submetidos à adesão bacteriana foram imersos em água peptonada 0,1 % por cinco vezes consecutivas, por 10 min para rinsagem do material. Para fixação das bactérias aderidas foram utilizados solução de glutaraldeído 2,5 % e tampão fosfato 0,1 M (1:1 v/v). Os cupons foram lavados em tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e água destilada (1:1 v/v).

O procedimento de desidratação foi realizado utilizando-se álcool etílico P.A. nas concentrações de 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 95 %, respectivamente, com 10 min de contato em cada concentração, e 100 % em três repetições, por 10 min para retirada completa da água. Os cupons foram transferidos para cestas permeáveis usadas no Secador de Ponto Crítico (Critical Point Dryer) Balzers CPD 020, utilizando-se gás carbônico. Após a secagem do material, fitas adesivas foram coladas no suporte de porta-amostras do microscópio (“stub”) e aplicou-se uma camada de prata coloidal líquida para melhorar a condutividade elétrica do material. Os cupons foram colocados no “stub” e levados ao Matelizador Balzers Union EDU 010, sendo submetidos ao processo de metalização com uma fina camada de ouro de 20 nm, evaporada a vácuo, também com a finalidade de torná-los bons condutores elétricos.

#### **3.4.9 Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre Enterococcus do Queijo do Marajó, Tipo Creme, aderidas nas superfícies avaliadas**

Os cupons de aço inoxidável, polietileno e polipropileno foram submetidos à sanitização com três tipos de sanitizantes: cloreto de benzalcônio, dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético. Todas as soluções sanitizantes avaliadas foram preparadas a partir do produto comercial concentrado. Utilizou-se o clorado orgânico NIPPO-CLOR (NipponChemical) contendo cerca de 4 % de cloro residual total (CRT), expresso em Cl<sub>2</sub>, o cloreto de benzalcônio (Vetec) a 99 %, e o ácido peracético (Proxitane) com cerca de 15 % de ácido peracético. O pH das amostras foi determinado pelo método potenciométrico utilizando-se o potenciômetro digital (DM 20, Digimed), previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0.

As determinações das concentrações dos princípios ativo das soluções sanitizantes, foram realizadas a partir de amostras de 200 mL das soluções. A

concentração do cloro residual total, expresso em  $\text{Cl}_2$  na solução da cloramina orgânica, e do ácido peracético foram determinadas pelo método iodométrico, que consistiu na titulação de uma alíquota de 5 mL da amostra por uma solução padronizada de tiosulfato de sódio, sendo o final da titulação determinado pela viragem de cor azul, proveniente da reação entre amido e iodo, para incolor (GREENBERG et al., 1992). As análises foram realizadas em triplicata. A concentração do princípio ativo do cloreto de benzalcônio foi considerada aquela informada pelo fabricante.

Os cupons foram imersos em frascos contendo 10 mL de Caldo M17, acrescido de um volume de suspensão de células de forma a obter uma contagem de  $10^3$  UFC/mL. As amostras foram incubadas à temperatura de 30 °C, por 24 h.

Os cupons foram retirados do Caldo M17, com o auxílio de uma pinça esterilizada, e imersos em tubos com 10 mL de solução salina peptonada a 0,1 %, por 1 min, a fim de remover as células planctônicas. Em seguida, foram imersos em tubos com 10 mL dos sanitizantes: dicloroisocianurato de sódio (pH = 6,9), na concentração de 200 mg/L de Cloro Residual Total, cloreto de benzalcônio (pH = 7,0) na concentração de 200 mg/L, e ácido peracético (pH = 3,2) na concentração de 200 mg/L. Após 10 min de contato, a atividade dos sanitizantes foi neutralizada com as seguintes soluções: solução de Tween 80 % (m/v) a 2 % para as superfícies sanitizadas com cloreto de benzalcônio; e tiosulfato de sódio 0,25 % para as superfícies sanitizadas com dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético, todos em solução salina peptonada, por 1 min, no vórtex, para remoção das células sésseis.

Diluições apropriadas foram transferidas para placas de Petri com Ágar M17, e incubadas a 30 °C, por 24 h. O número de UFC.cm<sup>-2</sup> foi determinado utilizando-se a Equação 8.

A eficiência dos sanitizantes foi avaliada pelo método nº 649, teste de suspensão proposto pela Association of Official Analysts Chemists (AOAC) com modificações para células sésseis (ANDRADE et al., 2008). Os resultados foram expressos em números de redução decimais (RD).

Para o cálculo, foi utilizada a seguinte equação:

$$N_{RD} = \log_{10} N_A - \log_{10} N_S \quad (23)$$

Onde:

$N_A$  – número de células aderidas/cm<sup>2</sup> nos cupons,

$N_S$  – número de células sobreviventes/cm<sup>2</sup> nos cupons após a ação dos sanitizantes.

### 3.5 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Para as análises da avaliação da atividade acidificante e atividade proteolítica, na caracterização do potencial tecnológica das BAL, utilizou-se um delineamento estatístico inteiramente casualizado num fatorial simples.

Para as análises de cinética microbiana, hidrofobicidade, e determinação da variação da energia livre de Gibbs, também utilizou-se um delineamento estatístico inteiramente casualizado num fatorial simples.

Para as análises da adesão dos isolados A, B e C, e do Pool nas três superfícies (aço inoxidável, polietileno e polipropileno), em cinco tempos de contato (0 h, 6 h, 12 h, 18 h e 24 h) foi utilizado um delineamento estatístico inteiramente casualizado num fatorial composto. Os fatores estudados foram respectivamente: micro-organismos, tempo de adesão e superfícies. Estes dados foram analisados por meio de Análise de Variância (F) a 5 % de probabilidade e uma vez constatados o efeito significativo do tratamento, aplicou-se então o Teste Tukey, a 5 % de probabilidade.

Todo o experimento foi realizado com três repetições, sendo os dados analisados no programa estatístico SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., North Carolina, USA), Versão 9.2, licenciado para Universidade Federal de Viçosa, 2010.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 POTENCIAL TECNOLÓGICO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME**

#### **4.1.1 Coloração de Gram**

Todos os isolados (40) de bactérias lácticas do Queijo do Marajó, Tipo Creme apresentaram-se gram-positivas, como todas as bactérias lácticas. Apresentaram também a forma de cocos. As pesquisas indicam que essa forma predomina na microbiota láctica de leite e queijos. Fortina et al. (2003); Carvalho (2007), e Aquino (2011) ao avaliarem a caracterização fenotípica de isolados de produtos lácteos visualizaram em sua maioria a forma de cocos, com predominância de *Enterococcus* e *Lactococcus*. Ao avaliar a microbiota láctica da Mussarela de búfala, Silva et al. (2010) detectaram que, em geral, os cocos foram prevalentes nas amostras durante todo o processo de produção do queijo. Guimarães (2011) verificou que de 283 isolados do Queijo do Marajó, 246 foram gram-positivos, todos possuindo forma de cocos, em arranjos de cadeia.

#### **4.1.2 Teste de Catalase**

Todos os isolados não apresentaram atividade de catalase, que é uma característica de bactérias lácticas. Resultado semelhante ocorreu em pesquisa de Guimarães (2011) em que 64,63 % do total de isolados de Queijo do Marajó não apresentaram atividade de catalase, e de Aquino (2011) que ao avaliar a microbiota láctica de Requeijão do Sertão, na Bahia, observou que 88,5 % apresentaram atividade de catalase negativa.

#### **4.1.3 Produção de Gás**

Todos os isolados não produziram gás, o que demonstra que são homofermentativos. Resultados idênticos foram observados por Guimarães (2011) ao analisar isolados no Queijo do Marajó, Tipo Creme. As bactérias lácticas

homofermentativas pertencem aos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus* e alguns tipos de *Lactobacillus*.

#### **4.1.4 Atividade Acidificante**

Considerando-se que o pH inicial do leite em todos os isolados variou entre 6,38 e 6,50, nenhum dos 40 isolados reduziu o pH para 5,2, após 6 h de incubação. Após 16 h, todos os isolados reduziram o pH ( $\text{pH} \leq 4,5$ ), com valores entre 4,10 a 4,43.

A capacidade acidificante das bactérias lácticas é de grande importância em produtos lácteos. A rápida redução do pH, pelo acúmulo de ácido láctico, atua, principalmente no controle da microbiota contaminante. Assim, constituem um fator auxiliar no processo de conservação e segurança dos produtos lácteos. Bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* são homofermentativas, tendo o ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose.

Para uma cultura láctica ser considerada produtora rápida de ácido, deve reduzir o pH do leite do seu valor normal (6,6) para 5,2 em 6 h de incubação à temperatura adequada (COGAN et al., 1997). Assim, *Enterococcus* não apresentam rápida atividade acidificante quando inoculadas em leite se comparado com outros gêneros de BAL como, por exemplo, o *Lactococcus* e *Streptococcus* (GIRAFFA, 2003; CARVALHO, 2007; ARAÚJO et al. 2008; ROSADO e KUAYE, 2009). Resultados semelhantes ao desta pesquisa foram observados por Araújo et al. (2008) ao avaliar as características de *Enterococcus* utilizados como fermento endógeno na fabricação do Queijo Minas artesanal. Em pesquisas realizadas por Durlu-Ozkaya et al. (2001) e Sarantinopoulos et al. (2001) foi observado que apenas uma pequena parcela do gênero *Enterococcus* promoveu a redução do pH do leite para 5,2, após 16 a 24 h de incubação a 37 °C. Suzzi et al. (2000) verificaram que *E. faecalis* isoladas de queijos artesanais italianos, reduziram o pH de leite a 4,5 somente após 24 h de fermentação.

Ao comparar as espécies, Suzzi et al. (2000) verificaram um maior poder de acidificação para o *E. faecium* comparado ao *E. faecalis* e *E. durans*, com pH de 4,5 após 24 h de incubação. Resultados semelhantes foram observados por Andrighetto et al. (2001) em que as estirpes de *E. faecalis* também apresentaram baixa atividade de acidificação, comparada a *E. faecium*. Por outro lado, Villani e Coppola (1994) constataram que *E. faecalis* tem maior poder de acidificação do que *E. faecium*, ao avaliarem a atividade acidificante de estirpes inoculando-se em leite por 6 h a 37 °C,

com redução do pH do leite entre 0,4 e 0,8 unidades, tendo a predominância de estirpes *E. faecalis*.

Não há relatos de comparação entre as espécies encontradas nesta pesquisa (*E. faecium* e *E. durans*). Porém, de acordo com os resultados, pode-se dizer que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) em relação ao poder de acidificação entre as mesmas.

#### **4.1.5 Atividade Proteolítica**

Todos os isolados de BAL apresentaram atividade proteolítica. O diâmetro do halo de hidrólise em ágar leite representando a atividade dos isolados variou entre 10,55 mm e 12,26 mm. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2010) em culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala, as quais apresentaram halo de hidrólise em ágar leite com diâmetro entre 10,66 mm a 12,68 mm.

A capacidade de produzir proteases extracelulares é uma característica muito importante de BAL. Estas proteases catalisam a hidrólise das proteínas do leite, fornecendo os aminoácidos essenciais para o seu crescimento e, conseqüentemente, altera a textura, sabor e aromas dos produtos (EL-GHAISH et al., 2010).

Ghraiiri et al. (2008) avaliaram as propriedades proteolíticas de *E. faecium* isolados de queijo Rigouta e constataram que os isolados apresentaram uma alta atividade de peptidase e média atividade de proteases. Para Sarantonopoulos et al. (2001), a maioria dos isolados de *Enterococcus* obtidos de produtos lácteos apresentaram baixa atividade proteolítica, sendo que *E. faecalis* apresenta uma atividade melhor em relação às espécies *E. faecium* e *E. durans*. Como não foi detectada a presença de *E. faecalis* nesta pesquisa, não se pode fazer comparação com esta espécie. Em relação às espécies identificadas, *E. faecium* e *E. durans*, pode-se dizer que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) no que se refere ao poder de acidificação entre as mesmas.

#### **4.1.6 Produção de Diacetil**

Todos os isolados de bactérias lácticas produziram diacetil. Entre os 40 isolados de BAL analisados, 33 apresentaram intensidade alta de produção de diacetil, e sete isolados (I<sub>6</sub>, I<sub>16</sub>, I<sub>21</sub>, I<sub>26</sub>, I<sub>32</sub>, I<sub>37</sub> e I<sub>39</sub>) apresentaram intensidade moderada de produção, o que foi observado a partir da intensidade da coloração rósea na superfície dos tubos de ensaio, sendo mais evidente após o período de 30 min.

A utilização do citrato é uma importante característica tecnológica de BAL, uma vez que essa substância é metabolizada por essas bactérias, com liberação de compostos como diacetil, acetato e acetaldeído. A produção de diacetil tem importante contribuição no desenvolvimento de aroma e sabor de queijos pouco ou não curados, sendo responsáveis pelo sabor e aroma típicos de manteiga nos queijos. A metabolização do citrato pode resultar na produção de compostos como o acetato, etanol, acetaldeído, acetoína, 2,3-butanediol, diacetil e dióxido de carbono (FOX et al., 2000).

O sabor e aroma de manteiga em queijos é uma das características mais apreciadas entre os consumidores, sendo, portanto, considerados os atributos de maior impacto na qualidade do produto, influenciando diretamente a decisão de compra (ROSADO e KUAYE, 2009). Tais atributos podem estar relacionados ao tratamento térmico que pode promover a seleção de micro-organismos capazes de produzir o diacetil. Assim *Enterococcus* podem se desenvolver nos queijos, por serem capazes de sobreviver a temperaturas de pasteurização, ou por uma contaminação pós-processamento. Encontrando um meio então livre de competidores, o que favorece sua rápida multiplicação, as bactérias podem metabolizar o citrato com produção de compostos aromáticos.

A capacidade de metabolizar o citrato ocorre principalmente entre as bactérias: *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *E. faecalis*, *E. faecium*, e *Streptococcus lactis* subsp. *Diacetylactis* (SILVA et al., 2010).

Ao comparar as espécies de *Enterococcus*, Freitas et al. (1999), observaram que o *E. faecalis* apresentou maior ação quanto ao metabolismo do citrato em relação ao *E. faecium*, o que demonstrou a diferença entre as espécies. De modo semelhante, Sarantinopoulos et al. (2001) ao avaliarem a capacidade de 56 isolados de *E. faecalis*, verificaram que 53 metabolizaram acima de 84 % do citrato presente no leite. Já para a espécie de *E. faecium* somente 4 entre 57 isolados consumiram todo o citrato do meio. Rosado e Kuaye (2009) verificaram que o teste de produção de citrato para culturas de *E. faecium* foi positivo, indicado pelo aparecimento do halo avermelhado na parte superior do tubo após 40 min.

#### **4.1.7 Teste de Lactofermentação**

A propriedade de produção de ácido pelas BAL é a principal característica tecnológica para a indústria de laticínios (BERESFORD et al., 2001). Embora o teste de lactofermentação seja usualmente empregado para caracterizar a microbiota predominante no leite, foi utilizado nesse experimento para verificar o tipo de fermentação determinado pelos isolados.

Após o teste de lactofermentação, 35 isolados apresentaram melhores propriedades de coagulação com a coagulação gelatinosa, proveniente de uma fermentação láctica e considerada normal, indicando uma boa qualidade bacteriológica das amostras. A formação do coágulo caseoso, que se contrai de um lado ou em todo o contorno, com soro claro ou leitoso, proveniente da fermentação proteolítica, foi observada em cinco isolados (I<sub>8</sub>, I<sub>16</sub>, I<sub>24</sub>, I<sub>28</sub> e I<sub>36</sub>) de BAL, indicando o potencial proteolítico desses isolados. Aquino (2011) verificou que 53,2 % dos micro-organismos isolados de Requeijão do Sertão apresentaram coágulo gelatinoso.

## **4.2 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME**

### **4.2.1 Análise das sequências de 16S rDNA**

Seis isolados (A, B, C, D, E e F) foram submetidos à análise de biologia molecular, utilizando primer universal. Todas as amostras apresentaram o mesmo tamanho no fragmento de rDNA amplificado, como pode ser observado por meio da eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v) (Figura 1).

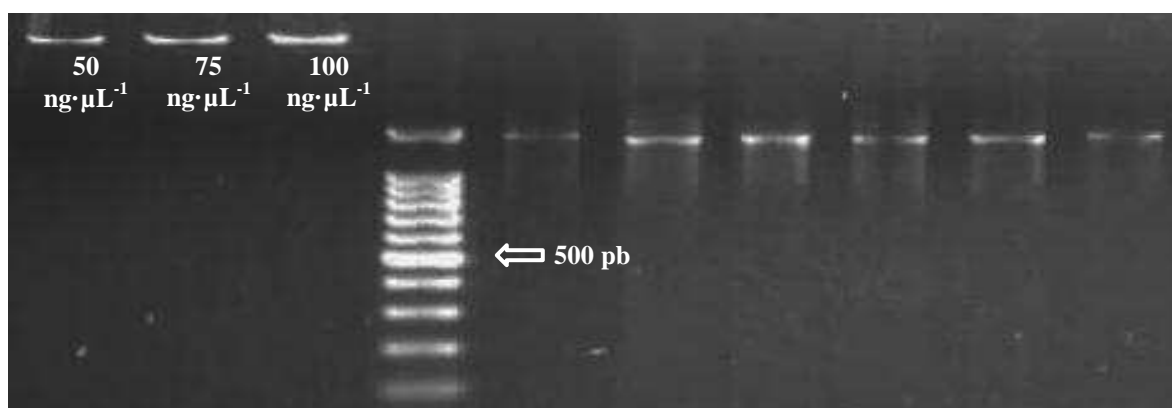


Figura 1– Eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v) do produto de PCR amplificado para identificação genética dos isolados de bactérias lácticas. Linha 1-3 Marcador de DNA lambda. Linha 4 marcador de 100 pb.

As sequências obtidas com os dois primers (forward e reverse) resultaram em dois arquivos de cada fragmento, de forma que foi necessário montar a sequência consenso, sendo analisadas pelo programa DNA Baser.

As sequências foram alinhadas com as sequências genéticas obtidas no banco de dados (homologia > 99 %) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Identificação das bactérias lácticas isoladas do Queijo do Marajó, Tipo Creme, com base na análise do gene 16S rDNA\*

Isolados de BAL	Espécie mais próxima em busca BLAST do GenBank	Código	Similaridade
A	<i>E. faecium</i>	NR 102790.1	99 %
B	<i>E. faecium</i>	NR 102790.1	99 %
C	<i>E. durans</i>	NR 036922.1	99 %
D	<i>E. durans</i>	NR 036922.1	99 %
E	<i>E. faecium</i>	NR 102790.1	99 %
F	<i>E. durans</i>	NR 036922.1	99 %

\* Bactérias lácticas isoladas por crescimento em meios R2A e identificados com base em sequências de genes de 16S rDNA.

Como pode ser observado na Tabela 2, todas as amostras foram identificadas como o gênero *Enterococcus*, os quais são encontrados com grande frequência em muitos tipos de queijos artesanais, e possuem um papel muito importante sobre as

características sensoriais e microbiológicas dos produtos (CARVALHO, 2007; SILVA et al., 2010; NÓBREGA, 2012). As espécies identificadas foram *E. faecium* (isolados A, B e E) e *E. durans* (isolados C, D e F).

Ao comparar os resultados desta pesquisa com outros trabalhos sobre queijos artesanais, pode-se citar as pesquisas de Beresford et al. (2001), que também identificaram esse gênero como o predominante entre as BAL isoladas do queijo de Coalho artesanal de Jaguaribe e dos Sertões Cearenses. Medina et al. (2001) caracterizaram 250 estirpes de BAL, isoladas de um queijo artesanal Argentino e constataram que os gêneros *Enterococcus* foram identificados em 69 % das amostras. Cogan et al. (1997) encontraram um número significativo de *Enterococcus* dentre os isolados oriundos de queijos europeus como Feta, Kasserli e Serra das estrelas. Ao avaliar a microbiota do Queijo Coalho artesanal no Ceará, Carvalho (2007) verificou que o gênero *Enterococcus* foi predominante entre as BAL isoladas (62,3 %), com predominância da espécie *E. faecium* (68 %). A mesma espécie foi identificada por Jurkovic et al. (2006) no queijo Bryndza. Marino et al. (2003) detectaram as espécies *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans* no queijo artesanal italiano Montasio. Moraes (2011) e Nóbrega (2012) verificaram que a espécie *E. faecalis* predominou entre a microbiota do queijo Frescal e dos Queijos Canastra e Serro, respectivamente.

A capacidade que *Enterococcus* tem de se adaptar às condições adversas, como altas e baixas temperaturas, e concentrações elevadas de sal, possibilita seu desenvolvimento em vários tipos de queijos. Carvalho et al. (2005) ao identificarem bactérias lácticas presentes em queijo tipo coalho artesanal, verificaram que *Enterococcus* foi a estirpe bacteriana predominante com 60,3 % do total de bactérias, o que sugere que durante o processamento do queijo, estas poderiam ser selecionadas pela resistência à altas temperaturas, como ocorre na etapa de cozimento. A presença dessa bactéria em Queijo do Marajó justifica sua elevada adaptabilidade, uma vez que sobre a massa do queijo é adicionado de 1 a 2 % de sal, e esse produto passa por 2 tipos de tratamento térmico, aquecimento a temperatura média de 55 °C, e cozimento a temperatura média de 80 °C, durante sua fabricação. No entanto, é importante salientar que, como não existe pelos queijeiros o controle efetivo de temperatura durante as etapas de elaboração do derivado, não se pode afirmar quais as temperaturas exatas em que esses produtos são submetidos.

A contaminação pós-processamento também pode ser uma justificativa para a presença de *Enterococcus* em queijos, pois segundo Carvalho (2007), essa bactéria apresenta bom desenvolvimento durante o processamento dos produtos, passando de

12,0 % nas amostras de leite, para 25,2 % nas amostras de queijo, o que indica que grande parte de *Enterococcus* presentes no derivado advém da matéria-prima. Como já foi citado anteriormente, o fato de um dos principais problemas da fabricação do Queijo do Marajó ser a falta de higiene e de cuidados básicos durante as etapas de elaboração do mesmo, também pode justificar a presença desta bactéria.

#### 4.3 CINÉTICA DE MULTIPLICAÇÃO DE ENTEROCOCCUS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME

A Figura 2 apresenta as curvas de crescimento dos isolados A, B e C, e do Pool nas temperaturas de 15 °C, 30 °C e 45 °C, por um período de incubação de 7 h, tempo médio em que a bactéria sai da fase estacionária.

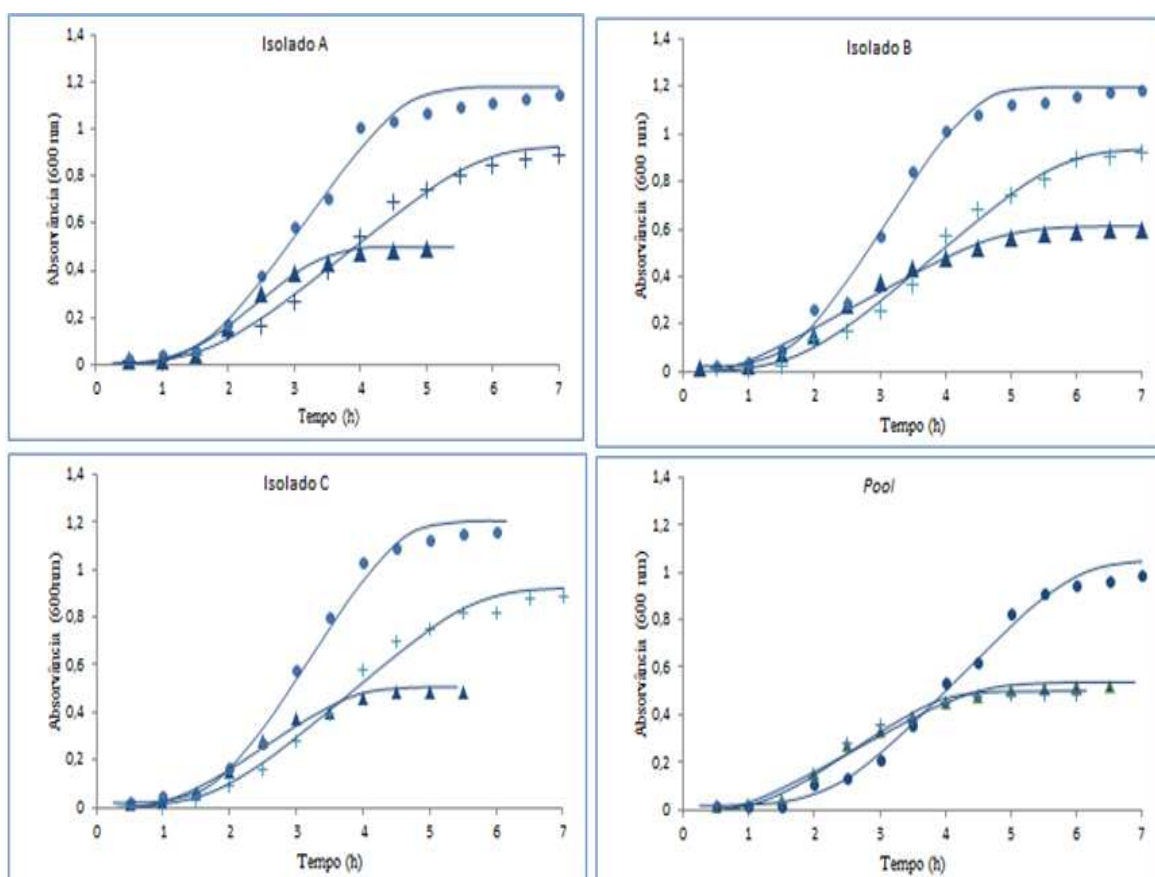


Figura 2 - Curva de crescimento das amostras de BAL incubadas a diferentes temperaturas: — Baranyi; ▲ 15 °C; ● 30 °C; + 45 °C

Todos os isolados e o Pool apresentaram maior densidade populacional na temperatura de 30 °C, e menor densidade na temperatura de 15 °C.

A Tabela 3 apresenta as taxas de multiplicação ( $\mu$ ) e o tempo de permanência na fase lag ( $\lambda$ ) dos isolados de BAL (A, B e C) e do Pool, incubados a três temperaturas.

O modelo proposto por Baranyi e Roberts (1995) apresentou bom ajuste estatístico aos dados observados, com alto coeficiente de determinação ( $R^2 \geq 0,9706$ ) para todas as temperaturas e todas as amostras de BAL. De acordo com Van Impe et al. (2005), o modelo de cinética microbiana de Baranyi e Roberts é amplamente utilizado por várias razões, dentre elas sua facilidade de uso, aplicabilidade sob condições ambientais dinâmicas, boa capacidade de ajuste, e parâmetros biologicamente interpretáveis. O seu uso principal é prever a resposta da multiplicação bacteriana quando há alteração de temperatura durante as fases lag e estacionária.

Tabela 3 – Taxas de multiplicação ( $\mu$ ) e tempo de permanência na fase lag ( $\lambda$ ) dos isolados de BAL (A, B e C) e do Pool, incubados a três temperaturas diferentes.

Temperatura (°C)	BAL	Taxa ( $\mu$ )*	Lag ( $\lambda$ )/h*	R <sup>2</sup>
15 °C	Isolado A	0,1942	1,2443	0,9819
	Isolado B	0,1932	1,4015	0,9810
	Isolado C	0,1948	1,2507	0,9816
	Pool	0,1833	1,6175	0,9837
30 °C	Isolado A	0,2747	1,2126	0,9706
	Isolado B	0,2755	1,4052	0,9736
	Isolado C	0,2748	1,2610	0,9845
	Pool	0,2705	1,4643	0,9828
45 °C	Isolado A	0,2275	1,3367	0,9810
	Isolado B	0,2246	1,4712	0,9840
	Isolado C	0,2283	1,4638	0,9832
	Pool	0,1849	1,4164	0,9811

\* Média das três repetições

Nas temperaturas de incubação de 15 °C e 30 °C, as BAL não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre si, no que se refere às taxas de multiplicação ( $\mu$ ). Dessa forma, pode-se afirmar que não foram observadas diferenças entre as espécies de *Enterococcus*. Porém, apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre si, sob a temperatura de 45 °C, com o Pool obtendo a menor taxa de multiplicação, e o isolado C com o maior valor de taxa de multiplicação, de 0,2883.

Sabe-se que em ambientes naturais e em condições experimentais, nas quais ocorrem interação e competição de micro-organismos sobre as disponibilidades de nutrientes e de espaço, ocorre diminuição na velocidade de multiplicação, com declínio do número de células viáveis na população (FIGUEIREDO et al., 2007). Além disso, a produção de metabólitos tem efeito nas taxas de divisões celulares, e em altas concentrações, pode inibir a multiplicação microbiana ou mesmo matar as células, conseqüentemente, diminuindo a taxa de crescimento da população. Esses fatores podem explicar o fato do Pool obter as menores taxas de multiplicação em todas as temperaturas testadas, uma vez que se tem um processo de interação e competição entre os isolados utilizados para compor o Pool.

Todas as BAL apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as temperaturas avaliadas, em relação aos valores das taxas de multiplicação ( $\mu$ ), com os maiores valores observados sob a temperatura de 30 °C, com os mesmos variando de 0,2705 a 0,2755. Andrade et al. (1998a) verificaram que *E. faecium* apresentou uma velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) em caldo MRS a 30 °C, de 0,68. Os menores valores foram observados a temperatura de 15 °C, os quais variaram de 0,1833 a 0,1948. Figueiredo et al. (1999) encontraram valores de  $\mu$  para *Lactobacillus acidophilus*, de 0,921 h<sup>-1</sup> em MRS, valores estes considerados elevados.

O período de lag considera o tempo de adaptação da bactéria às novas condições ambientais, utilizar os nutrientes disponíveis e iniciar a reprodução celular, evidenciado pelo aumento da turbidez e/ou contagens de colônias nas placas. As BAL estudadas apresentaram diferentes comportamentos do período de lag ( $\lambda$ ). Para uma mesma temperatura, foi observada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as BAL, apresentando assim diferentes condições de adaptação. O Pool apresentou o maior período de lag nas temperaturas de 15 °C e de 30 °C, e o isolado B, o maior período de lag sob a temperatura de 45 °C. Por outro, o isolado A foi o de menor período de lag em todas as temperaturas estudadas.

Ao comparar a mesma BAL sob temperaturas diferentes, verificou-se que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os períodos de lag. Todos os isolados apresentaram o maior período de lag na temperatura de 45 °C, com exceção do Pool, que obteve o maior período na temperatura de 15 °C.

Além dos maiores tempos de fase lag, as baixas taxas de multiplicação das BAL nas temperaturas de 15 °C e 45 °C evidencia que, às temperaturas mais afastadas da temperatura ótima (30 °C), a bactéria *Enterococcus* tem sua adaptação e multiplicação alteradas, como comprovado por Carlos (2008) e Rosado e Kuaye (2009),

ao avaliarem a cinética de crescimento desta bactéria. Os autores verificaram que, incubadas sob a temperatura ótima, este micro-organismo apresentou redução ou ausência de tempo de latência e uma maior velocidade específica de crescimento.

Além do afastamento da temperatura ótima de crescimento, condições de estresse, como choque osmótico e aumento da concentração de sais, também produzem alterações tanto no período de lag como na taxa específica de crescimento microbiano. Gardini et al. (2001) estudaram os efeitos das interações da concentração salina, do pH e da temperatura nos parâmetros de crescimento de isolados de *E. faecalis*, e demonstraram que a velocidade específica de crescimento era consideravelmente afetada pela concentração salina, enquanto a fase de latência era afetada principalmente pela temperatura. Esses dados pode contribuir para a qualidade microbiológica e a segurança dos alimentos dos consumidores, pois dessa forma, consegue-se controlar a multiplicação de tais micro-organismos.

#### 4.4 ADESÃO DE ENTEROCOCCUS DE QUEIJO DO MARAJÓ, TIPO CREME EM DIFERENTES SUPERFÍCIES

##### 4.4.1 Determinação do número de células aderidas

A Tabela 4 apresenta os resultados do logaritmo de UFC.cm<sup>-2</sup> do Número de Células Aderidas dos isolados de Enterococcus (A, B e C) e do Pool, em superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno, em cinco tempos de contato (0 h, 6 h, 12 h, 18 h e 24 h).

Tabela 4 – Logaritmo de UFC.cm<sup>-2</sup> do número de células aderidas dos isolados (A, B e C) e do Pool com as superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno

Adesão	Tempos de Contato (h)				
	0	6	12	18	24
Isolado A / Aço Inoxidável	< 0,60	5,51 ± 0,39	6,68 ± 0,09	8,14 ± 0,47	8,44 ± 0,39
Isolado A / Polietileno	< 0,60	4,80 ± 0,20	5,84 ± 0,05	7,67 ± 0,79	8,03 ± 0,50

Isolado A / Polipropileno	< 0,60	4,15 ± 0,46	5,12 ± 0,43	6,03 ± 0,75	6,64 ± 0,14
Isolado B / Aço Inoxidável	< 0,60	5,65 ± 0,61	6,76 ± 0,15	8,01 ± 0,37	8,52 ± 0,43
Isolado B / Polietileno	< 0,60	4,64 ± 0,15	5,69 ± 0,08	7,69 ± 0,72	7,82 ± 0,10
Isolado B / Polipropileno	< 0,60	4,00 ± 0,38	4,79 ± 0,65	5,57 ± 0,42	6,22 ± 0,44
Isolado C / Aço Inoxidável	< 0,60	5,57 ± 0,09	6,84 ± 0,04	8,04 ± 0,36	8,46 ± 0,84
Isolado C / Polietileno	< 0,60	4,91 ± 0,06	5,90 ± 0,05	7,82 ± 0,82	8,18 ± 0,50
Isolado C / Polipropileno	< 0,60	4,13 ± 0,56	5,04 ± 0,95	5,93 ± 0,79	6,49 ± 0,39
Pool / Aço Inoxidável	< 0,60	5,12 ± 0,23	6,38 ± 0,38	7,90 ± 0,77	8,28 ± 0,81
Pool / Polietileno	< 0,60	4,59 ± 0,47	5,37 ± 0,31	7,37 ± 0,36	7,41 ± 0,37
Pool / Polipropileno	< 0,60	3,94 ± 0,01	4,51 ± 1,02	5,25 ± 0,89	5,94 ± 0,02

O número de células aderidas de BAL aumentou com o tempo de contato para todas as superfícies avaliadas. Do tempo de 0 h para 24 h de contato, foi constatado aumento do número de células aderidas em mais de 8 ciclos log para as superfícies de aço inoxidável, mais de 7 ciclos log para a superfície de polietileno, e média de 6 ciclos log para o polipropileno.

Muitas pesquisas demonstram a influência do tempo de contato sobre o processo de adesão e formação de biofilmes (FIGUEIREDO et al., 2007; ROSADO e KUAYE, 2009; BERNARDES et al., 2013; SÁ, 2013), fato este também observado na presente pesquisa. Em outra pesquisa, placas de aço inoxidável foram incubadas a 45 °C com leite inoculado com média de  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL de *Streptococcus thermophilus*, e verificou-se que após 3 h de contato, as concentrações de células aderidas foram de  $1,6 \times 10^2$  UFC. cm<sup>-2</sup> e, em 6 h, de  $1,9 \times 10^4$  UFC.cm<sup>-2</sup> (GÂNDARA e OLIVEIRA, 2000). Ao avaliar a adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies de aço inoxidável, poliuretano, PVC, silicone, granito e mármore, Careli et al. (2009) verificaram que a adesão bacteriana aumentou com o tempo de contato, com as suspensões atingindo uma concentração em torno de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Constatou-se que o número de células aderidas dos isolados de *Enterococcus* e do Pool diferiu ( $P < 0,05$ ) em função do tipo de superfície. A superfície de aço inoxidável apresentou maior número de células aderidas para todas as BAL, em todos os tempos de contato, enquanto a superfície de polipropileno apresentou menor número de células aderidas de BAL, em todos os tempos de contato. Ao avaliar a adesão de *E. faecium* em cupons de aço inoxidável, Andrade et al. (1998a) encontraram valores entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC.cm<sup>-2</sup>, após 8 h de incubação, sob temperatura de 30 °C, resultados próximos ao desta pesquisa. Flach (2006) aderiu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* isolados da linha de produção de leite três superfícies (aço

inoxidável, polipropileno e tecido de algodão) e verificou que o tecido de algodão foi o material que melhor favoreceu a adesão microbiana de todos os micro-organismos, seguida do polipropileno e aço inoxidável, sendo que essas duas superfícies não apresentaram diferença estatística significativa, diferente dos resultados desta pesquisa.

É importante salientar que as superfícies que apresentaram maior capacidade de adesão e formação de biofilme, aço inoxidável e polietileno, são as que estão envolvidas diretamente com o processamento do produto, uma vez que a superfície de polipropileno está presente apenas na etapa final de elaboração do mesmo, sendo o material pertencente às embalagens. O elevado número de células aderidas ao aço inoxidável e ao polietileno pode ser resultante da higienização ineficiente realizada nas queijarias da Ilha do Marajó (BENDELAK, 2005; FIGUEIREDO, 2006; BITTENCOURT et al., 2013; SIMÕES et al., 2014). De acordo com Rosado e Kuaye (2009), a presença de *Enterococcus* nas superfícies tem relação direta com a qualidade higiênico-sanitária nas etapas de elaboração dos produtos. Gelsomino et al. (2002) sugeriram que uma das fontes de *Enterococcus* em queijo Cheddar é a falha de higienização dos equipamentos e utensílios envolvidos com a ordenha e a fabricação do produto. Timelli et al. (2006) verificaram a presença de *Enterococcus* em superfícies de faca de corte, bandejas, agitador de leite, prensas, embalagens, assoalho, paredes e em mãos de manipuladores, durante o processamento de queijo. Estes resultados demonstram novamente que a qualidade do produto final é função da taxa de contaminação dos equipamentos e utensílios de contato e de uma higienização eficiente, e ainda da capacidade de adesão de *Enterococcus* em tais superfícies, com níveis de 2,31, 1,05 e 2,03 log UFC.cm<sup>-2</sup> no piso, parede e bandeja de queijo, respectivamente.

De acordo com Andrade et al. (1998a), o grande número de células de *Enterococcus* aderidas é associado a altas concentrações no leite (2,1 x 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> em 12 h), o que pode comprometer a qualidade do mesmo, principalmente por acidificação. Dentre as alterações causadas no leite de búfala, na Ilha do Marajó, ainda é a acidificação a mais comum, resultante da fermentação da lactose por diferentes tipos de micro-organismos (FIGUEIREDO et al., 2007).

Para uma mesma superfície, não houve diferença significativa (P > 0,05) entre os isolados de BAL e o Pool. Como as espécies identificadas foram *E. faecium* e *E. durans*, pode-se dizer que as mesmas apresentam capacidades de adesão semelhante. Porém, ao analisar os resultados diante de trabalhos de adesão de outras bactérias, observa-se que *Enterococcus* possui grande capacidade de aderir e multiplicar em superfícies de processamento de alimentos. Figueiredo et al. (2007) avaliaram a

capacidade de multiplicação de *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *E. faecium*, e verificou que *E. faecium* foi a bactéria que apresentou a maior capacidade de multiplicação em superfícies de aço inoxidável, com aumento de cerca de 2 ciclos logarítmicos, em 12 h, enquanto que *P. aeruginosa* apresentou um aumento de 0,9 ciclos log e *B. cereus* um aumento de 0,4 ciclo log. Marques et al. (2005) também verificaram a grande capacidade de adesão e formação de biofilme (média de  $10^7$  UFC.cm<sup>-2</sup>) de várias estirpes de *E. faecalis* isoladas de amostras clínicas, em vidro. Figueiredo et al. (1999) analisaram a adesão de *E. faecium* em cupons de aço inoxidável em forma de T, cilíndrico e de cotovelo 90 ° de um modelo de circulação de leite, por 12 h de contato, à 18 °C, com a suspensão em leite integral esterilizado, contendo cerca de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, e verificaram uma percentagem de adesão de 2,21.

Pode-se observar que o Pool apresentou menor número de células aderidas em todas as superfícies, e em todos os tempos de contato. De acordo com Figueiredo et al. (2007), quando a densidade populacional é baixa, a competição entre bactéria por espaço, oxigênio e nutrientes podem ser limitantes para manter a atividade microbiana, o que pode justificar esses resultados. Como no processamento do Queijo do Marajó, tem-se um Pool de bactérias lácticas, pode-se dizer que o grau de adesão é menor, comparado aos resultados dos isolados.

É importante destacar a importância da temperatura de incubação para a adesão microbiana. Figueiredo et al. (2007) afirmam que a mudança de temperatura pode alterar a fase lag da bactéria. Na presente pesquisa, utilizou-se a temperatura de incubação de 30 °C de forma a simular a temperatura usual na região de origem do Queijo do Marajó. Esta temperatura foi considerada ideal para a multiplicação desta bactéria, como pode ser comprovada com os resultados da cinética de multiplicação microbiana. Fonseca, em 2010, também comprovou que, à 30 °C, o gênero *Enterococcus* produz maior quantidade de biofilme. Este fato gera preocupação, uma vez que a temperatura ideal para a multiplicação de *Enterococcus* é muito próxima da temperatura média do clima das queijarias da Ilha do Marajó.

Segundo Figueiredo et al. (2007), à medida que a temperatura aumenta e é aproximada da temperatura de crescimento ótima, a percentagem de bactérias aderidas também aumenta, associado à maior velocidade de multiplicação bacteriana.

Por outro lado, o abaixamento da temperatura pode afetar negativamente a cinética de produção de exopolissacarídeo. Ainda, a mudança de viscosidade da gordura do leite a 5 °C poder fazer com que seja estabelecida uma camada gordurosa na parede das superfícies, o que dificulta a aproximação de novas bactérias e facilita a

consolidação da adesão das bactérias que estão entre a parede dos cupons e a camada de gordura. Mesmo a temperaturas em que a bactéria não apresenta multiplicação, como 5 °C, ocorre adesão, o que indica atividade metabólica para a produção de exopolímeros. Esses dados evidenciam que, mesmo sob condições de inibição de multiplicação celular, deve-se estar atento aos procedimentos de higienização, a fim de impedir que biofilmes sejam formados (FIGUEIREDO et al., 1999; 2007).

Ao avaliar a influência da temperatura na adesão de *E. faecium*, Rosado e Kuaye (2009) verificaram que, com o aumento da temperatura de 4,5 para o 25 °C, o aumento do número de células aderidas foi em média de 3,99 ciclos log para o tempo de contato de 4 d. Quando a comparação é feita entre as temperaturas de 25 °C e 45,5 °C para o mesmo tempo, ocorre um decréscimo do número de células aderidas em média de 2,13 ciclos log. Comparando-se a temperatura de 10,5 °C e 39,5 °C, para 1,2 e 6,8 d houve aumento de 4,21 e 3,76 ciclos log, respectivamente. Pode-se observar que à medida que a temperatura se distanciou da ótima, o crescimento do micro-organismo decresceu, o que explica a maior taxa de adesão nas temperaturas de 39,5 °C e 25 °C comparadas a 4,5 °C, 10,5 °C e 45,5 °C. Ainda em relação à importância da temperatura para o processo de adesão, Bernardes et al. (2013) verificaram que com o aumento de temperatura de 4 °C para 35 °C, houve aumento do número de células de *B. cereus* aderidas em mais de 3 ciclos log para o tempo de adesão de 24 h.

#### 4.4.2 Determinação dos ângulos de contato e da variação da energia livre de Gibbs

Na Tabela 5 são apresentados os valores médios dos ângulos de contato ( $\theta$ ) com as superfícies de aço inoxidável, polietileno, polipropileno e de células dos isolados de *Enterococcus* (A, B e C) e do Pool, com água ( $\theta_A$ ), formamida ( $\theta_F$ ) e  $\alpha$ -bromonaftaleno ( $\theta_B$ ).

Tabela 5 – Valores médios dos ângulos de contato ( $\theta$ ) com as superfícies de aço inoxidável, polietileno, polipropileno e de células dos isolados de *Enterococcus* (A, B e C) e do Pool, com água ( $\theta_A$ ), formamida ( $\theta_F$ ) e  $\alpha$ -bromonaftaleno ( $\theta_B$ ).

Superfícies de Adesão	Ângulos de Contato*		
	$\theta_A$	$\theta_F$	$\theta_B$
Aço Inoxidável	79,53 ± 0,339	47,03 ± 4,428	29,93 ± 0,74

Polietileno	91,60 ± 1,219	65,26 ± 0,377	33,56 ± 1,108
Polipropileno	93,36 ± 1,265	86,00 ± 0,244	40,93 ± 0,784
Isolado A	10,06 ± 0,659	17,76 ± 1,699	44,44 ± 3,412
Isolado B	11,33 ± 0,047	21,90 ± 1,451	35,70 ± 1,589
Isolado C	09,36 ± 0,377	15,33 ± 1,302	40,90 ± 1,296
Pool	10,36 ± 0,386	17,99 ± 1,564	43,32 ± 1,378

\* média de três repetições

Pode-se dizer que as superfícies do aço inoxidável, do polietileno e do polipropileno apresentaram-se como hidrofóbicas, tendo seus ângulos de contato com a água ( $\theta_A$ ) superior a 65° (VOGLER, 1998). A superfície de aço inoxidável foi a menos hidrofóbica ( $P < 0,05$ ) com um  $\theta_A$  de 79,53, e a superfície do polipropileno a mais hidrofóbica com um  $\theta_A$  de 93,36.

Flach (2006) ao avaliar a hidrofobicidade de superfícies, verificou que o aço inoxidável foi o material mais hidrofóbico, seguido do polipropileno, contrastando os resultados desta pesquisa. Bernardes et al. (2010) e Novello et al. (2013) encontraram ângulo de contato para o aço inoxidável com a água com média de 70,77 e 78,50, respectivamente, o que confirma o caráter hidrofóbico deste material.

As superfícies das BAL apresentaram-se como hidrofílicas, tendo seus ângulos de contato com a água ( $\theta_A$ ) inferior a 65°, sendo a superfície do isolado C a menos hidrofílica ( $P < 0,05$ ), com ângulo de contato de 9,36, e a superfície do isolado B a mais hidrofílica, com um ângulo de contato de 11,33. Diferente destes resultados, Teixeira et al. (2005) mediram os ângulos de *E. faecalis* e verificaram que as mesmas foram classificadas como hidrofóbicas. Bernardes et al. (2010) e Novello et al. (2013) analisaram a hidrofobicidade de *L. monocytogenes* e *B. cereus*, respectivamente, e verificaram que as mesmas apresentaram caráter hidrofílico. Alguns fatores influenciam a hidrofobicidade celular, como a fase em que o micro-organismo se encontra, a presença de apêndices celulares, as substâncias poliméricas excretadas e a composição do meio (HOOD e ZOTTOLA, 1995).

Na Tabela 6 encontram-se os valores das componentes apolar ( $\gamma^{LW}$ ), componentes polar ( $\gamma^{AB}$ ) e respectivos parâmetros ( $\gamma^+$  e  $\gamma^-$ ) da tensão interfacial ( $\gamma^{TOT}$ ) das superfícies de aço inoxidável, polietileno, polipropileno, dos isolados de *Enterococcus* (A, B e C) e do Pool.

Tabela 6 - Valores das componentes apolar ( $\gamma^{LW}$ ), polar ( $\gamma^{AB}$ ) e respectivos parâmetros ( $\gamma^+$  e  $\gamma^-$ ) da tensão interfacial ( $\gamma^{TOT}$ ) das superfícies de aço inoxidável, polietileno, polipropileno, dos isolados de Enterococcus (A, B e C) e do Pool.

Superfície de Adesão	Tensão Interfacial (mJ.m <sup>-2</sup> )				
	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$	$\gamma^{AB}$	$\gamma^{TOT}$
Aço Inoxidável	38,4504	0,8591	3,4500	3,4431	41,8935
Polietileno	37,6956	0,0267	1,3916	0,3855	38,0811
Polipropileno	34,1769	2,4099	99,9800	31,0446	65,2215
Isolado A	32,6273	2,3358	56,2650	22,9280	55,5553
Isolado B	36,4068	1,2093	57,8919	16,7342	53,1410
Isolado C	34,2215	2,1749	55,4087	21,9552	56,1767
Pool	33,1258	2,1830	56,4151	22,1949	55,3207

Quanto maior o valor de  $\gamma^{LW}$  mais apolar é a superfície e, portanto, menor é a sua afinidade com líquidos polares, sendo considerada hidrofóbica. E quanto maior o valor da componente  $\gamma^{AB}$ , mais água de hidratação tem a superfície e, portanto é mais hidrofílica.

Segundo Strevett e Chen (2003)  $\gamma^-$  tem um papel importante entre os parâmetros termodinâmicos da superfície, e  $\gamma^-$  é sempre maior do que  $\gamma^+$ , o que comprova a teoria de que as células têm predominantemente caráter doador de elétrons ( $\gamma^-$ ), como consequência da presença do oxigênio na atmosfera e da hidratação da superfície da célula microbiana (VAN DER MEI et al., 1998). As superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno sem adesão bacteriana também possuem tensão interfacial do componente doador de elétrons ( $\gamma^-$ ) maior do que a tensão interfacial do componente acceptor de elétrons ( $\gamma^+$ ). Chaves (2004), Bernardes et al. (2010), e Novello et al. (2013) ao estudarem a tensão interfacial do aço inoxidável, observaram resultados semelhantes em relação aos componentes doadores e aceptores de elétrons da tensão interfacial, demonstrando que estas superfícies de adesão são predominantemente doadoras de elétrons, como a maioria das superfícies sólidas.

As BAL avaliadas apresentaram tensão interfacial do componente doador de elétrons ( $\gamma^-$ ) maior do que a tensão interfacial do componente acceptor de elétrons ( $\gamma^+$ ). Novello et al. (2013) também observaram resultados semelhantes ao avaliar células de *L. monocytogenes*, e afirmaram que a maior parte dos micro-organismos apresenta uma membrana celular com carga superficial negativa em solução aquosa.

#### 4.4.3 Determinação da variação da energia livre de Gibbs de interação ( $\Delta G_{SAS}^{TOT}$ )

Na Tabela 7 encontram-se os valores da variação da energia livre de Gibbs de hidrofobicidade, que permitem quantificar a hidrofobicidade. Estes valores foram calculados por meio das equações 14, 15 e 16.

Tabela 7 – Valores das variações das componentes apolar ( $\Delta G_{SAS}^{LW}$ ), polar ( $\Delta G_{SAS}^{AB}$ ) e da energia livre de Gibbs de interação ( $\Delta G_{SAS}^{TOT}$ ) das superfícies de aço inoxidável, polietileno, polipropileno e dos isolados de *Enterococcus* (A, B e C) e do Pool.

Superfície de Adesão	Energia livre de Gibbs de interação ( $\text{mJ.m}^{-2}$ )		
	$\Delta G_{SAS}^{LW}$	$\Delta G_{SAS}^{AB}$	$\Delta G_{SAS}^{TOT}$
Aço Inoxidável	-4,6920	-52,6486	-57,3478
Polietileno	-4,3218	-75,6763	-79,9998
Polipropileno	-2,7653	69,2365	66,4659
Isolado A	-2,1727	34,5224	32,3496
Isolado B	-3,7200	40,4297	36,7094
Isolado C	-2,7881	34,2216	31,4335
Pool	-3,5878	35,1684	31,5806

Pelos valores da variação da energia livre de Gibbs de interação ( $\Delta G_{SAS}^{TOT}$ ) que é um critério quantitativo de avaliação da hidrofobicidade, as superfícies de polipropileno e das BAL avaliadas são consideradas hidrofílicas por apresentarem  $\Delta G_{SAS}^{TOT} > 0$ , enquanto as superfícies de aço inoxidável e polietileno são consideradas hidrofóbicas, tendo o  $\Delta G_{SAS}^{TOT} < 0$ . Estes resultados diferem dos obtidos comparados aos resultados do critério qualitativo de determinação da hidrofobicidade, ou seja, pelo ângulo de contato com a água, o qual considera a superfície de polipropileno hidrofóbica. As demais superfícies apresentaram a mesma hidrofobicidade nos critérios qualitativos e quantitativos.

O valor de  $\Delta G_{SAS}^{LW}$  (componente apolar) nas interações microbianas é geralmente negativo, o que indica que as forças de Lifshitz van der Waals são predominantemente atrativas ( $\Delta G_{SAS}^{LW} < 0$ ), enquanto  $\Delta G_{SAS}^{AB}$  (componente polar) pode ser positiva ou negativa, sendo repulsiva ( $\Delta G_{SAS}^{AB} > 0$ ) ou atrativa ( $\Delta G_{SAS}^{AB} < 0$ ), respectivamente. Apenas as superfícies consideradas hidrofílicas apresentam  $\Delta G_{SAS}^{AB} > 0$ ,

o que demonstra que a hidrofobicidade é predominantemente determinada pelas forças polares de atração. A componente  $\Delta G_{SAS}^{AB}$  representa o grau de hidratação da superfície, ou seja, quanto maior for o seu valor, menor será a hidrofobicidade e, conseqüentemente, maior a hidrofiliçidade da superfície (BOSS et al., 1999). De acordo com a Tabela 7, pode-se verificar que a força é repulsiva para as superfícies de polipropileno e de todas as BAL. As superfícies de aço inoxidável e polietileno, por apresentarem  $\Delta G_{SAS}^{AB} < 0$ , são consideradas atrativas.

#### 4.4.4 Determinação da variação da energia livre de Gibbs de adesão ( $\Delta G_{adesão}$ ) entre as superfícies de aço inoxidável, polietileno, polipropileno, os isolados de *Enterococcus* (A, B e C), e o Pool, em meio aquoso

De acordo com a Teoria Termodinâmica da adesão, em solução aquosa, quando a bactéria e a superfície de adesão ultrapassam a energia imposta pelas forças de repulsão, as interações de curto alcance passam a assumir o papel mais importante na adesão. Estas forças de curto alcance consideram as interações polares e apolares. Segundo esta teoria, a adesão será termodinamicamente favorável se a interação conduzir a uma diminuição da energia livre total de adesão, ou seja, quando a energia total de adesão for negativa ( $\Delta G_{adesão} < 0$ ) (CHAVES, 2004).

Na Tabela 8 são apresentados os resultados da variação da energia livre de Gibbs de adesão entre as superfícies aço inoxidável, polietileno e polipropileno, os isolados A, B e C, e o Pool, em meio aquoso. Estes valores foram calculados por meio de equações apresentadas no item 3.5.7.

Tabela 8 – Valor da variação da energia livre de Gibbs de adesão ( $\Delta G_{adesão}$ ) entre os isolados A, B e C, e o Pool (b) e as superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno (s) em meio aquoso (l) e suas componentes apolar ( $\Delta G_{bls}^{LW}$ ) e polar ( $\Delta G_{bls}^{AB}$ )

Superfície de Adesão	Energia livre de Gibbs de adesão (mJ.m <sup>-2</sup> )		
	$\Delta G_{bls}^{LW}$	$\Delta G_{bls}^{AB}$	$\Delta G_{adesão}$
Isolado A / Aço Inoxidável	-2,8999	-2,2782	-5,1772
Isolado A / Polietileno	-3,0634	-3,2988	-6,3618
Isolado A / Polipropileno	-2,4476	51,9417	49,9418
Isolado B / Aço Inoxidável	-4,1798	-6,0816	-10,26

Isolado B / Polietileno	-4,0110	-5,5704	-9,5804
Isolado B / Polipropileno	-3,2050	56,9992	53,7942
Isolado C / Aço Inoxidável	-3,6169	-3,1092	-6,7261
Isolado C / Polietileno	-3,4714	-4,2730	-7,7444
Isolado C / Polipropileno	-2,7681	52,1294	49,3613
Pool / Aço Inoxidável	-3,3280	-2,5136	-5,8416
Pool / Polietileno	-3,1940	-3,5884	-6,7824
Pool / Polipropileno	-2,5562	52,5766	49,4836

A adesão entre as BAL e as superfícies de aço inoxidável e polietileno foram termodinamicamente favorável ( $\Delta G_{adesão} < 0$ ). Em contrapartida, a adesão entre as BAL e a superfície de polipropileno foi termodinamicamente desfavorável ( $\Delta G_{adesão} > 0$ ). Sá (2013) ao avaliar a adesão de *B. cereus* em aço inoxidável, verificou que a adesão foi termodinamicamente favorável, resultado diferente do obtido por Bernardes e colaboradores, em 2010, ao avaliar a adesão entre a mesma bactéria e superfície. Novello et al. (2013) constataram que a adesão de *L. monocytogenes* em cupons de aço inoxidável foi favorável.

Para Van Oss (1997) é bem conhecido que, em meio aquoso, a adesão é favorável entre as superfícies hidrofóbicas que podem “expulsar” a água entre elas. Entretanto, deve ser enfatizado que a adesão entre uma superfície hidrofóbica e uma hidrofílica ou duas superfícies hidrofílicas pode ocorrer.

#### **4.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de diferentes superfícies e de Enterococcus do Queijo do Marajó, Tipo Creme, aderidos nas superfícies**

As fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura das superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno encontram-se na Figura 3. Na observação microscópica verificou-se que as superfícies apresentaram características de microtopografias diferentes, o que pode justificar as diferenças entre os graus de adesão constatados nesse experimento.

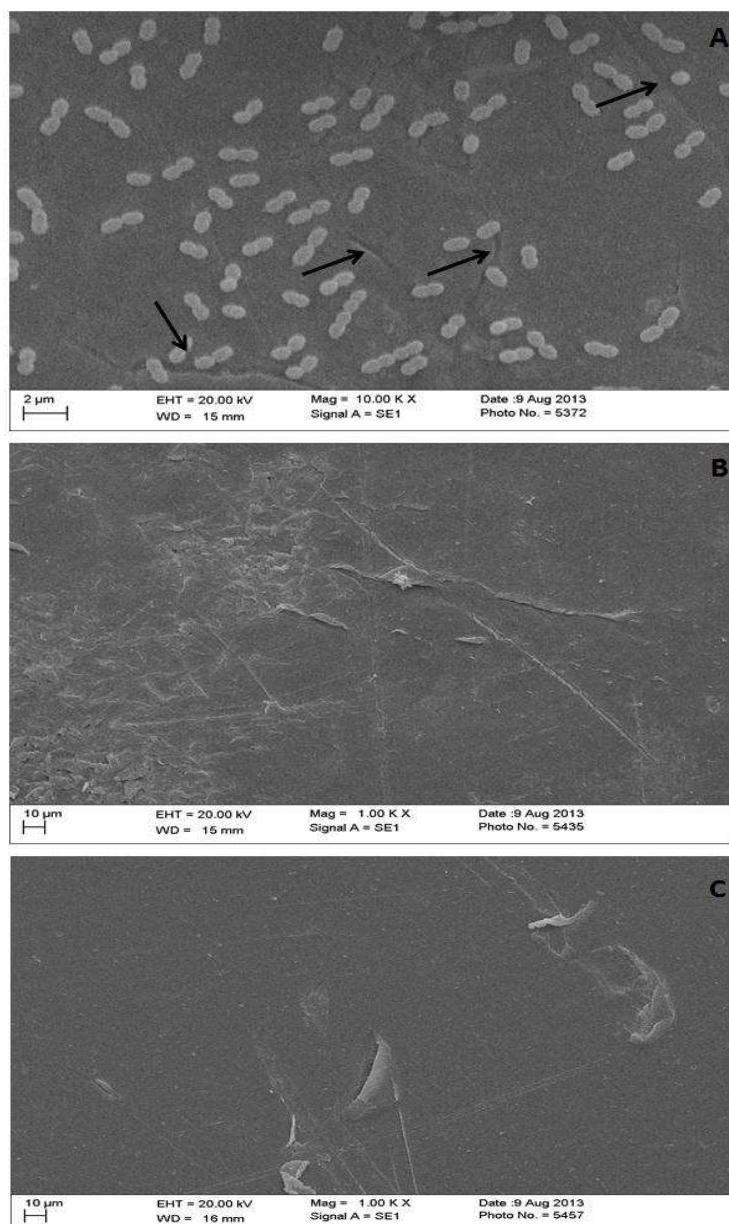


Figura 3 - Microtopografias de superfícies A) Aço inoxidável, B) Polietileno e C) Polipropileno, observadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 3 (A), as setas mostram que por entre as células de *Enterococcus* encontram-se fendas na superfície do aço inoxidável. De acordo com Flach (2006), essas superfícies apresentam diversas deformidades, não percebidas macroscopicamente, mas que podem dificultar o processo adequado de higienização, e permitir a adesão de muitos micro-organismos. Ao avaliar essa superfície, Careli et al. (2009) verificaram através da microscopia, a presença de protuberâncias e fissuras com diâmetros de 5,07  $\mu\text{m}$  e 8,79  $\mu\text{m}$ . A superfície do polietileno (Figura 3 - B) possui superfícies com grandes irregularidades, que de acordo com Flach (2006) são provocadas por sua natureza polimérica. A superfície do polipropileno também apresenta irregularidades, como foi comprovado em pesquisa de Ferreira et al. (2011),

porém, em menores quantidades quando se compara com as demais superfícies avaliadas.

De acordo com Hood e Zottola (1995), a microtopografia do material pode ter um papel muito importante na adesão microbiana, uma vez que a interação micro-organismo-substrato se dá nesse nível. Além disso, a presença de micro-fendas pode proteger os micro-organismos dos tratamentos sanitizantes, diminuindo assim a eficiência dos procedimentos de higienização.

As técnicas microscópicas são as mais recomendadas para a visualização da adesão e formação de biofilmes bacterianos em superfícies de processamento de alimentos, permitindo o acompanhamento do desenvolvimento do biofilme em tempo real (PARIZZI et al., 2004).

A observação dos corpos de provas das superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno submetidos aos ensaios de adesão de *Enterococcus* estão apresentados na Figura 4. Essas observações permitiram aprofundar os conhecimentos em relação às superfícies dos materiais testados, além de verificar o grau de adesão dos isolados de *Enterococcus* e do Pool. Foi possível também uma melhor identificação deste gênero que se caracteriza como diplococos, já que na maioria das vezes foram visualizados em pares.

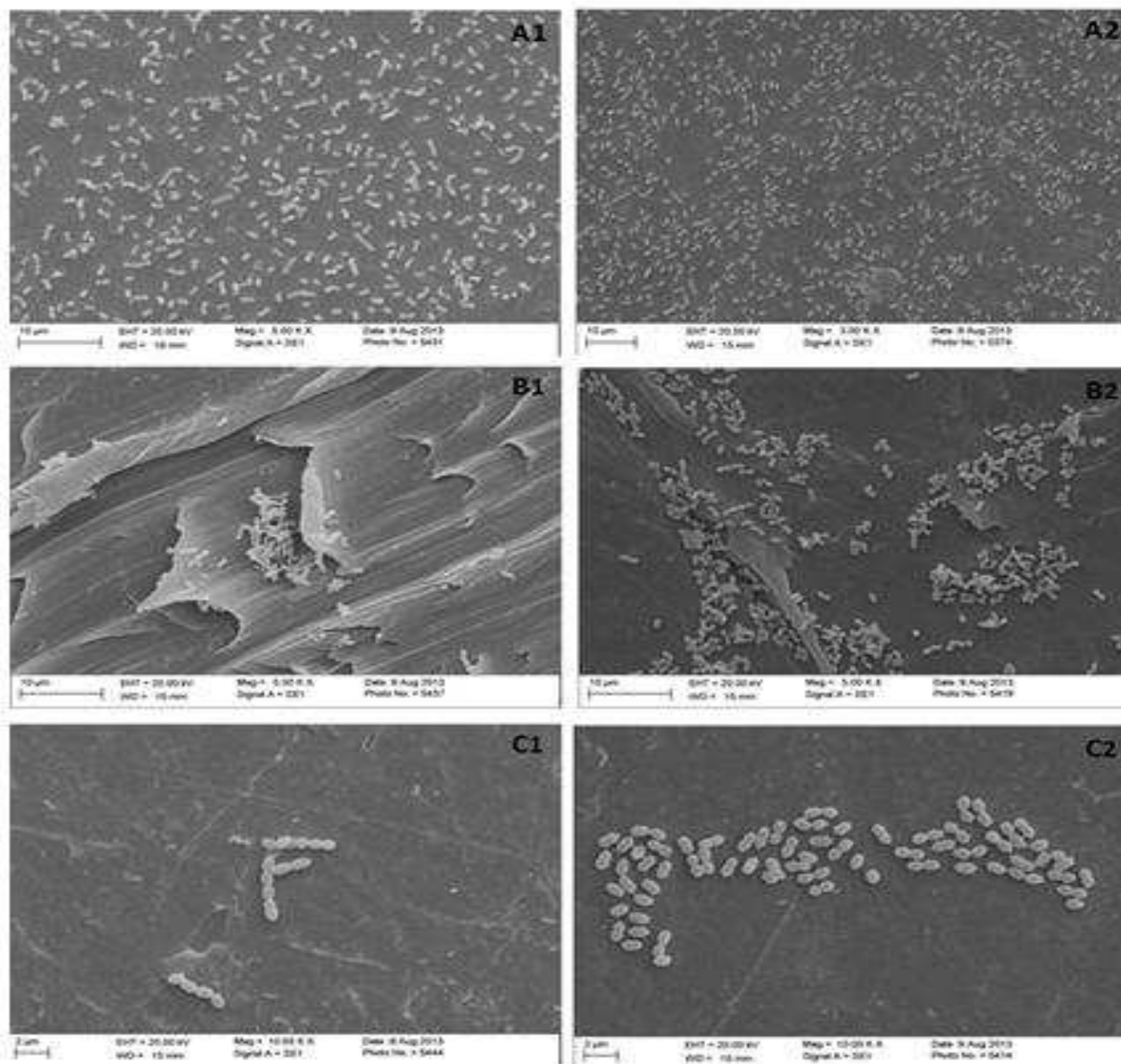


Figura 4 - Microtopografias de superfícies aderidas com *Enterococcus* A) Aço Inoxidável; B) Polietileno, C) Polipropileno, observadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A superfície de aço inoxidável (A1 e A2) foi a que obteve o maior grau de adesão na microscopia, seguida do polietileno (B1 e B2) e do polipropileno (C1 e C2), fato observado também no método de contagem em placas. Rosado e Kuaye (2009) ao comparar as contagens de fotomicrografias e de plaqueamento de *E. faecium*, verificaram que a contagem obtida com a microscopia ( $4,08 \times 10^5$  UFC.cm<sup>-2</sup>), encontrava-se muito próxima à contagem padrão em placas ( $8,93 \times 10^5$  UFC.cm<sup>-2</sup>), para as mesmas condições de tempo e temperatura de exposição. Rosado et al. (2007) avaliaram a adesão de *P. fluorescens* em aço inoxidável e verificaram que a contagem média obtida na microscopia ( $1,3 \times 10^6$  UFC.cm<sup>-2</sup>) estava muito próxima da obtida por contagem padrão em placas ( $1,6 \times 10^6$  UFC.cm<sup>-2</sup>).

As irregularidades e fendas presentes nas superfícies do aço inoxidável e do polietileno, podem diminuir a eficiência dos procedimentos de higienização e facilitar a penetração de resíduos de alimentos que servirão de substrato para a adesão bacteriana, crescimento e formação do biofilme. A presença de deformidades na superfície pode abrigar e proteger os micro-organismos, como pode ser observado na Figura 4 (B1 e B2), onde se verifica um aglomerado de células de *Enterococcus* próximas a essas deformidades. Dessa forma, a utilização correta e diária de procedimentos de higienização, com a utilização adequada de sanitizantes, é de extrema importância na indústria de alimentos.

#### 4.4.6 Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre *Enterococcus* do Queijo do Marajó, Tipo Creme, aderidas nas superfícies avaliadas

Todos os sanitizantes testados apresentaram eficiência diante dos isolados de BAL (A, B e C) e do Pool. Não houve diferença entre a eficiência dos sanitizantes. Em 10 min de ação, 200 mg.L<sup>-1</sup> dos três sanitizantes testados diminuíram o número de BAL com média de > 7,72 RD para o aço inoxidável, média de > 7,17 RD para o polietileno, e média de > 5,62 RD para o polipropileno. A diferença observada entre as reduções decimais se dá pelo número inicial de células aderidas em cada superfície.

A Figura 5 apresenta o logaritmo do número de células aderidas de *Enterococcus* sem a sanitização e após a sanitização nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno.

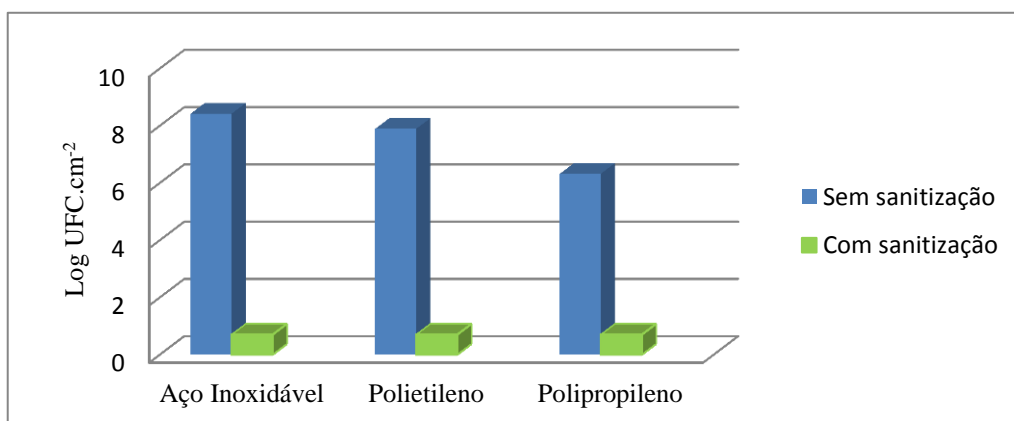


Figura 5 - Logaritmo do número de células aderidas de *Enterococcus* sem a sanitização e após a sanitização nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno.

Diante desses resultados, pode-se dizer que após a sanitização, o número de *Enterococcus* presentes sobre as superfícies foi  $< 4$  UFC/cm<sup>2</sup>. Não existem para superfícies de processamento de alimentos, um padrão, e sim recomendações que devem ser utilizadas como referências para as condições de higiene. Segundo a American Public Health Association (APHA), uma superfície é considerada corretamente higienizada quando o número de micro-organismos é de até 2 UFC/cm<sup>2</sup> nas mesmas. Por ser considerada uma recomendação rígida, outras instituições como a organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) admitem contagens de até 50 UFC/cm<sup>2</sup> de mesófilos aeróbios à superfície (ANDRADE et al. 2008). Assim, pode-se afirmar que todas as superfícies avaliadas nesta pesquisa foram adequadamente higienizadas pelos sanitizantes avaliados.

Mello et al. (1998), avaliaram a eficiência de sanitizantes químicos (cloreto de benzalcônio, ácido peracético e dicloroisocianurato de sódio) com 10 min de contato, sobre *E. faecium* isolados de leite cru e aderidos em cupons de prova de aço inoxidável, e verificaram maior eficiência do dicloroisocianurato de sódio, devido à quantidade de ácido hipocloroso (HClO) liberado durante o processo de sanitização (8,9 mg.L<sup>-1</sup> de HClO). Na pesquisa de Mello et al., (1998), o ácido hipocloroso obteve redução de 6,4 ciclos log de *E. faecium* aderidos em cupons de prova de aço inoxidável em curva. Na presente pesquisa, a concentração de HClO foi de 160 mg.L<sup>-1</sup>, o que explica a grande eficiência da solução clorada.

Ao avaliar a eficiência da sanitização com hipoclorito de sódio a 100 mg.L<sup>-1</sup> e ácido peracético 200 mg.L<sup>-1</sup>, com 10 min de contato, diante de isolados de *E. faecium*, Rosado e Kuaye (2009) constataram que a média de RD foi de 3,00 e 4,02 log UFC.cm<sup>-2</sup> para os dois sanitizantes, respectivamente. O uso de ácido peracético foi mais eficiente no controle de biofilme de *E. faecium* em aço inoxidável, excedendo 1,02 ciclo log na redução quando comparado ao hipoclorito de sódio. O ácido peracético, na

concentração de  $120 \text{ mg.L}^{-1}$  também foi considerado o mais efetivo por Andrade et al. (1998b), reduzindo a contagem de biofilme de *E. faecium* isolado de leite cru, em aço inoxidável em 4,8 ciclos log, após 2 min de contato, enquanto que a redução com o hipoclorito de sódio na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  foi de 4,0 ciclos log.

## **5 CONCLUSÃO**

Os quarenta isolados de bactérias ácido lácticas do Queijo do Marajó, Tipo Creme foram gram-positivos e catalase negativa. Apresentaram baixa atividade

acidificante, portanto inadequados para a utilização de fermentos lácticos iniciadores. Não produziram gás, caracterizando-os como homofermentativos, e atividade proteolítica. A maioria dos isolados produziram diacetil e formação de coágulo gelatinoso, o que pode conferir ao queijo características tecnológicas desejáveis e determinantes para a sua aceitação pelos consumidores.

Os isolados submetidos à caracterização genética foram identificados como *E. faecium* e *E. durans*, consideradas as espécies de maior frequência em queijos artesanais.

A temperatura ótima de crescimento para o *Enterococcus* foi de 30 °C, temperatura em que as amostras de BAL apresentaram os maiores valores das taxas de multiplicação ( $\mu$ ) e menor tempo de fase lag. Sob esta temperatura, as amostras apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre si. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para os valores das taxas de multiplicação e tempo de fase lag em relação às diferentes temperaturas testadas (15 °C, 30 °C e 45 °C).

É possível a adesão e formação de biofilme por *Enterococcus* em superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno. O tempo de contato tem influência no processo de adesão e formação de biofilme, havendo um aumento no número de células aderidas ocorrendo um aumento do tempo de contato para todas as superfícies.

Com base nos resultados do ângulo de contato, critério qualitativo de avaliação, as superfícies do aço inoxidável, do polietileno e do polipropileno foram classificadas como hidrofóbicas, e as superfícies das BAL como hidrofílicas. Com base nos valores da variação da energia livre global de interação ( $\Delta G_{SAS}^{TOT}$ ), considerado um critério quantitativo, as superfícies de polipropileno e das BAL foram classificadas como hidrofílicas, e as superfícies de aço inoxidável e polietileno como hidrofóbicas.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma importante ferramenta na avaliação das superfícies que entram em contato com os alimentos e para a formação de biofilmes bacterianos, pois permite a visualização das microtopografias, em que podem ser evidenciadas irregularidades como ranhuras, fissuras e protuberâncias, e bactérias aderidas. A superfície de aço inoxidável foi a que obteve o maior grau de adesão, seguida do polietileno e do polipropileno, fato observado também no método de contagem em placas.

Os sanitizantes cloreto de benzalcônio, dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético, nas concentrações de 200 mg.L<sup>-1</sup>, com 10 min de ação, mostraram-se eficientes, com redução de células de *Enterococcus*, com média de  $> 7,72$  RD para o

aço inoxidável, média de > 7,17 RD para o polietileno, e média de > 5,62 RD para o polipropileno.

Dessa forma, pode-se dizer que embora *Enterococcus* apresente potencial tecnológico, esta bactéria quando encontrada em níveis elevados, é indicadora de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Além disso, possui grande capacidade de adesão, e pode formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável, polietileno e polipropileno, superfícies presentes no processo de fabricação do Queijo do Marajó. A higienização nas queijarias na Ilha do Marajó, antes e após a elaboração dos derivados, é de grande importância para a qualidade higiênico-sanitária dos mesmos. É importante destacar que, uma das melhores formas de controle é a preventiva, como a adoção de ferramentas como Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), para que se possa garantir a inocuidade dos alimentos processados.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O.; LIMA, J.C. **Adesão e formação de biofilmes microbianos**. In: ANDRADE, N.J. Higiene na indústria de alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008, cap.1, p.15-60, 2008.

ANDRADE, N. J.; AJAO, D. B.; ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. **Journal of Food protection**, n.11, v.61, p.145-1458, 1998a.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bactericidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food protection**, Des Moines, n.7, v.61, p.833-838, 1998b.

ANDRIGHETTO, C.; KNIJFF, E.; LOMBARDI, A.; TORRIANI, S.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; DELLAGLIO, F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. **Journal Dairy Research**, v. 68, p. 303-316, 2001.

ARAÚJO, T. F.; MARQUES, S. L. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; ARCURI, E. F.; RODRIGUES, V. C.; FERREIRA, E. G.; CHAVES, K. S. Perfil de sensibilidade a antibióticos de *Enterococcus* spp. isolados do fermento endógeno utilizados na fabricação do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, MG.. In: 27 Congresso Nacional de Laticínios, 2008, Juiz de Fora. **Anais**. 27 Congresso Nacional de Laticínios, 2008.

AQUINO, A.A. **Requeijão do Sertão fabricado na microrregião de Guanambi, Bahia: Características físico-químicas, microbiológicas e de produção**. Tese de Doutorado. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, 2011.

AZEREDO, J.; HENRIQUES, M.; NOVELLO, J. Adesão microbiana a superfícies bióticas e abióticas. In: AZEVEDO, N.F.; CERCA, N. (Eds.). **Biofilmes – na saúde, no ambiente, na indústria**. Porto: Publindustria Ltda, in press, 2011.

BARANYI, J.; ROBERTS, A.T. Mathematics of predictive food microbiology. **Int. Journal Food Microbiol.**, v.26, p. 199-218, 1995.

BEHMER, M.L.A. Prova de lactofermentação. In: \_\_\_\_\_ **Tecnologia do Leite – Produção, Industrialização e Análise**. 15ª ed. São Paulo. Ed. Nobel, 1985. Cap. 7, p. 59-61.

BENDELAK, M. R. **Processo produtivo, características físico-químicas e microbiológicas e sugestão de implantação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na produção do queijo marajoara tipo creme**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Centro Agropecuário. Universidade Federal do Pará, Belém, 2004.

BENDELAK, M. R. Processo produtivo e sugestão de implantação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle na produção do queijo marajoara tipo creme. 7º Prêmio Food Design em HACCP, 2005. Disponível em: <[HTTP//www.fooddesign.com.br/arquivos/academia/7%20Premio%20Food%20Design%20...](http://www.fooddesign.com.br/arquivos/academia/7%20Premio%20Food%20Design%20...)> Acesso em: 02 nov. 2013.

BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; PENÃ, W. E. L.; MINIM, L. A.; SÁ, J. P. N.; FERNANDES, P. É.; COLOMBARI, D. S. Modeling of the adhesion of *Bacillus cereus* isolated from a dairy plant as a function of time and temperature. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, p. 187-191, 2013.

BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; FERREIRA, S. O.; SÁ, J. P. N.; ARAÚJO, E. A.; DELATORRE, D. M. Z.; LUIZ, L. M. P. Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel adhered by an isolate of *Bacillus cereus* from a dairy plant. **Brazilian Journal of Microbiology** (Impresso), v. 41, p. 984-992, 2010.

BERESFORD, T. P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L., COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, 11, 259-274. 2001.

BITTENCOURT, R. H. F. P. M.; CORTEZ, M. A. S.; MÁRSICO, E. T.; ROSA, R. M. S. S.; TAXI, C. M. A.; FATURI, C.; ERMITA, P. A. N. Caracterização de Requeijão Marajoara e Minas Frescal produzidos com leite de búfalas no Estado do Pará, Brasil. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), v. 43, p. 1687-1692, 2013.

BOSS, R.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 179-230, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde. Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos – DINAL. **Portaria n. 001, de 28 de janeiro de 1987**. Aprova os padrões microbiológicos para produtos destinados ao consumo. Diário Oficial, Brasília. 12 fev. Seção 1, p.2197. 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos origem animal – RIISPOA**. 1997a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 326, de 30/07/1997. **Regulamento Técnico sobre Inspeção Sanitária, Boas Práticas de Produção/Prestação de serviços e Padrão de Identidade e Qualidade na Área de Alimentos**. 1997b.

BULUT, Ç. **Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria from Cheese**. 2003. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciência). İzmir Institute of Technology. Izmir, Turkey. Setembro, 2003.

BUSSCHER, H.J.; WEERKAMP, A.H.; VAN DER MEI, H.C.; VAN PELT, A.W.; DE JONG, H.P.; ARENDS, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n.5, p. 980-983, 1984.

CARELI, R. T.; ANDRADE, N. J.; DE FÁTIMA, N. F. S.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; ROSADO, M. S.; PINHEIRO LUIZ, L. M.; BERNARDES, P. C. Microtopography and bacterial adherence to food contact surfaces evaluated by scanning electron

microscopy and epifluorescence microscopy. **Journal of Food Process Engineering**, v. 32, p. 730-742, 2009.

CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 2, p. 201-209, Apr., 2003.

CARLOS, A. R. C. M. **Análise da expressão génica em estirpes de Enterococcus como resposta a diferentes condições Ambientais**. 2008. 45f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, 2008.

CARVALHO, J. D. G., BRUNO, L. M., NASSU, R. T., LIMA, C. P., VASCONCELOS, N. M., KUAYE, A. Y. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de coalho artesanais comercializados em Fortaleza - CE. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v.60, n.345, p.221-224, 2005.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CHAVES, L.C.D. **Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. Minho, Braga: Universidade do Minho, Portugal. 2004. 156f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, Braga, 2004.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOUPOULOS, G. LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 409-421, Aug., 1997.

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; MARIA, L. C. S. Polietileno: Principais Tipos, Propriedades e Aplicações. **Ciência e Tecnologia**. V.13, nº 1, p.1-13, 2003.

DENYER, S. P.; GORMAN, S. P.; SUSSMAN, M. **Microbial biofilms: formation and control**. Londres: Blackwell Scientific Publications, 1993. 333p.

DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS, V.; TUNAIL, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 861-870, Nov., 2001.

ESTEPAR, J.; SÁNCHEZ, M. M.; ALONSO, L.; MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 10, p. 737-746, Oct., 1999.

EL-GHAISH, S.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, I.; SITOHY, M.; IVANOVA, I.; HAERTLE, T.; CHOBERT, J. Characterization of a new isolate of Lactobacillus

fermentum IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 230, n. 4, p. 635-643, 2010.

FERREIRA, E. G.; FERREIRA, C. L. L. F. Implicações da madeira na identidade e segurança de queijos artesanais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, p. 13-20, 2011.

FIGUEIRAS, A., QUADROS, M. Queijo Marajó: Começa a fase industrial. **Revista Agroamazônia**, Belém, n.3, maio, 2002. p.36-37.

FIGUEIREDO, E. L. **Elaboração e caracterização do Queijo do Marajó tipo creme, de leite de búfala, visando sua padronização**. 2006. 180f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Produção Animal). Universidade Federal do Pará, 2006.

FIGUEIREDO, E. L.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; TORO, M. J. U.; LIMA, S. C. G. Queijo do Marajó tipo creme: parâmetros físico-químicos e sensoriais. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, nº 378, 66, 26:33, 2011.

FIGUEIREDO, H. M.; REIS, R. C.; ANDRADE, N. J. Capacidade de adesão de diferentes micro-organismos em sistema simulador de linha de processamento de leite. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 20, 1999. Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, P.383, 1999.

FIGUEIREDO, H. M.; ANDRADE, N. J.; FERLANDO L. S.; OZELA E. L.; NASCIMENTO, F. C. A. Adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em aço inoxidável em função da concentração bacteriana do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.62, p. 9-14, 2007.

FLACH, J. **Formação de biofilmes em diferentes materiais utilizados na indústria de processamento de leite**. 2006. 129f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

FOLQUIÉ-MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, Jan., 2006.

FONTÁN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B.; TORNADIJO, M. E.; CARBALLO, J. Microbiological changes in ‘San Simón’ cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 1, p. 25-33, Feb. 2001.

FONSECA, J. F. S. G. **Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilme em *Enterococcus* clínicos e alimentares**. 2010. 53f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, 2010.

GINIS, R. Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk sample. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41; p. 106-109, 2003.

FORTINA, M.G.; RICCI, G.; ACQUATI, A.; ZEPPA, G.; GANDINI, A.; MANACHINI, P.L. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in na

artesanal protected denomination origin (PDO) Italian chesse, the Toma piemontese, **Food Microbiology**, v. 20, p. 397-404. 2003.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. 3<sup>a</sup> ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 638 p. 2000.

FREITAS, A. C.; PINTADO, A. E.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Organic acids produced by lactobacilli, enterococci and yeasts isolated from Picante cheese. **European Food Research Technology**, v.209, p.434-438, 1999.

FURTADO, M. M. **Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e soro de queijo de leite cru da região do Serro, Minas Gerais**. Viçosa, 1990. 95 p. Dissertação. Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. 1990.

GÂNDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagens selvagens de *Streptococcus thermophilus* em superfícies de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p.1-7, 2000.

GARDINI, F. M.; MARTUSCELLI, M. C.; CARUSO, F.; GALGANO, M. A.; CRUDELE, F.; FAVATI, M. E.; GUERZONI, G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. **Int J Food Microbiol**. 64:105-17. 2001.

GARRETT, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG,Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, p. 1049-1056, 2008.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; COGAN, T.M.; CONDON, S.; SWINGS, J. Source of Enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3560-3565, 2002.

GHRAIRI, T.; FRERE, J.; BERJEAUD, J. M.; MANAI, M. Purification and characterization of bacteriocinas produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta chesse. **Food Control**. v. 19, p. 162-169, 2008.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, Dec, 2003. Review.

GUIMARÃES, P. C. M. **Isolamento e caracterização bioquímica de culturas lácticas obtidas do Queijo Marajoara**. 2011. 69f. Mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade do Federal do Pará. Belém, 2011.

HELLER, K. J.; BOCKELMANN, W.; SCHREZENMEIR, J.; DEVRESE, M. Cheese and Its Potential as a Probiotic Food. In: FARNWORTH, E. R. **Handbook of Fermented Functional Foods**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. 581 p.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, Guildford, v.6, n.1, p.9-18, 1995.

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: from mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 424-434, 2010.

HOUARI, A.; DI MARTINO, P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation, **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p.652-656, 2007.

JOLIVET-GOUGEON, A.; BRAUX, A. S.; SAUVAGER, F.; ARTURO-SCHAAN, M.; CORMIER, M. Influence of peracetic acid on Escherichia coli H10407 strain in laboratory microcosms. **Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 60-65, 1996.

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, T.; CARPENTIER, B.; LEBRET, V.; FAILLE, C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 77-87, 2002.

JURKOVIC, D., KREZKOVA, L.; DUSINSKY, R.; BELICOVA, A.; SIJKA, M., KRAJCOVIC, J.; EBRINGER, L. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. **Letters of Applied Microbiology**, v. 42, p. 553-339, 2006.

KIM, Y.; OH, S. H. Release exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce formation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7, **Biochemical and Biophysocal Research Communication**, Amsterdam, v. 379, p. 342-329, 2009.

KONGO, J. M.; H O, A. J.; MALCATA, F. X. et al. Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. **J. Appl. Microbiol.**, v.103, p.1838-1844, 2007.

LICITRA, G., OGIER, J. C.; PARAYRE, S.; PEDILIGGIERI, C.; CARNEMOLLA, T. M.; FALENTIN, H.; MADEC, M. N.; CARPINO, S.; LORTAL, S. Variability of bacterial biofilms of the “Tina” wood vats used in the Ragusano cheese-making process. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.37, n.21, p.6980-6987, 2007.

LOURENÇO, L.F.H.; SOUSA, C.L. Análise microbiológica e teste de aceitação de requeijão marajoara elaborado com leite de búfala. **Revista Higiene Alimentar**, v.19, n.132, p.84- 88, junho, 2005.

MACEDO, A. C.; TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2 p. 233-240, 2004.

MANGALAPPALLI-ILLAHTU, A.; KORBER, D.R. Adaptive Resistenace and Differential Protein Expression of Samonella enterica Serove Enteritidis Biofilms Exposed to Benzalkonium Chloride. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.3588-3596. nov. 2006.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 1, p. 133-140, Dec., 2003.

MARQUES, E. B.; IZUMI, E.; PIRES, P. D.; SUZART, S. Hemagglutinating and hemolytic activies of Enterococcus faecalis strains isolated from different human clinal sources. **Research in Microbiology**, Estados Unidos, v. 156, n.4, p. 583-587, 2005.

MEDINA, R.; KATZ, M.; GONZALES, S.; OLIVER, G. Characterization of lactic acid bacteria in Ewe’s milk and cheese from Northwest Argentina. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 4, p. 559-563, Apr., 2001.

MELLO, C. A.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P.; MININ, L.; PASSOS, J. F. V. Avaliação da Eficiência de Sanificantes Químicos em Condições de Uso Simulado sobre Psicotróficos Acidificantes. In: **XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 1998, Rio de Janeiro. v. 2. p. 800-803. 1998.

MIDELET, G.; CARPENTIER, B. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilms structure and microbial transfer to a solid model food. **Journal of applied Microbiology**, Northern Ireland, v.97, p.262-270, 2004.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002. Aprova o regulamento da Lei nº 14.185, de 31/01/2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado do Minas Gerais, 2002. Disponível em: <http://www.almg.gov.br/>. Acesso em: 22 de abril de 2012.

MORAES, P. M. **Diferenciação molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo, e pesquisa de genes de bacteriocinas**. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2011.

MORENO, M. R. F; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

NÓBREGA, J. E. **Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais**. 121f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2012.

NORNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C. BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2009.

NOVELLO, J. C. L.; LIMA, J. C.; SCHAFER, D.; GRANDE, P.; FERREIRA, S. O.; TEIXEIRA, M. P. A.; ANDRADE, N. J.; AZEREDO, J. Implantação de íons de prata em aço inoxidável para o controle de adesão de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos. In: **XII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos**, 2013.

PARÁ, 2013. Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARÁ. Aprova o Regulamento Técnico para a Produção do Queijo do Marajó. Portaria Nº 418 de 04/03/2013 (Estadual - Pará).

PARIZZI, S.Q.F. et al. Bacterial adherence to different surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n.1, p.77-83, 2004.

PAVÓN, J.L.P.; MARTÍN, S.H.; PINTO, C.G.; CORDER, B.M. Determination of trihalomethanes in water samples: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 629, p. 6-23, 2008.

PENG, J.S.; TSAI, W.C.; CHOU, C.C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, p. 105-111, 2001.

PROMEGA, CORPORATION. **Technical Manual. Wizard® Genomic DNA Purification Kit**. USA, Revised 12/10, p.1-20. 2010.

RODOLFO JR, A.; NUNES, L. R.; ORMANJI, W. **Tecnologia do PVC**. São Paulo: Proeditores/Braskem, 400p. 2002.

ROSADO, M. S.; KUAYE, A. Y. Modelagem da Formação de Biofilme de *Enterococcus faecium* em Superfície de Aço Inoxidável. In: **8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas. 2009.

SÁ, J. P. N. **Influência genotípica de estirpes de *Bacillus cereus* na adesão e na resistência a sanitizantes químicos**. Viçosa, MG: UFV, 2013. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2013.

SALUSTIANO, V.C.; ANDRADE, N.J.; SOARES, N.F.F; LIMA, J.C.; BERNARDES, P.C.; LUIZ, L.M.P.; FERNANDES, P.E. Contamination of milk *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 439-442, 2009.

SANTORO, D.; GEHR, R.; BARTRAND, T.A.; LIBERTI, L.; NOTARNICOLA, M.; DELL'ERBA, A.; FALSANISI, D.; HAAS, C.N. Wastewater disinfection by peracetic acid: assessment of models, for tracking residual measurements and inactivation. **Water Environment Research**, v. 79, p. 775-787, 2007.

SARANTINOPOULOS, P.; ANDRIGHETTO, C.; GEORGALAKI, M. D.; REA, M. C.; LOMBARDI, A.; COGAN, T. M.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 8, p. 621-647, 2001.

SEBRAE. Queijos nacionais – Leite e derivados. **Série Mercado**, set. 2008. Disponível em: [www.sebrae.com.br](http://www.sebrae.com.br). Acessado em: 16/04/2013.

SEBRAE, 2013. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, [http://www.pa.agenciasebrae.com.br/noticia\\_pdf.kmf?cod=19915677](http://www.pa.agenciasebrae.com.br/noticia_pdf.kmf?cod=19915677), accessed: jan.06, 2014.

SILVA, L. F.; CASELLA, T.; SIQUEIRA, J. P. Z.; LIMA, B. M.; VOLPINI, L. F.; PENNA, A. L. B. Caracterização de culturas de bactérias ácido-láticas autóctones isoladas de queijo Mussarela de búfala.. In: XX Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2010, Montevideo. **Anais**. 2010.

SILVA, V. R., OLIVEIRA, V. L. **O Queijo do Marajó tipo “creme” derivado do leite de búfala: Uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do agronegócio no Município de Soure**. 2003. 70f. Monografia de Especialização (Empreendedorismo Rural e Desenvolvimento Sustentável), Universidade do Estado do Pará, Belém, 2003.

SIMÕES, M. G.; PORTAL, R. E.; RABELO, J. G. FERREIRA, C. L. L. F. Seasonal variations affect the physicochemical composition of buffalo milk and artisanal cheeses produced in Marajó Island (PA, Brazil). **Advance Journal of Food Science and Technology**, p. 81-91, 2014.

STREVETT, K.A.; CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 329-335, 2003.

SUZZI, G.; CARUSO, M.; GARDINI, F.; LOMBARDI, A.; VANNINI, L.; GUERZONI, M.E.; ANDRIGHETTO, C.; LANORTE, M.T. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 267-274, Aug., 2000.

TEIXEIRA, P.; LOPEZ, Z.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, P.; VIEIRA, M. J. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from milking machine. **Food Microbiology**, v.22, p.247-251, 2005.

TIMELLI, S.; ANAR, S.; SEN, C.; AKYUVA, P. Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. **Food Control**, v,17, p. 856-861, 2006.

TORO, M. J. U., SOUSA, C. L. Microbiologic and physical-chemical characteristics of cheese "Marajoara" sold in Belem, Para State, Brazil. In: **Buffalo Symposium of Américas**, 1. 2002, Belém, p.591-593. 2002.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8<sup>a</sup> ed. Porto Alegre, Brasil: ARTMED, 920p . 2005.

VAN DER MEI, H.C; BOS, R.; BUSSCHER, H.J. A referente guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.9, p. 81, 1998.

VAN IMPE, J. F. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**. V. 100, p. 97-105, 2005.

VAN OSS, C.J.; GIESE, R.F; COSTANZO, P.M. DLVO and non-DLVO interactions in hectorite. **Clays Clay Minerals**, v. 38, p. 151-159, 1990.

VAN OSS, C.J. The forces involved in bioadhesion to flat surfaces and particles-their determination and relative roles. **Biofouling**, v. 4, p. 25-35, 1991.

VAN OSS, C.J.; GIESE, R.F. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VAN OSS, C.J. Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfactants. **Current Opinion Colloids International Science**, v. 2, p. 503-512, 1997.

VILLANI, F.; COPPOLA, S. Selection of enterococcal strains for waterbuffalo Mozzarella cheese manufacture. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**. v. 44, p. 97-105, 1994.

VERGNAUD, J.M. Problems encountered for food safety with polymer packages: chemical exchange, recycling. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.78, n.3, p.267-297, 1998.

VOGLER, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in colloid and interface science**, v. 74, p. 69-117, 1998.

WICKRAMANAYAKE, G. B.; SPROUL, O. J. Kinetics of the inactivation of microorganisms. **Disinfection, sterilization and preservation**, 4 th ed. Pennsylvania Lea e Febiger. P. 72-84, 1991.

XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelagem da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**. 2005. Disponível em: <http://www.dequim.ist.utl.pt/bbio/76/pdf/biofilmes.pdf>. Acesso em: 09/07/2014.

ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125-148, 1994.